

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE L'ARN HÉLICASE DBP4

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MARTIN LAPENSÉE

NOVEMBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ce projet de maîtrise n'aurait pu être possible sans l'aide et le support de plusieurs personnes que j'aimerais remercier. Tout d'abord, un grand merci à mon directeur de recherche François Dragon pour m'avoir permis de travailler sur ce projet. Merci pour les conseils, les encouragements et la patience dont vous avez fait preuve.

Je voudrais aussi remercier mes collègues de laboratoire ainsi que mes collègues biologistes de nos laboratoires voisins qui m'ont aidé de près ou de loin dans ce projet. Plus particulièrement Vincent Lemay, Christian Trahan et Sahar Soltanieh. Vos conseils et votre support ont été grandement appréciés.

Un grand merci au Dr Mario Houde et Dr Laurent Poliquin, membres de mon comité d'évaluation, pour leur conseil.

Finalement, merci à mes parents pour leur appui constant.

TABLE DES MATIÈRES

| | Page |
|---|------|
| LISTE DES FIGURES..... | vi |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | vii |
| RÉSUMÉ | viii |
| <i>CHAPITRE I - INTRODUCTION</i> | |
| 1.1 ÉTAT DES CONNAISSANCES..... | 1 |
| 1.1.1 LE NUCLÉOLE..... | 1 |
| 1.1.2 LE RIBOSOME..... | 1 |
| 1.1.3 LES PETITS ARN NUCLÉOLAIRES (SNORNA) | 3 |
| 1.1.4 LE SNORNA U3..... | 3 |
| 1.1.5 LE SNORNA U14..... | 5 |
| 1.1.6 LES HÉLICASES. | 6 |
| 1.1.7 LES CINQ SUPERFAMILLES D'HÉLICASES | 7 |
| 1.1.8 LES ARN HÉLICASES DEX(D/H) | 8 |
| 1.1.9 LES PROTÉINES DEAD-BOX..... | 9 |
| 1.1.10 LES MOTIFS DES PROTÉINES DEAD-BOX | 10 |
| 1.1.11 LA « DEAD-BOX PROTEIN 4 » (DBP4) ET SES INTERACTEURS POSSIBLES..... | 11 |
| 1.2 LE PROJET | 13 |
| 1.2.1 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL..... | 13 |
| <i>CHAPITRE II - MÉTHODOLOGIE</i> | |
| 2.1 SOUCHES ET CONSTRUCTION | |
| 2.1.1 SOUCHES BACTÉRIENNES..... | 14 |
| 2.1.2 CONSTRUCTION..... | 14 |
| 2.2 PURIFICATION DE PROTÉINE | |
| 2.2.1 MÉTHODE DE PRÉPARATION DES EXTRAITS BACTÉRIENS | 16 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2 PURIFICATION DE PROTÉINE DE FUSION 6HIS PAR CHROMATOGRAPHIE D’AFFINITÉ | 16 |
| 2.3 ANALYSE DE PROTÉINES | |
| 2.3.1 SDS-PAGE..... | 17 |
| 2.3.2 IMMUNOBUVARDAGE..... | 17 |
| 2.4 INTERACTIONS PROTÉIQUES | |
| 2.4.1 TRANSFORMATION DE LEVURES..... | 18 |
| 2.4.2 TEST D’INTERACTION PROTÉINE-PROTÉINE..... | 19 |
| 2.5 TEST ENZYMATIQUE | |
| 2.5.1 PRÉPARATION D’ARN TOTAL DE LEVURE..... | 20 |
| 2.5.2 DOSAGE DE PHOSPHATE AVEC UN TEST COLORIMÉTRIQUE À BASE DE VERT DE MALACHITE..... | 20 |
| 2.5.3 TEST D’ACTIVITÉ ATPASIQUE..... | 20 |
| 2.5.4 DÉTERMINATION DU PH ET DE LA TEMPÉRATURE OPTIMUM... | 21 |
| 2.6 PRODUCTION D’ANTICORPS | |
| 2.6.1 COLORATION INVERSÉE..... | 22 |
| 2.6.2 PURIFICATION DE DBP4 Δ CAT PAR ÉLECTROÉLUTION | 22 |
| 2.6.3 PRODUCTION D’ANTICORPS DE LAPIN..... | 23 |
| 2.6.4 MÉTHODE DE PRÉPARATION DES EXTRAITS DE LEVURES..... | 23 |
| 2.6.5 VÉRIFICATION DU TITRE DE L’ANTICORPS ANTI-DBP4..... | 23 |
| <i>CHAPITRE III - RÉSULTATS</i> | |
| 3.1 EXPRESSION DE DBP4 ET DBP4 Δ CTERM..... | 25 |
| 3.2 QUANTITÉ D’ARN TOTAL POUR L’OPTIMISATION DE L’ACTIVITÉ ATPASIQUE | 26 |
| 3.3 DÉTERMINATION DU PH OPTIMUM..... | 27 |
| 3.4 DÉTERMINATION DE LA TEMPÉRATURE OPTIMALE..... | 28 |
| 3.5 ACTIVITÉ ATPASIQUE DE DBP4 STIMULÉE PAR LA PRÉSENCE D’ARN..... | 29 |
| 3.6 IMPACT DU DOMAINE C-TERMINAL DE DBP4 SUR L’ACTIVITÉ ATPASIQUE..... | 30 |

| | |
|--|--------|
| 3.7 TEST D'INTERACTION <i>IN VITRO</i> AVEC DBP4..... | 31 |
| 3.8 EXPRESSION DE DBP4 Δ CAT POUR L'IMMUNISATION DE LAPIN..... | 33 |
| 3.9 PRODUCTION D'ANTICORPS DE LAPIN CONTRE DBP4..... | 33 |
| <i>CHAPITRE IV - DISCUSSION</i> | |
| 4.1 LES CONDITIONS NÉCESSAIRES À UNE ACTIVITÉ ATPASIQUE OPTIMALE..... | 36 |
| 4.2 L'ACTIVITÉ ATPASIQUE DE DBP4 EST STIMULÉE PAR LA PRÉSENCE D'ARN..... | 37 |
| 4.3 IMPLICATION DU DOMAINE C-TERMINAL DE DBP4 SUR L'ACTIVITÉ ATPASIQUE..... | 38 |
| 4.4 PROTÉINES ASSOCIÉES À DBP4..... | 38 |
| 4.5 PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI-DBP4..... | 40 |
| <i>CHAPITRE V – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i> | |
| 5.1 CONCLUSIONS..... | 41 |
| 5.2 PERSPECTIVES..... | 41 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 43 |

LISTE DES FIGURES

| Figure | Description | Page |
|--------|--|------|
| 1.1 | Maturation des pré-ARNr chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . | 2 |
| 1.2 | Structure secondaire de U3 et du pré-ARNr 35S. | 4 |
| 1.3 | Structure secondaire de U14. | 6 |
| 1.4 | Structure schématisée des hélicases des SF1 et SF2. | 8 |
| 1.5 | Présentation schématique de Dbp4 et des motifs conservés des protéines DEAD-box. | 11 |
| 3.1 | Purification de Dbp4 et Dbp4 Δ Cterm. | 26 |
| 3.2 | Quantité d'ARN total nécessaire à l'obtention d'une activité ATPasique maximale. | 27 |
| 3.3 | pH optimum pour l'activité ATPasique de Dbp4. | 28 |
| 3.4 | Température optimale pour l'activité ATPasique de Dbp4. | 29 |
| 3.5 | Activité ATPasique de Dbp4 stimulée par l'ARN. | 30 |
| 3.6 | Impact de la délétion du domaine C-terminal sur l'activité ATPasique de Dbp4. | 31 |
| 3.7 | Test d'interaction double hybride avec Dbp4. | 32 |
| 3.8 | Purification de Dbp4 Δ cat par chromatographie d'affinité | 33 |
| 3.9 | Titration de l'anticorps anti-Dbp4. | 35 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------|---|
| 3-AT | 3-aminotriazole |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| ADNr | acide désoxyribonucléique ribosomique |
| ARN | acide ribonucléique |
| ARNm | acide ribonucléique messenger |
| ARNr | acide ribonucléique ribosomique |
| DMSO | sulfoxyde de diméthyl |
| D.O. | densité optique |
| ECL | chemiluminescence enzymatique |
| EDTA | acide éthylènediaminetétraacétique |
| ETS | « external transcribed spacer » |
| ×g | force gravitationnelle |
| g | gramme |
| HSS | ADN concassé de sperme de Hareng |
| HRP | peroxidase de raifort |
| kb | kilobase |
| kDa | kiloDalton |
| L | litre |
| LiAc | acétate de lithium |
| ml | millilitre |
| PCR | réaction de polymérisation en chaîne |
| PEG | polyéthylène glycol |
| PVDF | fluorure de polyvinylidène |
| RPM | rotation par minute |
| SDS | dodécylsulfate de sodium |
| SDS-PAGE | électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS |
| snoRNA | petit ARN nucléolaire |
| snoRNP | petite ribonucléoprotéine nucléolaire |
| μl | microlitre |
| μg | microgramme |
| μm | micromètre |
| YNB | « yeast nitrogen base » |

RÉSUMÉ

Les mécanismes qui entrent en jeu dans la maturation de l'ARN ribosomique (ARNr) restent toujours obscurs. Dbp4 est une ARN hélicase putative qui fait partie du groupe des hélicases « DEAD-box ». Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Dbp4 aurait un rôle à jouer dans la maturation du pré-ARNr 35S. Les ARN hélicases ont généralement une activité ATPasique dépendante de la présence d'ARN. De plus, la plupart des hélicases possèdent des domaines supplémentaires en N- et en C-terminal qui pourraient être nécessaires pour l'activité et/ou pour conférer la spécificité pour un substrat. Nous désirons déterminer les caractéristiques biochimiques de Dbp4. Cette enzyme est pourvue d'un très long domaine C-terminal qui contient un motif de liaison protéique « coiled-coil ». La présence de ce motif suggère que Dbp4 pourrait nécessiter l'assistance de protéine(s) cofacteur(s) pour avoir une activité ATPasique et/ou hélicasique. Des tests d'interaction dans le système double hybride de levure ont permis d'identifier une interaction entre Dbp4 et les protéines Bfr2, Esf1 et Enp2. Les conditions optimales pour l'activité ATPasique sont une incubation à 37 °C dans un tampon HEPES à pH 7.5 avec 10 µg d'ARN total de levure. Dbp4 possède une activité ATPasique qui augmente de quatre à cinq fois en présence d'ARN. La protéine Dbp4 recombinante sans la section C-terminale a été produite et des tests d'activité ATPasique ont été effectués. Selon nos observations, la section C-terminale de Dbp4 joue un rôle important pour l'activité ATPasique. Finalement, la production d'anticorps anti-Dbp4 chez le lapin nous a donné deux anticorps, A et B, capables de détecter Dbp4.

Mot-clés : Hélicase, ATPase, ARNr, DEAD-box, Dbp4, *Saccharomyces cerevisiae*, double hybride et coloration au vert de malachite.

CHAPITRE I - INTRODUCTION

1.1 État des connaissances

1.1.1 Le nucléole

C'est en 1781 que le nucléole fut observé pour la première fois par Fontana. Cette structure contrastée du noyau fut observée par microscopie en contraste de phase (Hernandez-Verdun, 2006). Chez les mammifères, le noyau peut contenir d'un à six nucléoles qui varient en taille et en forme (Savino *et al.*, 2001). On peut séparer le nucléole en trois parties distinctes. Tout d'abord, il y a les zones claires nommées FC « Fibrillar Center » qui sont entourées du DFC « Dense Fibrillar Center » qui est plus sombre (Goessens *et al.*, 1987). Ces DFC sont des régions hautement contrastées qui forment un réseau entre les FC (Junéra *et al.*, 1995). On retrouve les DFC et FC à l'intérieur du GC « Granular Component » qui est constitué essentiellement de granules de 15 à 20 nanomètres de diamètre (Hernandez-Verdun, 2006; Junéra *et al.*, 1995). Le nucléole est la zone d'assemblage des ribosomes. C'est à l'intérieur de celui-ci que les gènes d'ARN ribosomiques (ARNr) sont transcrits et maturés.

1.1.2 Le ribosome

Le ribosome est constitué de 80 protéines et 4 ARNr : le 5S, le 5.8S, le 18S et le 25S. Le tout forme deux sous-unités de 40S et 60S qui vont permettre la traduction de l'ARNm en protéine. Chez la levure, le mécanisme de maturation des ribosomes nécessite plus de 150 protéines nucléolaires et 77 snoRNA (Piekna-Przybylska *et al.*, 2007). Les ARNr 18S, 5.8S et 25S proviennent d'un ARN précurseur de 35S qui a subi de nombreux clivages et modifications chimiques. Ce pré-ARN ribosomique et l'ARNr pré-5S sont codés par deux gènes de l'ADNr qui font ensemble approximativement 9100 paires de bases. Ces 9100 paires de bases sont répétées de 100 à 200 fois sur le chromosome XII (Kressler *et al.*, 1999). Le pré-ARNr 35S est transcrit par l'ARN polymérase I alors que le pré-ARNr 5S est transcrit par l'ARN polymérase III. Chez la levure, le transcrit primaire 35S est tout d'abord clivé en 5' au site A0, suivi de clivages en A1 et A2, ce qui crée les intermédiaires 20S et 27S (Figure 1.1). Le précurseur 20S sera clivé au site D en 3' dans le cytoplasme pour donner naissance au 18S. Le 27S subit des clivages supplémentaires pour produire les 25S et 5.8S

matures (Kressler *et al.*, 1999). Plusieurs nucléotides vont subir des modifications durant la maturation. Au total, on peut compter quarante-cinq sites de pseudouridylations et cinquante-cinq méthylations en 2'OH du ribose (Kressler *et al.*, 1999 ; Maden *et al.*, 1997). Ces modifications seront effectuées par des snoRNA (petits ARN nucléolaires) qui seront couplés à des protéines pour former des complexes actifs nommés snoRNP (petite ribonucléoprotéine nucléolaire) (Reichow *et al.*, 2007).

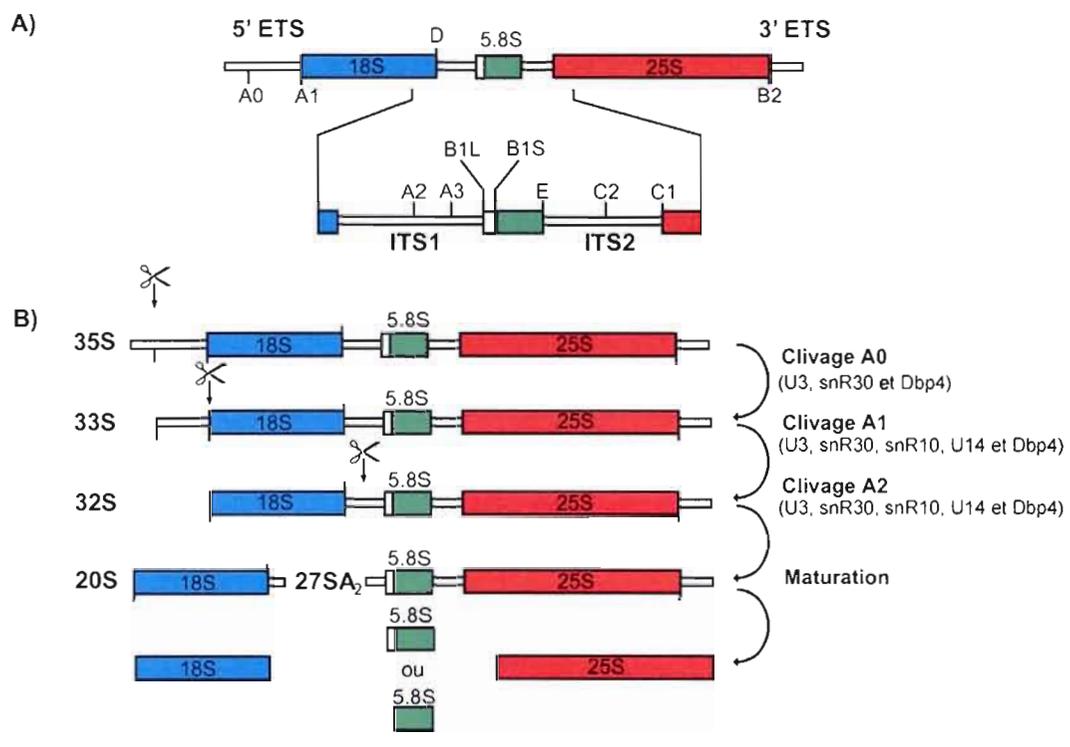


Figure 1. 1 : Maturation du pré-ARNr chez *Saccharomyces cerevisiae*. La structure d'une unité de répétition d'ADNr est présentée en (A). La voie de maturation du pré-ARNr est présentée en (B). Le pré-ARNr 35S subit d'abord des modifications post-transcriptionnelles par des snoRNP C/D et H/ACA. Il y a ensuite un clivage au site A0 qui est dépendant de la snoRNP U3, de la snoRNP snR30 et de Dbp4. Les clivages en A1 et A2 permettent d'obtenir un pré-ARNr 20S et 27S. Dbp4 et les snoRNP U14, U3 et snR30 jouent un rôle important dans ces deux clivages. Le pré-ARNr 20S deviendra de l'ARNr 18S qui fera partie de la petite sous-unité du ribosome. L'ARNr 5.8S et 25S de la grande sous-unité ribosomique vont provenir de la biogénèse du pré-ARNr 27S.

1.1.3 Les petits ARN nucléolaires (snoRNA)

On peut classer les snoRNA en deux familles : la famille à boîtes H/ACA et celle à boîtes C/D. La seule exception connue à ce jour est MRP qui n'entre dans aucune des deux familles (Balakin *et al.*, 1996).

Les membres de la famille à boîte H/ACA sont formés de deux tiges boucles séparées d'une boîte H (ANANNA), le tout suivi d'une boîte ACA en 3'. Les snoRNP H/ACA isomérisent l'uridine en pseudouridine (Ganot *et al.*, 1997; Ni *et al.*, 1997). Les deux exceptions connues de la famille à boîtes H/ACA sont snR30 qui clive en A0, A1 et A2 le pré-ARNr et snR10 qui clive en A1 et A2 en plus de faire la pseudouridylation du 25S à la position 2919 (Morrissey et Tollervey, 1993; Ni *et al.*, 1997; Samarsky et Fournier, 1999; Tollervey, 1987). Ces deux snoRNA possèdent chacun un homologue chez l'humain, soit U17 pour snR30 et ACA21 pour snR10. Le snoRNA du complexe snoRNP se lie à l'ARNr par appariement de bases. Les snoRNA H/ACA sont toujours liés à au moins 4 protéines essentielles : Cbf5, Gar1, Nhp2 et Nop10 (Henras *et al.*, 1998; Watkins *et al.*, 1998). Cbf5 pourrait être la pseudouridine synthase car elle partage une certaine homologie avec une famille de pseudouridine synthase (Koonin, 1996). La famille à boîtes C/D est composée d'un snoRNA où le bout 5' lie l'extrémité 3' par appariement de bases. Les snoRNA C/D possèdent un ou deux groupes de boîtes C et D (Kiss-Laszlo *et al.*, 1996). En complexe de snoRNP, ils lient toujours Snu13, Nop1, Nop56 et Nop58 chez la levure (Ganot *et al.*, 1997; Gautier *et al.*, 1997; Lafontaine et Tollervey, 1999; Wu *et al.*, 1998). Le snoRNA C/D lie aussi le pré-ARNr avec 10 à 20 bases complémentaires à celui-ci. Les snoRNP C/D sont responsables de la méthylation en 2'OH du ribose. Cette méthylation est effectuée en amont de la boîte D et/ou D' (Kiss-Laszlo *et al.*, 1998). Deux snoRNA, U3 (A0, A1 et A2) et U14 (A1 et A2), sont capable d'effectuer des clivages sur le pré-ARNr qui causent la libération de l'ARNr 20S, le précurseur de l'ARNr 18S (Figure 1.1). Ces deux snoRNA sont conservés chez les eucaryotes (Maxwell et Fournier, 1995).

1.1.4 Le snoRNA U3

U3 est essentiel pour les clivages en A0, A1 et A2 (Figure 1.1). Le site de clivage A0 se situe dans le 5' ETS du pré-ARNr et le site A1 se retrouve à la jonction du 5'ETS et de l'ARNr 18S (Figure 1.2) alors que le site A2 se retrouve dans le pré-ARNr 35S entre les

séquences du 18S et du 5.8S. De plus, U3 ne peut pas méthyler l'ARNr contrairement aux autres snoRNA à boîtes C/D (Beltrame *et al.*, 1994; Hughes et Ares, 1991; Samarsky et Fournier, 1999; Tollervey et Kiss, 1997). Dans une expérience de « crosslink » il a été retrouvé lié au 5' ETS du pré-ARNr sur 10 nucléotides qui se sont retrouvés à être essentiels pour l'activité de U3 (Hughes et Ares, 1991; Kass et Sollner-Webb, 1990; Mougey *et al.*, 1993). On retrouve 40 protéines uniques attachées directement ou indirectement à U3 telles les protéines Utp, Sof1 et Mpp10 (Bernstein *et al.*, 2004; Dragon *et al.*, 2002; Dunbar *et al.*, 1997; Jansen *et al.*, 1993).

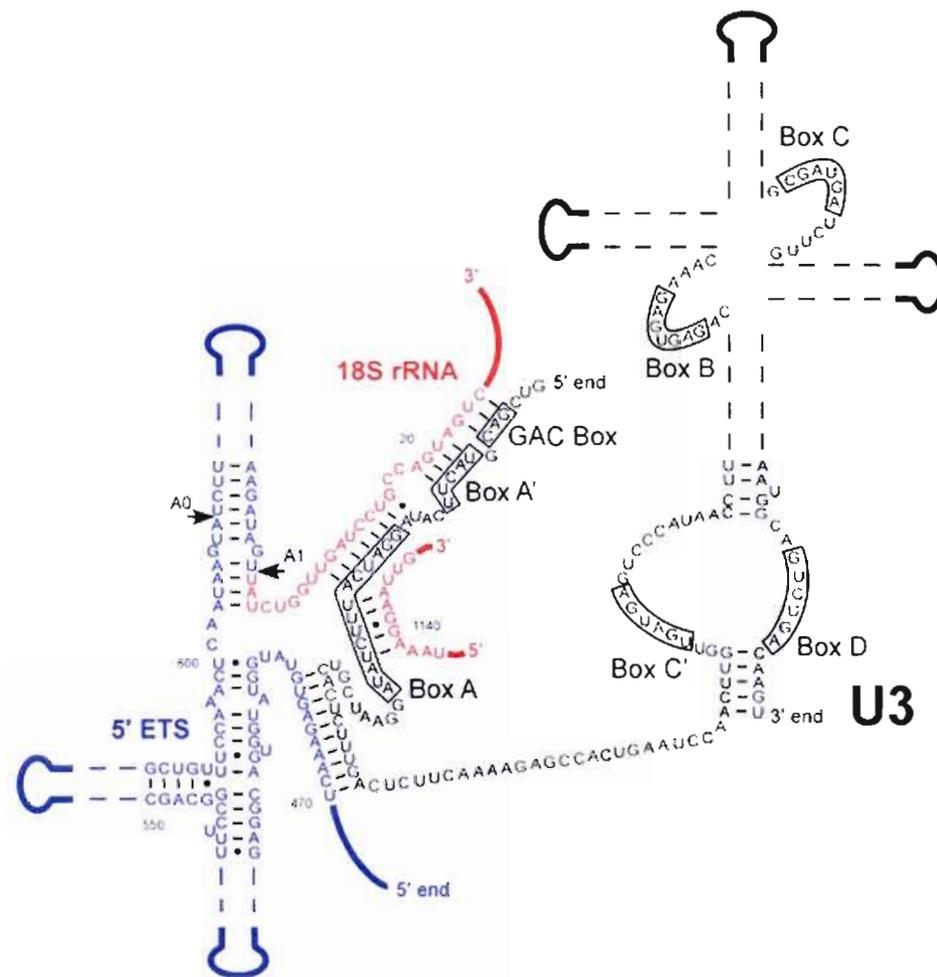


Figure 1.2 : Structure secondaire de U3 et du pré-ARNr 35S. La structure démontre l'interaction de U3 avec le pré-ARNr 35S et son 5'ETS. En noir on peut voir U3. Le bout 5' du pré-ARNr 35S qui va donner l'ARNr 18S est en rouge et le 5' ETS est en bleu. On peut voir les domaines A et A', nommés Box A et A', hybridés avec le pré-ARNr. Adapté de « yeast snoRNA database at UMASS Amherst » (Piekna-Przybylska *et al.*, 2007).

1.1.5 Le snoRNA U14

Le snoRNA U14 est requis pour des clivages en A1 et A2 (Enright *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1990). U14 est aussi capable de guider la méthylation de l'ARNr 18S à la position C414 (Maxwell et Fournier, 1995). Il contient 4 séquences conservées et une tige boucle terminale (Figure 1.3). Deux de ces séquences conservées sont des boîtes C et D qui sont, tout comme la tige boucle terminale 5'/3', essentielles à l'accumulation de U14 (Huang *et al.*, 1992; Li and Fournier, 1992). Les deux autres séquences conservées chez U14 sont les domaines de liaison A et B. Ces domaines de liaison possèdent des bases complémentaires à l'ARNr 18S. Ils ont une taille de 13 et 14 nucléotides, respectivement. Des mutations létales dans le domaine de liaison A peuvent être contrées si on effectue des mutations compensatoires dans l'ARNr 18S au site d'appariement. Ceci impliquerait que U14 interagisse directement avec l'ARNr par des interactions de type "Watson-Crick" (Li *et al.*, 1990; Liang and Fournier, 1995; Trinh-Rohlik and Maxwell, 1988). Dans le snoRNA U14 des levures et des plantes, on peut retrouver un motif en forme de tige boucle nommé domaine Y (Samarsky *et al.*, 1996). Ce domaine de 33 nt chez *Saccharomyces cerevisiae* est fortement protégé des RNases à simple brin et forme donc une tige boucle stable (Balakin *et al.*, 1994). La comparaison de domaines Y de plusieurs homologues de U14 démontre que la taille de la tige boucle n'est pas conservée, mais qu'en revanche la tige-boucle contient 8 nucléotides conservés [ANGAACCAU]. Une mutation ponctuelle sur un des nucléotides 64 à 66 (ACC) a un effet délétère sur la croissance cellulaire. De plus, la mutation de plusieurs de ces trois bases est létale (Liang *et al.*, 1997). La tige-boucle pourrait donc servir de signal de reconnaissance. Il a été prouvé que la délétion du domaine Y empêche la maturation de l'ARNr 18S chez la levure (Li *et al.*, 1990). La surexpression d'une hélicase putative nommée Dbp4 permet cependant de récupérer le phénotype normal chez un mutant avec U14 sans domaine Y. Une mutation létale dans d'autres domaines essentiels de U14 ne peut être contrée par la surexpression de Dbp4 ce qui laisse penser que celle-ci réagit de manière spécifique avec le domaine Y (Liang *et al.*, 1997). Dbp4 semble avoir un rôle à jouer pour séparer U14 et le pré-ARNr. En effet, on peut remarquer que U14 reste fixé au pré-ARNr durant une déplétion de Dbp4 (Kos and Tollervey, 2005).

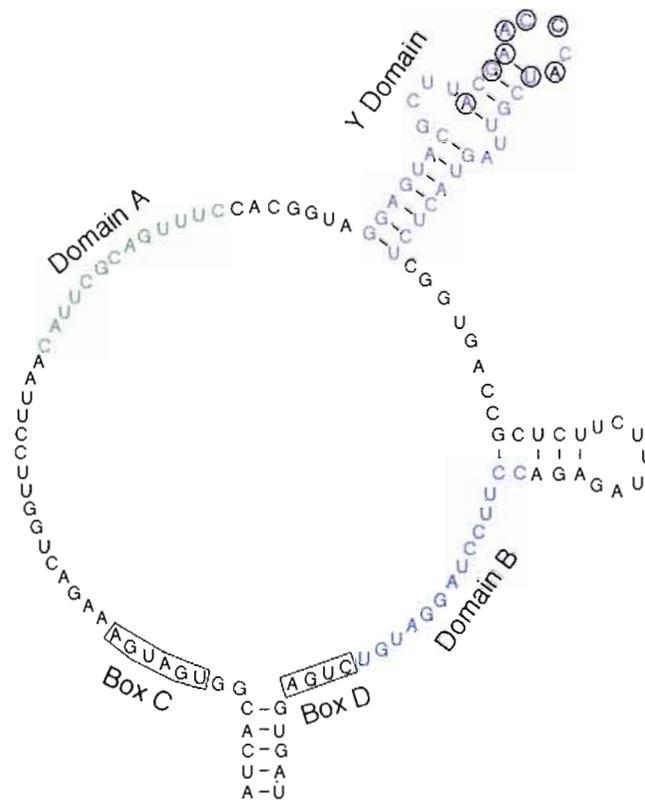


Figure 1.3 : Structure secondaire de U14. La structure démontre les domaines d'interaction de U14. La molécule contient quatre séquences conservées nommées boîte C, boîte D, domaine A (vert) et domaine B (bleu). La molécule contient aussi une structure spécifique repliée en forme de tige boucle qui est essentielle chez la levure qui se nomme domaine Y (mauve). Les boîtes C et D ainsi que la tige terminale sont des éléments essentiels à la production de U14. Les domaines A, B et Y sont nécessaires pour l'activité de U14. Les nucléotides encerclés sont conservés dans 5 espèces de levures.

1.1.6 Les hélicases

Les hélicases sont généralement des protéines qui catalysent la séparation de duplex d'oligonucléotides en simple brin, en utilisant l'hydrolyse de NTP comme source d'énergie. Les gènes qui encodent des hélicases sont très nombreux, autant chez les eucaryotes que chez les procaryotes (Shiratori *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2003). Beaucoup d'hélicases ont une activité ATPasique augmentée en présence d'ARN, mais en général elles ne nécessitent pas un ARN spécifique (Rocak and Linder, 2004). La présence de cofacteur est parfois capitale à leur bon fonctionnement. On peut citer la faible activité ATPasique de eIF4A qui est

grandement accrue en présence de eIF4B (Rogers *et al.*, 2001). Selon des études de cristallographie, les hélicases vont lier un substrat d'ADN ou d'ARN d'environ 8 à 10 paires de bases (Kim *et al.*, 1998; Korolev *et al.*, 1997; Velankar *et al.*, 1999). Plusieurs modèles sont imaginés pour l'activité de déroulement des doubles brins d'oligonucléotides. Dans le premier cas l'hélicase se déplace sur le brin d'oligonucléotide après s'y être liée. On dit de ces hélicases qu'elles sont processives. Un deuxième modèle implique que les hélicases vont déstabiliser le duplex de nucléotides uniquement par leur présence (Rocak et Linder, 2004). Selon un autre modèle récent, une hélicase pourrait aussi avancer par translocation à l'aide d'autres protéines. L'hélicase de ce modèle serait déplacée de la portion d'oligonucléotide qui vient d'être ouverte à une portion qui est encore double brin (Xie, 2006).

1.1.7 Les cinq superfamilles d'hélicases

Les hélicases sont classées en cinq superfamilles (SF) (Gorbalenya and Koonin, 1993). On peut différencier les superfamilles par le nombre de motifs, qui sont parfois présents chez plusieurs familles, et par la séquence de ces mêmes motifs (Gorbalenya and Koonin, 1993). Les hélicases des SF3, SF4 et SF5 se présentent généralement sous forme d'hexamère et proviennent de bactéries ou de virus (Patel and Picha, 2000). Les SF3, SF4 et SF5 ont un seul domaine et contiennent 2 à 5 motifs conservés. Les deux plus grandes superfamilles sont SF1 et SF2 qui contiennent des ARN et ADN hélicases chez les archaeobactéries, eubactéries, eucaryotes et virus. On retrouve habituellement ces hélicases sous forme de monomère ou de dimère et elles sont habituellement constituées de sept motifs et plus. Elles se replient sous la forme de deux domaines liés par un « linker » pour former le centre catalytique de l'hélicase que l'on nomme cœur. Les deux domaines du cœur ont une structure similaire à la protéine RecA (Story and Steitz, 1992). Les domaines sont formés en général de cinq brins bêta et cinq hélices alpha (Cordin *et al.*, 2006) (Figure 1.4). Le cœur de ces hélicases a une taille approximative de 400 acides aminés (Caruthers and McKay, 2002; Tanner and Linder, 2001). Quelques membres des SF1 et SF2 ont été cocrystalisés avec des oligonucléotides et de l'ATP. Dans tous les cas, l'ATP se lie à l'intérieur de la fissure entre les deux domaines et l'oligonucléotide se lie à la base des deux domaines, perpendiculairement à la fissure (Cordin *et al.*, 2006).

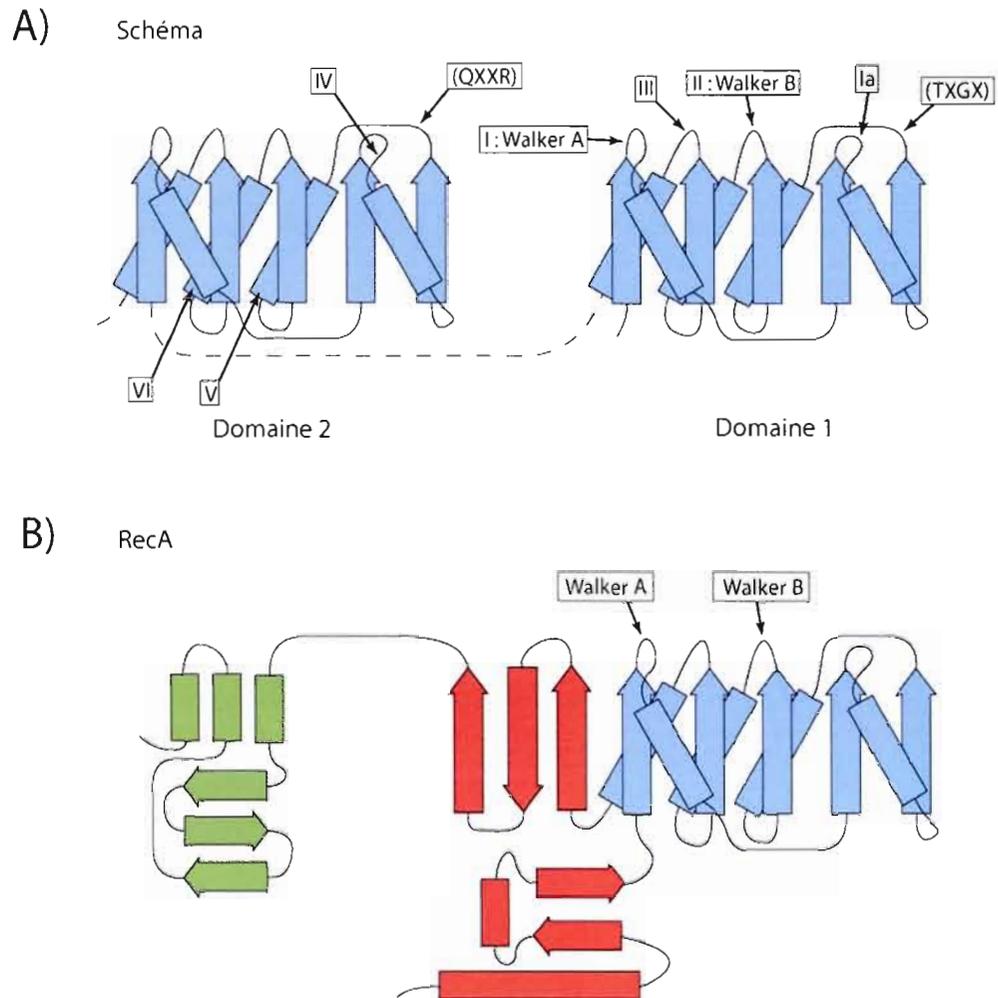


Figure 1. 4 : Structure schématisée des hélicases de la SF1 et SF2. On peut voir le schéma des hélicases des SF1 et SF2 avec les motifs qui sont présents chez ces superfamilles en (A). Les motifs qui sont spécifiques à certains groupes de ces superfamilles sont présentés entre parenthèses. En (B) on peut voir la structure schématisée de RecA. En bleu, le domaine RecA-like des hélicases ; en rouge, les structures variant du domaine RecA-like ; en vert, des domaines structuraux supplémentaires. Les hélices α sont présentées sous forme de rectangles et les brins β sont présentés sous forme de flèches.

1.1.8 Les ARN hélicases DEx(D/H)

Les ARN hélicases de la superfamille 2 (SF2) sont distribuées dans tous les processus utilisant de l'ARN tels la transcription, l'épissage, le transport de l'ARN, la biogénèse du ribosome, l'ARN « editing », la traduction et la dégradation de l'ARN (de la Cruz *et al.*, 1999; Fuller-Pace, 1994; Luking *et al.*, 1998; Tanner and Linder, 2001). Les ARN hélicases

sont aussi appelées ARN hélicases « DEx(D/H)-box » et elles forment la majorité de la SF2 (Cordin *et al.*, 2006). Certaines protéines « DEx(D/H)-box » ont une activité RNase, c'est-à-dire qu'elles déstabilisent des liens protéine-protéine ou protéine-ARN dans les complexes ribonucléoprotéiques, communément appelés RNP (Jankowsky *et al.*, 2001; Lorsch and Herschlag, 1998; Schwer, 2001; Staley and Guthrie, 1998). Dans certains cas on a remarqué que l'activité RNasique pouvait être indépendante de l'activité hélicasique. Donc, il est possible pour certaines protéines DEx(D/H)-box de défaire un complexe protéique lié à un duplex d'oligonucléotide sans dérouler ce duplex (Fairman *et al.*, 2004).

1.1.9 Les protéines « DEAD-box »

C'est en 1982 que eIF4A, la première protéine DEAD-box, fut identifiée comme ayant une activité ATPasique ARN-dépendante (Grifo *et al.*, 1982). Ce n'est que sept ans plus tard que la découverte d'un groupe de NTPases avec des motifs similaires et la caractérisation de plusieurs de ces protéines donnèrent naissance au groupe des protéines DEAD-box (Linder *et al.*, 1989). Contrairement aux protéines DEAH-box qui possèdent peu de préférence entre les différents NTP, les protéines DEAD-box utilisent le plus souvent de l'ATP comme source d'énergie (Kim *et al.*, 1992; Lee and Hurwitz, 1992; Tanner, 2003). On peut retrouver jusqu'à 3999 séquences de protéines DEAD-box dans des bases de données telles que SwissProt et TrEMBL. Sur les 17 ARN hélicases qui jouent un rôle dans la biogénèse du ribosome chez la levure, 14 sont des protéines DEAD-box (Bernstein *et al.*, 2006; de la Cruz *et al.*, 1999; Granneman *et al.*, 2006). Huit de ces protéines DEAD-box ont un rôle à jouer dans la maturation de l'ARNr puisque leur inactivation cause un déficit de sous-unité 40S (Daugeron and Linder, 2001; Granneman *et al.*, 2006; Kressler *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 1997; Venema *et al.*, 1997). La plupart des ARN hélicases DEAD-box montrent peu ou pas d'activité de déroulement lorsqu'elles sont testées *in vitro*. Ceci peut être causé par les conditions utilisées dans les tests ou par le manque de partenaire d'interaction essentielle ou bien par la très grande spécialisation de l'activité hélicasique pour un substrat des enzymes testées. (Cordin *et al.*, 2006). Récemment, la protéine DEAD-box CYT-19 a été décrite comme étant une chaperonne d'ARN mal replié (Mohr *et al.*, 2002). Les protéines DEAD-box pourraient donc servir de chaperonne pour les ARN.

1.1.10 Les motifs des protéines « DEAD-box »

Les protéines DEAD-box possèdent neuf motifs conservés qui forment leur cœur hélicasique (Linder, 2006). Les extensions N- et C-terminales qui flanquent le cœur sont très divergentes et contiennent probablement les séquences responsables de la spécificité pour les substrats et/ou pour diriger la protéine dans différents compartiments cellulaires (de la Cruz *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2003; Wang et Guthrie, 1998). Les neuf motifs ont les séquences consensus présentées dans la Figure 1.5. Le motif Q est unique aux protéines DEAD-box. Il possède un groupement aromatique et une glutamine (Q). Le motif Q et l'acide aminé aromatique ont été proposés comme élément de liaison à l'ATP qui fonctionnerait comme un commutateur moléculaire qui régulerait l'hydrolyse (Tanner, 2003). Les motifs Ia et Ib sont connus pour leurs liaisons au squelette de ribose de l'ARN (Gorbalenya and Koonin, 1993). Les motifs I et II sont aussi connus sous le nom de motifs Walker A et B. Ces deux motifs sont présents chez une grande variété de NTPases et sont nécessaires à la définition d'une hélicase (Tanner and Linder, 2001; Walker *et al.*, 1982). Les deux motifs utilisent un ion de Mg^{2+} pour se complexer à l'ATP. Le motif I forme une structure secondaire en forme de boucle qui peut être ouverte ou fermée et qui lie l'ATP lorsqu'elle est ouverte. Cet état est une conformation typique du motif I retrouvé chez les NTPases en général (Cordin *et al.*, 2006). Le motif II (Walker B) contient un seul résidu aspartate (Walker *et al.*, 1982) mais il est composé deux dans le groupe D-E-A-D. Chez les protéines DEAD-box le deuxième aspartate du motif DEAD lie S et T du motif III par des ponts hydrogènes (Cordin *et al.*, 2006). Le motif II coordonne l'hydrolyse de l'ATP avec une molécule d'eau (Caruthers *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 1982). Le motif III lie le complexe $Mg^{2+} \bullet ATP$ et contribue à la liaison avec l'oligonucléotide. Il associe l'hydrolyse des NTP avec l'activité de déroulement. Les motifs IV et V interagissent avec l'oligonucléotide par le squelette de ribose (Caruthers *et al.*, 2000; Korolev *et al.*, 1998; Lin and Kim, 1999). Le motif VI joue un rôle important en convertissant l'hydrolyse des NTP en mouvement pour les domaines 1 et 2 de l'hélicase. Il peut lier le phosphate γ des NTP (Caruthers *et al.*, 2000; Hall and Matson, 1999; Korolev *et al.*, 1998; Lin and Kim, 1999; Linder *et al.*, 2000; Pause *et al.*, 1993).

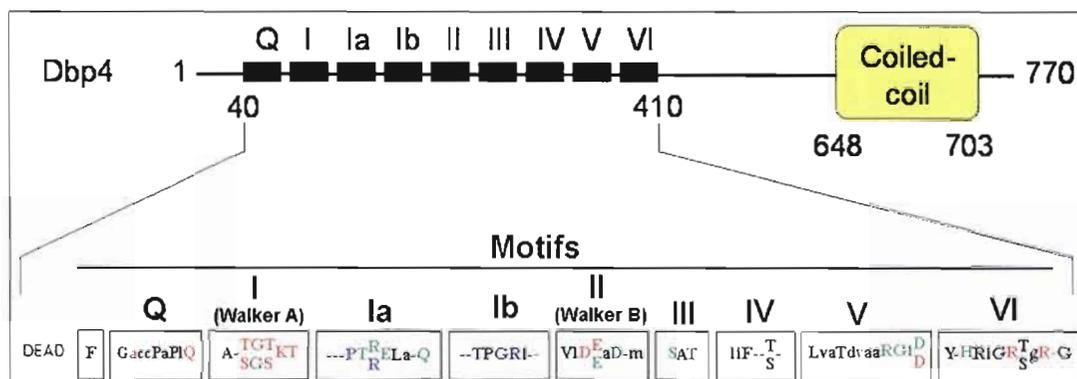


Figure 1.5 : Présentation schématique de Dbp4 et des motifs conservés des protéines DEAD-box. En haut, schéma de Dbp4. En bas, les séquences consensus des motifs des protéines DEAD-box. Les acides aminés conservés qui interagissent avec l'ATP (rouge), l'ARN (bleu) ou qui sont impliqués dans des interactions intraprotéiques (vert) sont présentés. Dans les séquences consensus des motifs, les lettres en majuscule sont conservées dans 80% des cas et plus, et les lettres minuscules représentent des séquences conservées de 50% à 79%.

1.1.11 La « DEAD-box protein 4 » (Dbp4) et ses interacteurs possibles

L'hélicase putative Dbp4 est une protéine DEAD-box de la superfamille 2 ayant une taille prédite de 87 kilodaltons. Dbp4 interagit génétiquement avec le snoRNA U14 (Liang *et al.*, 1997). En effet, une mutation létale dans le domaine Y de U14 va être contrée par la surexpression de Dbp4. Elle est composée d'un cœur hélicasique suivi d'une longue séquence en C-terminal, mais elle a une très courte séquence en N-terminal. Elle possède, en C-terminal, un motif « coiled-coil » qui pourrait être impliqué dans la liaison avec d'autres protéines. Un schéma de Dbp4 est présenté dans la Figure 1.5. Les formes en dimère et en trimère sont les plus courantes liaisons coiled-coil (Liu *et al.*, 2006). Dbp4 et plusieurs autres protéines sont nécessaires pour les clivages de A0 à A2 et une déplétion de Dbp4 cause un défaut dans le clivage du pré-ARNr 35S tout comme la déplétion de U3 (Kos and Tollervey, 2005). Puisque la protéine Dbp4 est essentielle aux clivages en A0 à A2, la caractérisation de celle-ci permettrait d'éclaircir nos connaissances sur la biogenèse et la maturation du pré-ARNr 35S. Dbp4 possède un homologue très conservé chez l'humain qui se nomme DDX10 (Liang *et al.*, 1997). Il est connu que le gène de cette protéine nucléolaire est muté dans certains cancers du sein (Sjoblom *et al.*, 2006). Elle est aussi impliquée dans une leucémie myéloïde causée par une translocation de gènes qui provoque la fusion NUP98-DDX10.

NUP98 est une nucléoporine. La caractérisation de Dbp4 nous permettrait de mieux comprendre les causes de ces cancers et nous donne une nouvelle cible dans les traitements anticancéreux (Xi, 2007). Selon les bases de données YRC (Riffle *et al.*, 2005) et yeast interactome (Collins *et al.*, 2007) les protéines Dbp4, Enp2, Esf1 et Bfr2 interagiraient toutes ensembles. Ces protéines sont impliquées dans la maturation de l'ARNr 18S chez la levure (Peng *et al.*, 2004 ; Bernstein *et al.*, 2004 ; Kos et Tollervey, 2005). La protéine Bfr2 serait possiblement un facteur de croissance présent dans le nucléole (Chabane *et al.*, 1998). Esf1, Enp2 et Bfr2 possèdent toutes des motifs « coiled-coil ». Finalement, Enp2 est une protéine nucléolaire sans fonction précise connue qui contient des répétitions WD40, un motif qui est impliqué dans les interactions protéiques.

1.2 LE PROJET

1.2.1 Hypothèses de travail

La première hypothèse serait que Dbp4, comme plusieurs hélicases, posséderait une activité ATPasique dépendante de la présence d'ARN. Dbp4 fait partie d'un groupe de protéines DEAD-box reconnues comme étant des hélicases. Il a été démontré que U14 et Dbp4 ont un lien génétique (Liang *et al.*, 1997). La déplétion de U3 ou de Dbp4 cause les mêmes défauts de clivage en A0, A1 et A2 (Kos and Tollervey, 2005). Des analyses non publiées de notre laboratoire ont démontré que U3 co-immunoprécipite avec Dbp4. Il est donc possible que Dbp4 utilise U14 et/ou U3 et/ou l'ARN ribosomique 35S comme substrat. Des tests d'activité ATPasique en présence ou non d'ARN total nous permettent donc de déterminer si Dbp4 possède l'une des caractéristiques nécessaires pour la décrire comme une hélicase.

Les ARN hélicases sont constituées d'un cœur hélicasique qui possède des motifs de liaison à l'ATP et à l'ARN. Mis à part ce cœur hélicasique très conservé, les hélicases ont des portions N- et C-terminale très variables. Il est donc logique de penser que ces portions ont un rôle à jouer dans la sélection du substrat ou un impact sur l'activité de l'enzyme. Puisque Dbp4 possède une portion C-terminale très longue, il est probable qu'elle joue un rôle important dans son activité. Afin de déterminer si le domaine C-terminal a un impact sur l'activité de Dbp4, cette portion de l'enzyme sera enlevée et des tests d'activité ATPasique avec le mutant seront effectués.

La troisième hypothèse serait que Dbp4 fonctionne en complexe avec plusieurs protéines. Puisque les ARN hélicases jouent des rôles importants dans des processus nécessitant de gros complexes ARN-protéines, tel que le spliceosome, il est probable que Dbp4 agisse en association avec d'autres protéines. Le domaine C-terminal de Dbp4 pourrait facilement contribuer à donner la spécificité à un substrat et/ou à lier Dbp4 à d'autres protéines, puisqu'il possède un motif « coiled-coil ». Des chromatographies d'affinités suivies d'une analyse en spectrométrie de masse ont démontré que les protéines nucléolaires Bfr2, Enp2 et Esf1 avaient une forte affinité pour Dbp4. Nous allons donc vérifier les interactions de Dbp4 avec les protéines Bfr2, Esf1, Enp2 et Dbp4 en utilisant le système double hybride.

CHAPITRE II - MÉTHODOLOGIE

2.1 SOUCHES ET CONSTRUCTIONS

2.1.1 Souches bactériennes

Les souches nommées BTK3, BTK9, BTK35 et BTK64 nous ont été données par Dr. M.J. Fournier (University of Massachusetts at Amherst, USA). La souche BTK3 est une *E. coli* TOP10F' ($\{lacI^q, Tn10(Tet^R)\}$ *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ$ $\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *araD139* $\Delta(ara-leu)7697$ *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*) contenant un plasmide pET23a(+):T7-Dbp4-6His. Le gène de Dbp4 (2310pb) fut inséré dans les sites *Xho* I en 3' et BamHI/Bcl en 5'. La souche BTK35 est une *E. coli* TOP10F' avec un plasmide pET23a(+):T7-Dbp4 Δ cat-6His. pET23a(+):T7-Dbp4-6His fut tronqué de 1 098 paires de bases au centre du gène de Dbp4 entre les deux sites de restriction *Eco*RI puis les deux extrémités *Eco*RI furent ligasées ensemble pour donner une Dbp4 tronquée. Cette protéine ne possède pas les motifs conservés I à VI et sera utilisée pour produire des anticorps. Les deux souches BTK3 et BTK35 ne servent qu'à maintenir le plasmide. Il est à noter que le plasmide pET23a(+) de Novagen contient un gène de résistance à l'ampicilline pour permettre sa sélection. Les souches BTK9 et BTK64 sont des *E. coli* BL21 pLysS (F⁻ *ompT* *hsdS_B*(r_B⁻m_B⁻) *gal* *dcm* (DE3) pLysS (Cam^R)) qui vont être utilisées pour exprimer les protéines recombinantes. La souche BTK9 possède la version complète de Dbp4 qui provient de pET23a(+):T7-Dbp4-6His alors que la souche BTK64 possède la version tronquée de Dbp4 (nommé Dbp4 Δ cat) qui provient de pET23a(+):T7-Dbp4 Δ cat-6His. Les deux souches ont un plasmide pLysS qui réduit l'expression basale du gène possédant un promoteur T7 dans nos constructions et qui possède un gène de résistance pour le chloramphénicol.

2.1.2 Constructions

Les ORF de *DBP4*, *ESF1*, *ENP2* et *BFR2* ont été insérés individuellement au site de restriction *Xma*I et *Xho*I du plasmide pGEX-4T1. Pour ce faire, les gènes ont été amplifiés par PCR avec les amorces suivantes : 5'- CCC CCC GGG TAT GGC CAA AAA AAA TAG ATT GAA -3' pour *DBP4-Xma*I ; 5'- CCG CTC GAG TTA ACC ATG GAT TAA TTT AGC TGT C -3' pour *DBP4-Xho*I ; 5'-CCC CCC GGG TAT GGC TGG AGA GAA CCC

AAA GAA G -3' pour *ESF1-XmaI* ; 5'-CGC CTC GAG AAC CTT TAC CTT CTT GGA TGA TTT GCT TT-3' pour *ESF1-XhoI* ; 5'-CCC CCC GGG TAT GGT TTT GAA ATC TAC TTC CGC AAA TG-3' pour *ENP2-XmaI* ; 5'- CGC CTC GAG CAT ACC ACG GAA CGC ATT TTT G -3' *ENP2-XhoI* ; 5'- CCC CCC GGG TAT GGA AAA ATC ACT AGC GGA TCA AAT TTC C -3' pour *BFR2-XmaI* et 5'- CGC CTC GAG ACC AAA GAT TTG GAT ATC ATC GTT TTT AAC -3' pour *BFR2-XhoI*. Tous les plasmides créés à partir de l'amplification des gènes par PCR ont été séquencés afin de vérifier que leurs séquences étaient justes. Les constructions avec pGEX-4T1 ont toutes été exprimées dans Rosetta DE2 pLysS (Novagen). pGEX-4T1 permet d'obtenir des protéines de fusion avec GST qui peuvent être purifiées par chromatographie d'affinité. Des tests d'interaction double hybrides entre Dbp4, Esf1, Enp2 et Bfr2 ont été effectués. Nous avons utilisé les plasmides pGADT7 et pGBKT7 de Clontech. pGBKT7::Dbp4 fut construit durant des expériences préalables et la construction est décrite dans un mémoire de l'UQÀM (Ba, 2007). Les constructions pGADT7::Dbp4, pGADT7::Enp2, pGADT7::Esf1 et pGADT7::Bfr2 ont été sous-clonées à partir des plasmides pGEX contenant le gène désiré en utilisant les mêmes sites de restriction *XmaI* et *XhoI*. Les constructions avec pGBKT7 et pGADT7 ont été exprimées dans *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80ΔLYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3*, *GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*, *URA3::MEL1 UAS-MEL1 TATA-lacZ*, *MEL1*). Un mutant de Dbp4 sans le domaine C-terminal fut créé en clivant le plasmide pET23a(+):T7-Dbp4-6His au site *BamHI* et *XhoI*. Par la suite le plasmide linéaire contenant Dbp4 sans le domaine C-terminal fut purifié sur un gel d'agarose et recueilli grâce à un « QIAquick Gel Extraction Kit » de QIAGEN. Deux oligonucléotides phosphorylés partiellement complémentaires ont été ajoutés avec le plasmide linéaire. Les oligonucléotides utilisés sont 5'- GAT CCA GGA GGA GGA C -3' et 5'- TCG AGT CCT CCT CCT G -3'. Lorsque ces oligonucléotides sont appariés, ils créent un site *BamHI* et un site *XhoI*. Le duplex peut être inséré dans le plasmide linéarisé et le tout est ligasé pour former le plasmide pET23a(+):T7-Dbp4ΔCterm-6His qui fut séquencé pour vérifier la séquence. Ce plasmide a ensuite été transformé dans des Rosetta DE2 pLysS par choc thermique tel que détaillé dans Ausubel *et al.* (1999). L'induction de ce plasmide permet d'obtenir la protéine nommée Dbp4ΔCterm.

2.2 PURIFICATION DE PROTÉINES

2.2.1 Méthode de préparation des extraits bactériens

Pour exprimer et extraire une protéine, nous allons effectuer les étapes suivantes. À partir d'une pré-culture, un litre de milieu de culture LB (Bacto-tryptone 1%, « Yeast extract » 0.5% et NaCl 1%) contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 50 µg/ml de chloramphénicol est incubée avec agitation à 37 °C afin d'avoir une densité optique de 0.600 à 600 nm. Les antibiotiques sont utilisés pour maintenir les plasmides dans la cellule. Le chloramphénicol maintient le plasmide pLysS et l'ampicilline maintient le plasmide contenant le gène de la protéine d'intérêt. La production de protéine est induite dans la culture à des conditions optimisées, soit avec 0.5 mM IPTG et la culture est incubée trente minutes à 30°C. Après l'induction, les cellules sont sédimentées en centrifugeant à 7700×g durant dix minutes à 4 °C. Le surnageant est jeté et les cellules sont resuspendues dans 10 ml de tampon d'extraction TMN300 froid (25 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 1 µM de pepstatine et cocktail d'inhibiteurs de protéase Complete® sans EDTA de Roche) pour 1 litre de milieu induit. La suite des manipulations est effectuée à 4°C. Les cellules sont brisées par sonication durant quinze secondes avec quinze secondes d'intervalle entre les huit sonications qui sont effectuées à puissance 7 (26 watts) sur un Sonic Dismembrator Model 100 de Fisher. L'extrait est centrifugé à une vitesse de 17000×g durant dix minutes afin de se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant est recueilli et placé dans un autre tube de 50 ml. L'extrait bactérien contenant la protéine de fusion d'intérêt est filtré avec des filtres 0.45 µm.

2.2.2 Purification de protéines de fusion 6His par chromatographie d'affinité.

Les protéines de fusion avec un 6His sont purifiées avec cette méthode. L'extrait filtré est injecté dans une « superloop » de chargement de 50 ml. L'appareil utilisé est un FPLC AKTApurifier de Amersham. Tous les tampons utilisés ont été filtrés et dégazés avant leur utilisation. On utilise une colonne NiNTA superflow 1 ml de QIAGEN pour la purification des protéines de fusion avec 6His. Le chargement de l'extrait est effectué à 0.4 ml/minute suivi d'un lavage avec 15 ml de tampon (25 mM Tris-HCl pH7.5 , 10 mM MgCl₂, 300 mM NaCl et 30 mM imidazole). La protéine d'intérêt est ensuite éluée à 0.1 ml / minute avec 6 ml

de tampon d'éluion (25 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂, 300 mM NaCl et 300 mM imidazole) et l'éluât est récupéré en fraction de 500 μ L avec un collecteur de fraction Frac-950 de Amersham. Les fractions contenant le pic d'absorbance de protéine dans le chromatogramme seront rassemblées dans un seul tube. On ajuste à 15% de glycérol l'éluât afin d'augmenter sa stabilité, puis on fait un dosage protéique de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) et on congèle l'éluât par aliquot de 50 μ L à -80°C.

2.3 ANALYSE DE PROTÉINES

2.3.1 SDS-PAGE

Pour l'analyse de protéines, les échantillons à analyser sont mélangés 5 : 1 dans une solution de bleu de chargement 6X (0.3 M Tris-HCl pH 6.8, glycérol 60%, SDS 12%, 2-mercaptoéтанол 30%, Bleu de bromophénol 0.003%). Les échantillons sont bouillis cinq minutes. Chaque échantillon est déposé dans un puit d'un gel de polyacrylamide 10% (acrylamide : bis-acrylamide, 37.5 :1) et les protéines sont séparées avec un courant de 200 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel. La migration est faite dans du tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM glycine, sodium lauryl sulfate 0.1% (SDS)) et le système d'électrophorèse Mini-Protean 3 de Bio-Rad est utilisé. Ici le gel peut être coloré ou utilisé pour faire un immunobuvardage. Pour la coloration des gels au bleu de Coomassie R-250 on laisse tremper celui-ci deux heures dans du colorant de Coomassie (méthanol 45%, acide acétique 10% et Coomassie brillant blue R-250 0.05%) puis on décolore le gel avec une solution de décoloration (méthanol 45%, acide acétique 10%) jusqu'à ce que le gel soit clair et que seules les bandes soient colorées. Les colorations au Coomassie seront effectuées essentiellement pour vérifier que les purifications ont bien fonctionné et s'assurer de la pureté des protéines désirées.

2.3.2 Immunobuvardage

Pour l'immunobuvardage, un gel SDS et une membrane de PVDF, préalablement traitée trente secondes au méthanol, seront trempés durant trente minutes dans du tampon Towbin (25 mM Tris, 192 mM glycine pH 8.5 et méthanol 20%). Les protéines du gel sont transférées sur la membrane dans un appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-

Blot durant vingt minutes à 20 volts. Par la suite on colore le gel au Coomassie afin de s'assurer que toutes les protéines ont été transférées sur la membrane. La membrane est ensuite incubée 1 heure dans 5% de lait en poudre dans du TBS-Tween (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 136.8 mM NaCl, Tween 0.2%) afin de saturer les sites non spécifiques. Ensuite on laisse incuber la membrane durant une heure dans du lait 5%/TBS-Tween avec l'anticorps qui lie la protéine que nous désirons détecter. Pour les protéines de fusion avec un 6His nous utilisons un anticorps α -6His couplé à une peroxydase à une dilution de 1 pour 40 000 (Qiagen). Après l'incubation avec l'anticorps, la membrane est lavée trois fois durant dix minutes avec du TBS-Tween. Dans le cas où l'on utilise un anticorps qui est directement couplé à une peroxydase, on fait le traitement au ECL-Plus et la révélation immédiatement avec la trousse d'immunofluorescence ECL-Plus (GE Healthcare) selon le protocole du manufacturier. Si le premier anticorps n'est pas couplé à une peroxydase, la membrane est par la suite incubée une autre heure dans du lait 5%/TBS-Tween avec un anticorps secondaire couplé à HRP qui reconnaît le premier anticorps. Une seconde série de lavages est effectuée après l'incubation. La membrane est ensuite traitée avec la trousse d'immunofluorescence ECL-Plus (GE Healthcare) selon le protocole du manufacturier. Les membranes traitées au ECL-Plus sont révélées avec des films à autoradiographie.

2.4 INTERACTIONS PROTÉIQUES

2.4.1 Transformation de levures

Dans 300 ml de YPD stérile (yeast extract 1%, peptone 2% et dextrose 2%) une culture de *S. cerevisiae* d'une D.O. de 0.25 à 600 nm est incubée trois heures à 30 °C avec agitation. Le tout est par la suite centrifugé à 1000×g durant cinq minutes et le surnageant est jeté. Le culot de cellule est resuspendu dans 50 ml d'eau stérile. On centrifuge à nouveau et on jette le surnageant. On resuspend les cellules dans 1.5 ml de TE/LiAc (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA et 100 mM acétate de lithium). À 100 μ l du mélange de levures on ajoute 600 μ l de PEG/LiAc (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM acétate de lithium et PEG 4000 6.25%), 100 μ g de HSS (ADN concassé) et 0.1 μ g de chaque plasmide à transformer. Le mélange est incubé 30 minutes à 30°C avec agitation (200 rpm). Ensuite, on ajoute 70 μ l de DMSO et on mélange. Le mélange est incubé à 42°C durant quinze minutes afin de causer

un choc thermique aux levures. Après l'incubation, les cellules sont placées sur glace durant dix minutes. Afin de sédimenter les cellules on centrifuge cinq secondes à 10 000 ×g et le surnageant est jeté. Les cellules sont resuspendues dans 500 µl de TE (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) et 100µl sont étalés sur une plaque contenant le milieu SD -Leu -Trp constitué de 1.7 g/L de YNB, 5 g/L sulfate d'ammonium, 20 g/L de dextrose, 20 g/L d'agar et une mixture d'acides aminés désirés (« drop out mix » de Clontech). Les plaques sont incubées à 30°C jusqu'à l'apparition de colonies.

2.4.2 Test d'interaction protéine-protéine

Ce test utilise le système du double hybride qui permet d'identifier des partenaires d'interaction entre protéines (Bartel et al, 1993). Le système utilise le facteur de transcription GAL4 qui est capable d'activer la transcription des gènes de sélection *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* et *LacZ* chez *S. cerevisiae* AH109. Le facteur de transcription GAL4 est séparé en deux domaines : le domaine d'activation (AD) et le domaine de liaison à l'ADN (BD). La portion du gène de GAL4 codant pour le domaine d'activation est présente chez le plasmide pGADT7 (la proie) qui possède aussi un gène de sélection *LEU2*. La portion du gène de GAL4 codant pour le domaine de liaison à l'ADN est présente chez le plasmide pGBKT7 (l'appât) qui possède aussi un gène de sélection *TRP1*. Chaque plasmide a un site de clonage multiple qui permettra d'obtenir des protéines de fusion avec les domaines AD ou BD selon le plasmide. Après une transformation des deux plasmides dans AH109 les clones sont sélectionnés par étalement sur un milieu sélectif -Trp et -Leu. Ensuite, on ensemence quatre transformants sur une plaque de milieu minimal sans tryptophane, leucine et histidine. Si la protéine de fusion proie-BD et la protéine de fusion appât-AD interagissent ensemble alors les deux domaines de GAL4 seront à proximité l'un de l'autre et le domaine de liaison va lier l'ADN et le domaine d'activation va démarrer le transcription des gènes rapporteurs ce qui permettra à la levure de croître sur un milieu sélectif. L'ajout de 3-AT (3-aminotriazole) permet de diminuer le bruit de fond du gène rapporteur *HIS3*. Les protéines qui ont été utilisées pour faire le double hybride sont Dbp4, Esf1, Enp2 et Bfr2. La protéine appât qui sera utilisée sera Dbp4. Les protéines proies qui seront testées sont Dbp4, Esf1, Enp2 et Bfr2. On pourra ainsi savoir quelles protéines sont capables de lier Dbp4.

2.5 TEST ENZYMATIQUE

2.5.1 Préparation d'ARN total de levures.

L'ARN qui est utilisé dans les tests d'activité ATPasique doit être relativement pur. Puisque Dbp4 est une protéine de levure, l'ARN total que nous avons utilisé provient de la levure *S. cerevisiae* YPH499 (*MATa ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*). La préparation d'ARN de levure par la méthode au phénol acide chaud permet d'obtenir de l'ARN total. La procédure est détaillée dans Ausubel *et al.* (1999).

2.5.2 Dosage de phosphate avec un test colorimétrique à base de vert de malachite.

Afin de quantifier le phosphate inorganique en solution nous avons utilisé une méthode adaptée de Harder *et al.* (1994) qui permet de doser le phosphate inorganique en solution. Le réactif est composé d'ammonium molybdate, de vert de malachite et de Tween-20, le tout à très bas pH. Ce mélange va former un complexe en présence de phosphate inorganique qui sera visible à 620 nm. Pour 100 µl de solution enzymatique, on ajoute 1 ml de solution-stop colorimétrique BIOMOL GREEN™ (Biomol International) qui va arrêter la réaction enzymatique et colorer la solution selon la quantité de phosphate inorganique en solution. Pour chaque tube de réaction enzymatique, on doit faire un blanc en même temps, sans enzyme, avec 100 µl de solution. Le blanc doit être effectué pour chaque tube car le temps d'incubation, la température, le pH et la concentration de produits en solution peuvent avoir un impact sur le test colorimétrique. Après l'ajout du réactif colorimétrique, on laisse incuber 30 minutes à température pièce puis on effectue le zéro d'absorbance à 620 nm à l'aide du blanc. Puis on fait une lecture de l'absorbance de notre test colorimétrique de la réaction enzymatique à 620 nm. Le coefficient d'extinction molaire est calculé à l'aide d'une courbe standard de Pi. Pour chaque point de la courbe standard, une quantité de Pi dans 100 µl de tampon est testée avec le test colorimétrique.

2.5.3 Test d'activité ATPasique

Afin de caractériser l'activité ATPasique de Dbp4 et de vérifier si l'activité ATPasique est dépendante de l'ARN nous avons effectué des tests enzymatiques en dosant le phosphate inorganique en solution. Pour ce faire, dans des tubes contenant un volume final de 40 µl de

tampon TMN100 (50 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) nous avons utilisé 1 µg (5.8 pmol) d'enzyme Dbp4 purifiée. Le même nombre de tubes est utilisé pour les tests avec et sans enzyme. Les tubes sans enzyme sont utilisés pour faire les blancs. Pour commencer la réaction enzymatique nous avons ajouté 60 µl de TMN100 contenant 1mM d'ATP. Il est à noter que tous les tubes sont incubés à 30°C pour les expériences initiales, jusqu'à ce que la température optimum soit déterminée. La réaction enzymatique est incubée durant trente minutes à moins qu'il n'en soit spécifié autrement. Par la suite, la réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de 1 ml de la solution stop colorimétrique BIOMOL GREEN™. Par l'ajout de la solution stop, on commence un test colorimétrique afin de doser le Pi libéré en solution par la dégradation de l'ATP. Les premiers tests seront faits avec une quantité croissante d'ARN total en solution afin de voir l'impact de l'ARN sur l'activité ATPasique. Si l'activité ATPasique de Dbp4 est dépendante de la présence d'ARN, on pourra observer une plus grande activité lors de l'ajout d'ARN à la réaction enzymatique. Ensuite des tests d'activité ATPasique avec une quantité constante d'ARN total ont été faits et nous avons fait varier le pH ou la température afin de trouver le pH, le tampon et la température optimale pour l'activité ATPasique. Finalement, nous avons fait un test d'activité ATPasique avec et sans ARN total en faisant varier le temps d'incubation de la réaction enzymatique. Tous ces tests ont été effectués en duplicata à plusieurs reprises.

2.5.4 Détermination du pH et de la température optimum

Des tests d'activité ATPasique seront effectués afin de trouver le pH optimum de l'activité ATPasique de Dbp4. Pour ce faire, nous avons effectué un test d'activité ATPasique avec de l'ARN avec une incubation de trente minutes, mais à différents pH. Le point isoélectrique prédit de Dbp4 est de 7.44. Trois tampons ont été utilisés dans le but de trouver le pH optimum et le tampon qui donne l'activité ATPasique la plus haute. Les pH de 7 à 8 sont testés avec un tampon HMN100 (50 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl). Les pH 6 à 8 ont été testés avec un tampon TMN100 (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl). Le pH 7.5 à 9 ont été testés avec un tampon TMMN100 (50 mM Tris-maléate, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl). Par la suite, nous avons effectué différents tests d'activité ATPasique avec de l'ARN au pH et tampon optimaux avec une incubation de 30 minutes. Cependant, nous avons fait varier la température d'incubation de 16 à 50°C. Ces tests ont été effectués en

duplicata à plusieurs reprises. Tous les tests ATPasiques qui ont été effectués après l'optimisation utilisent le pH et la température optimale trouvée ici.

2.6 PRODUCTION D'ANTICORPS

2.6.1 Coloration inversée

Pour faire un anticorps anti-Dbp4 nous avons purifié la protéine Dbp4 Δ cat. Cette protéine ne possède pas le cœur hélicasique présent chez les hélicases DEAD-box. Un anticorps contre cette protéine ne devrait reconnaître que Dbp4. Tout d'abord, Dbp4 Δ cat fut purifiée par chromatographie d'affinité avec une colonne NiNTA superflow 1 ml. Ensuite, l'éluât a été fractionné par un gel SDS préparatif. Afin de voir les bandes de protéines dans le gel nous avons effectué une coloration inversée. Cette méthode nous permet de colorer tout le gel, à l'exception des endroits où l'on retrouve des protéines. Pour ce faire, le gel est immergé dans une solution de 1% de carbonate de sodium durant cinq minutes. Puis il est laissé dans une solution de 0.2M d'imidazole et de 0.1% SDS. La solution est jetée après quinze minutes et le gel est rincé dans de l'eau. Le gel est finalement trempé dans une solution de 0.2M ZnSO₄ durant trente secondes. Les bandes de protéine contenant Dbp4 Δ cat ont été préalablement identifiées par spectrométrie de masse au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill. La bande ne contenant que la protéine Dbp4 Δ cat est ensuite découpée du gel.

2.6.2 Purification de Dbp4 Δ cat par électroélution

L'appareil utilisé pour l'électroélution est un Electro-eluter Model 422 (Bio-Rad). Les bandes de gel contenant la protéine Dbp4 Δ cat ont été coupées pour faire des morceaux d'au plus 1 cm. Ces morceaux ont été placés dans l'électroéluteur. La protéine fut éluee durant quatre heures et demi dans un tampon d'élution (25 mM Tris-base, 192 mM Glycine et SDS 0.1%). Après ce temps, le tampon d'élution fut changé afin d'enlever le SDS. L'élution a continué dans le nouveau tampon d'élution (25 mM Tris-base, 192 mM Glycine) durant trois heures et demi. L'éluât fut recueilli puis concentré en utilisant des filtres Microcon YM-10 de Millipore.

2.6.3 Production d'anticorps de lapin.

Tout d'abord, deux lapins femelles NewZealand white furent utilisés pour la production de l'anticorps contre Dbp4. Les anticorps furent produits selon les spécifications du service d'immunisation de l'animalerie de l'UQAM. Un aliquot de sang avant l'immunisation a été recueilli afin de vérifier que les lapins ne possèdent pas déjà des anticorps. Il y a eu une immunisation le jour 1, 21, 42, 70 et 98. Des prélèvements de sang ont été pris les jours 0, 31, 52, 80, 108 et 118. Les lapins furent exsanguinés le jour 118.

2.6.4 Méthode de préparation des extraits de levures.

Une culture de 100 ml de *S. cerevisiae* W303 (*MATa/MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15} [phi⁺]*) est incubée dans du milieu YPD jusqu'à ce que la culture aie une D.O. de 0.6 à 600 nm. Le tout est centrifugé à 2000×g pendant cinq minutes. Le culot est resuspendu dans l'eau stérile froide puis centrifugé à nouveau à 2000 ×g pendant cinq minutes. Cette étape est répétée une seconde fois, puis les cellules sont resuspendues dans 500 µL de tampon d'extraction TMN100 froid (25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 µM de pepstatin et cocktail d'inhibiteur de protéase Complete® de Roche, pH7.5). 100 µl de bille de verres de 400 à 625 microns (Sigma) sont ajoutés. Le tout est passé au vortex durant quarante-cinq secondes puis placé sur glace quarante-cinq secondes. Cette étape est répétée huit autres fois. On se débarrasse des débris cellulaires par une centrifugation de dix minutes à 17000 ×g à 4 °C. Le surnageant recueilli contient la protéine Dbp4 natif et il est utilisé comme extrait pour le test de titrage de l'anticorps de lapin anti-Dbp4.

2.6.5 Vérification du titre de l'anticorps anti-Dbp4.

Afin de vérifier la présence de l'anticorps et son titre, un gel SDS avec une piste préparatif de 5 cm a été effectué avec un extrait de levure représentant 30 D.O. Les protéines du gel ont été transférées sur une membrane de PVDF. Par la suite, la membrane de PVDF a été placée dans un Mini-Protean II Multiscreen de BIO-RAD et chaque piste a été mise en présence de différentes concentrations de sérum contenant l'anticorps primaire. Par la suite, la membrane fut traitée comme un immunobuvardage normal. Les sérums de chaque prélèvement sanguin des deux lapins ont été testés. Pour les sérums pré-immuns du lapin A et B, une dilution de

1/100 a été utilisée avec du TBS-Tween avec 5% de lait en poudre. Pour les quatre prélèvements sanguins de chaque lapin, une dilution de 1/100 a aussi été utilisée. Pour le sang recueilli durant l'exsanguination des deux lapins des dilutions de 1/100, 1/500 et 1/2500 ont été testés. Le sérum est dilué dans du TBS-Tween avec 5% de lait en poudre. Par la suite, la membrane est traitée comme un immunobuvardage normal. L'anticorps secondaire utilisé est un anti-IgG de lapin couplé à HRP de GE Healthcare à une dilution de 1/100 000.

CHAPITRE III - RÉSULTAS

3.1 Expression de Dbp4 et Dbp4 Δ Cterm.

Les protéines Dbp4 et Dbp4 Δ Cterm exprimées dans la bactérie furent purifiées par chromatographie d'affinité afin d'effectuer des tests d'activité ATPasique. Des aliquotes de l'extrait, du « flow-through » (FT), du lavage et de l'éluât ont été analysés à l'aide d'un SDS-PAGE coloré au Coomassie et d'un immunobuvardage pour 6His (Figure 3.1). La différence entre l'extrait et le FT pour la purification de Dbp4 n'est pas visible indiquant que la majorité des protéines n'est pas retenue sur la colonne. Le tampon de lavage de la purification de Dbp4 contient une faible quantité de protéines à 100 kDa. L'éluât de Dbp4 contient une bande à 100 kDa dans le SDS-PAGE, tout comme sur l'immunobuvardage. Le poids prédit de Dbp4 est de 87 kDa, cependant la protéine possède une section riche en glutamine qui est un acide aminé acide qui peut ralentir la migration de la protéine dans un SDS-PAGE. Cette bande sur le gel coloré au Coomassie et l'immunobuvardage à 100 kDa représente donc Dbp4, à moins qu'il y ait comigration de Dbp4 avec une autre protéine. Quelques autres bandes sont visibles plus bas dans l'éluât dans le gel coloré au coomassie mais la majorité ont une bande équivalente sur l'immunobuvardage ce qui suggère que se sont des bandes de dégradation de la protéine Dbp4. Les résultats suggèrent que la protéine isolée Dbp4 est relativement pure. La purification de Dbp4 Δ Cterm est présentée dans la Figure 3.1 B. La différence entre l'extrait et le FT pour la purification de Dbp4 Δ Cterm n'est pas visible indiquant que la majorité des protéines n'est pas retenue sur la colonne. Le tampon de lavage de la purification de Dbp4 Δ Cterm contient une grande quantité de protéines que l'on ne retrouve pas dans l'éluât. L'éluât de Dbp4 Δ Cterm contient une bande à approximativement 49 kDa qui est présente sur le gel coloré au Coomassie et sur l'immunobuvardage. La protéine Dbp4 Δ Cterm fut délétée d'approximativement 55% de ses acides aminés et son poids prédit est de 49 kDa. Cette bande à approximativement 49 kDa représente donc Dbp4 Δ Cterm, à moins qu'il y ait comigration de Dbp4 Δ Cterm avec une autre protéine. Quelques autres bandes sont visibles plus haut dans l'éluât dans le gel coloré au Coomassie et aucune de ces bandes n'est présente sur l'immunobuvardage ce qui laisse supposer que se sont des bandes de protéines contaminantes. Cependant, on peut toutefois conclure que la pureté de la protéine Dbp4 Δ Cterm est bonne, car l'intensité de la bande à 49 kDa est en très forte.

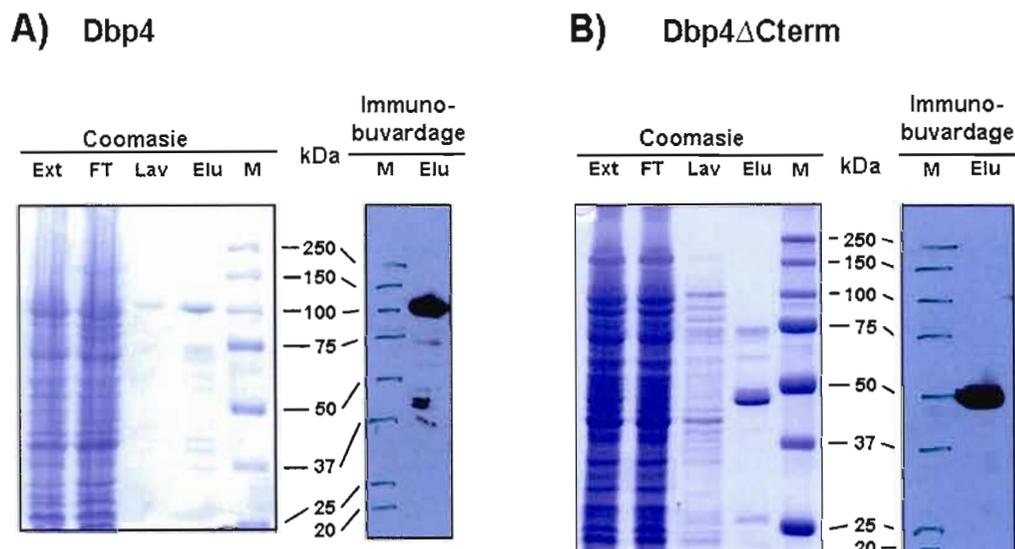


Figure 3.1 : Purification de Dbp4 et Dbp4 Δ Cterm par chromatographie d'affinité. Pour chaque section (A et B) on retrouve à gauche un SDS-PAGE 10 % coloré au Coomassie et à droite un immunobuvardage pour 6His. Ext : 0.1% de l'extrait bactérien ; FT : 0.1% du « flow through » ; Lav : 0.07% du lavage ; Elu : 0.07 % de l'éluât et M : standard de poids moléculaire. A) Purification de Dbp4. B) Purification de Dbp4 Δ Cterm.

3.2 Quantité d'ARN total pour l'optimisation de l'activité ATPasique.

Pour débiter, nous avons effectué un test d'activité ATPasique avec une quantité croissante d'ARN total de levure (Figure 3.2). Ce test initial nous permet de connaître la quantité ARN total à utiliser pour avoir une activité ATPasique maximale durant l'optimisation des conditions. La réaction enzymatique est effectuée dans du tampon TMN100 (25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH7.5) et l'incubation est faite à 30°C pendant trente minutes. Il est présenté en absorbance par rapport à la quantité d'ARN total utilisée pour chaque point. On remarque que l'activité ATPasique augmente jusqu'à un plateau d'activité maximale qui se situe de 10 à 30 μ g d'ARN total. À plus de 30 μ g d'ARN total de levure, le test colorimétrique perd de sa précision et son exactitude car il y a apparition de précipité qui fausse la lecture (résultats non présentés).

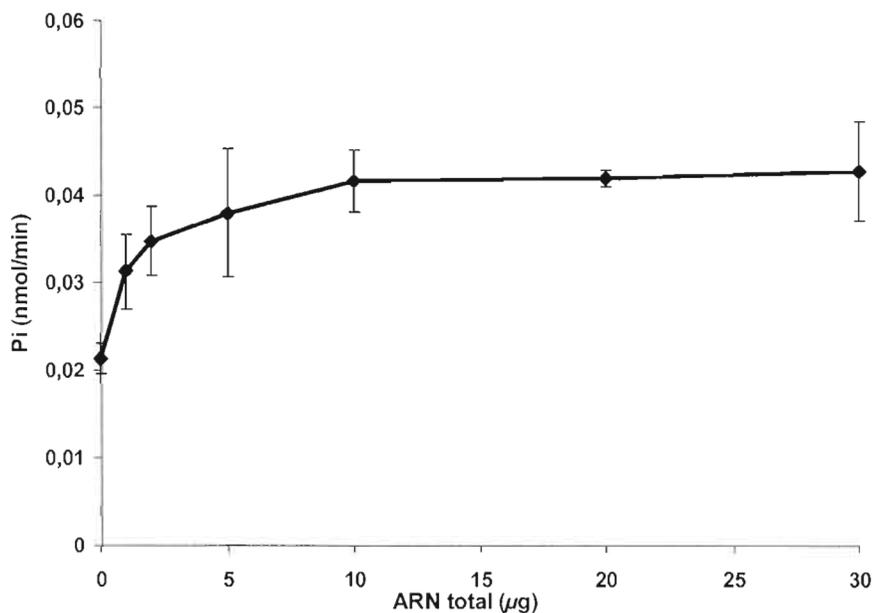


Figure 3.2 : Quantité d'ARN total nécessaire à l'obtention d'une activité ATPasique maximale. Des tests d'activité ATPasique de Dbp4 sont faits avec différentes quantités d'ARN total de levure avec 1 µg (5.8 pmol) d'enzyme Dbp4. Les réactions enzymatiques sont incubées trente minutes à 30 °C et à pH 7.5 dans du TMN100.

3.3 Détermination du pH optimum

Des tests ATPasiques ont été effectués avec une nouvelle préparation de Dbp4 à différents pH dans du tampon à base d'HEPES, de Tris-HCl ou de Tris-maléate respectivement, afin de trouver le pH optimum ainsi que le meilleur tampon à utiliser pour cette réaction enzymatique (Figure 3.3). Nous avons utilisé 10 µg d'ARN total dans la réaction enzymatique afin de favoriser l'activité ATPasique. L'activité est calculée en utilisant une courbe standard du test colorimétrique fait avec du Pi. Les deux tampons TMMN100 et TMN100 donnent une activité ATPasique plus faible que le tampon à base d'HEPES. L'activité ATPasique avec le TMN100 possède un pic d'activité à pH 8.5 alors que pour le tampon HMN100 on peut remarquer que la courbe a tendance à augmenter à pH 7.5. Il a été remarqué que l'HEPES en haute concentration (200mM) pouvait inhiber l'activité ATPasique (résultats non présentés). Pour les autres tests ATPasiques, le pH et le tampon utilisés pour la réaction enzymatique seront du HMN100 à pH 7.5. Le tampon à base d'HEPES, HMN100, a été choisi pour la grande activité ATPasique qu'il permettait d'obtenir et le pH 7.5 a été choisi par défaut de ne pas avoir de pic distinctif d'activité.

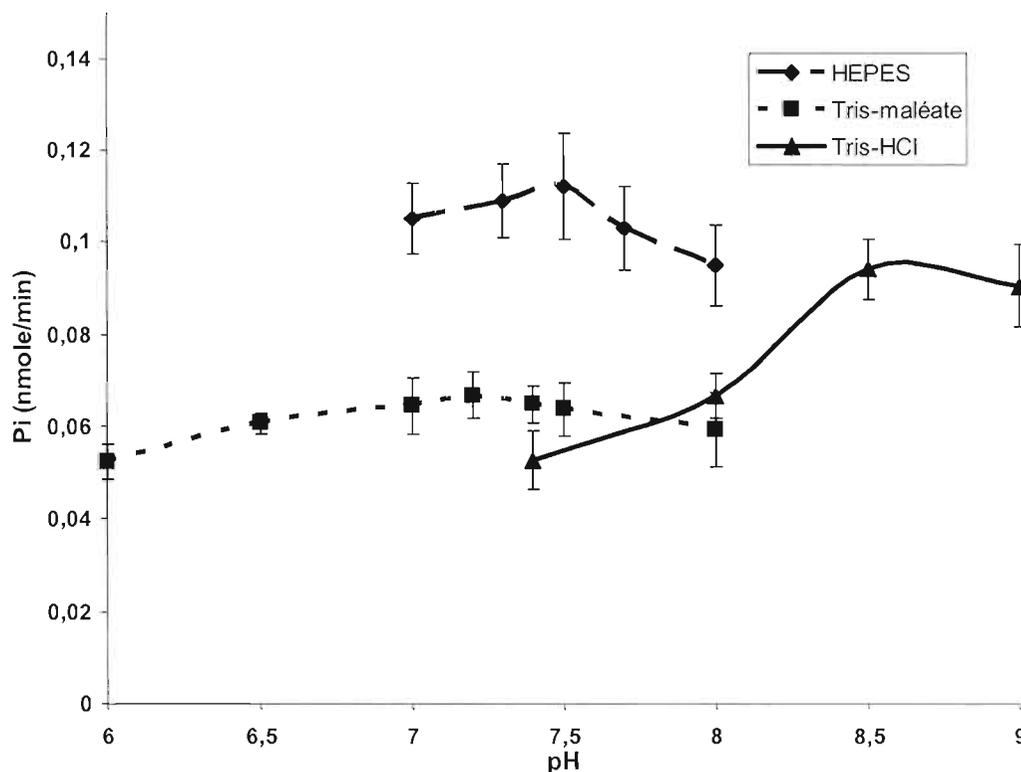


Figure 3.3 : pH optimum pour l'activité ATPasique de Dbp4. L'activité ATPasique de 1 μg (5.8 pmol) de Dbp4 en présence de 10 μg d'ARN total est présentée en fonction des différents pH dans lesquels la réaction enzymatique fut effectuée. Les réactions enzymatiques ont été incubées à 30°C.

3.4 Détermination de la température optimale

Toujours dans le but d'obtenir les conditions optimales pour des tests ATPasiques avec Dbp4, nous avons effectué une série de réactions enzymatiques à différentes températures (Figure 3.4). Les tests ont été effectués avec une nouvelle préparation de Dbp4. Pour chaque réaction enzymatique, une température différente a été utilisée et chaque réaction enzymatique a été faite avec 10 μg d'ARN total afin de favoriser l'activité ATPasique. En observant les tests d'activité ATPasique, on peut remarquer que l'activité est maximale lorsque la réaction enzymatique est faite à 37°C. Si on s'écarte de 37°C en diminuant ou en augmentant la température on peut remarquer une diminution de l'activité. Les prochains tests ATPasiques seront donc effectués à 37°C.

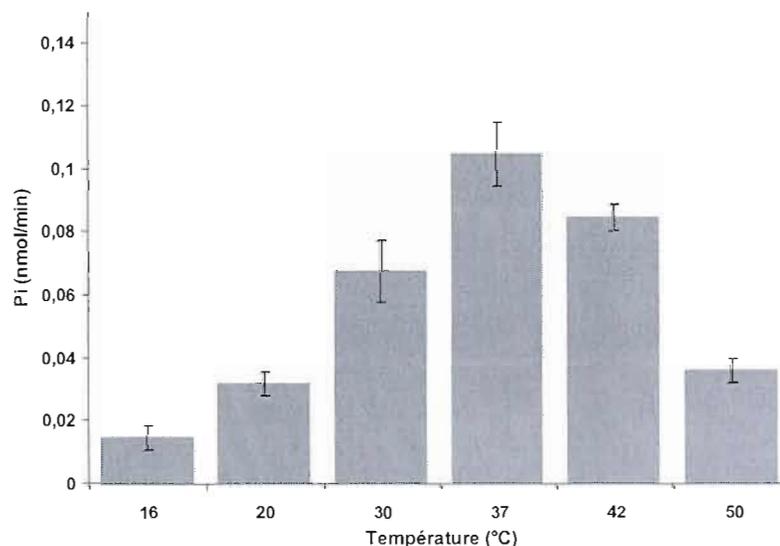


Figure 3.4 : Température optimale pour l'activité ATPasique de Dbp4. L'activité ATPasique de 1 μg (5.8 pmol) de Dbp4 est présentée en fonction des différentes températures d'incubation de la réaction enzymatique. Les réactions enzymatiques furent incubées durant trente minutes dans du tampon HMN100 à pH 7.5 avec 10 μg d'ARN total.

3.5 L'activité ATPasique de Dbp4 est stimulée par la présence d'ARN.

Nous avons déjà montré que Dbp4 a bel et bien une activité ATPasique augmentée en présence d'ARN (Figure 3.2). Afin de voir comment réagit l'enzyme dans le temps et aussi de confirmer les résultats précédents (section 3.2) nous avons fait une série de tests ATPasiques avec Dbp4 recombinante en présence ou non d'ARN, le tout à différents temps d'incubation (Figure 3.5). La réaction enzymatique a donc été faite dans des conditions optimales, c'est-à-dire dans du tampon HMN100 à pH 7.5 et l'incubation a été faite à 37°C. Pour l'activité ATPasique avec de l'ARN, 10 μg d'ARN total ont été utilisés. Nous avons calculé la quantité d'ATP utilisée par 1 μg (5.8 pmol) de Dbp4 et nous l'avons présenté en nmol de Pi grâce à une courbe standard du test colorimétrique. L'activité ATPasique basale de Dbp4 recombinante augmente de manière linéaire au fur et à mesure que le temps d'incubation augmente. Par l'ajout de 10 μg d'ARN total, on peut remarquer une forte augmentation de l'activité ATPasique. Pour l'activité ATPasique au temps 0, on ne distingue aucune différence d'activité. Il est à noter que le grand écart type nous empêche de déterminer la proportion de l'augmentation de l'activité ATPasique en présence d'ARN de manière précise mais en général une augmentation de 3 à 5 fois est observée. On peut

cependant remarquer que l'activité ATPasique reste présente durant les 50 minutes d'incubation.

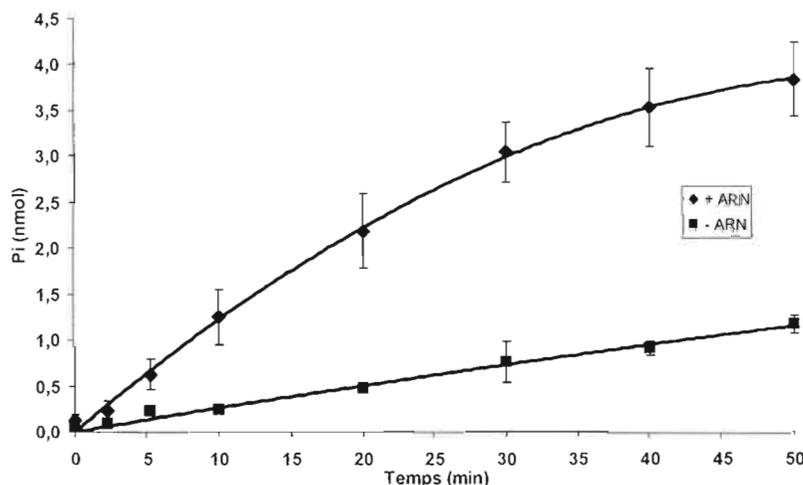


Figure 3.5 : Activité ATPasique de Dbp4 stimulée par l'ARN. L'activité ATPasique de Dbp4 est présentée en fonction des différents temps d'incubation de la réaction enzymatique. Nous avons utilisé 10 μg d'ARN total dans la courbe réaction enzymatique nommée ARN + (\blacklozenge). Les réactions enzymatiques furent effectuées dans du tampon HMN100 pH 7.5 à 37°C.

3.6 Impact du domaine C-terminal de Dbp4 sur l'activité ATPasique.

Il est possible que le domaine C-terminal de Dbp4 ait un rôle à jouer dans son activité et/ou dans sa spécificité pour un substrat puisque Dbp4 possède un long domaine C-terminal et que les hélicases ont une très grande variation en N- et C-terminal. Pour cette raison, une série de tests ATPasiques a été faite avec 1 μg (5.8 pmol) de la protéine Dbp4 (Figure 3.6). En même temps, des tests ATPasiques ont été effectués sur une quantité équimolaire de Dbp4 sans le domaine C-terminal dans les mêmes conditions. Grâce à la courbe standard du test colorimétrique, nous avons calculé la quantité d'ATP utilisée par 5.8 pmol de Dbp4, ou de Dbp4 Δ Cterm, dans le temps et nous l'avons présentée en nmol de Pi libéré en solution par minute. Les tests ATPasique ont été faits dans des conditions optimales, c'est-à-dire dans du tampon HMN100 à pH 7.5 et l'incubation a été faite à 37°C durant 30 minutes. On peut remarquer que l'activité ATPasique de Dbp4 Δ Cterm en présence d'ARN est diminuée de 2.7 fois par rapport à l'activité de Dbp4 complet et que l'activité ATPasique de Dbp4 Δ Cterm en absence d'ARN est diminuée de ~ 3 fois par rapport à l'activité de Dbp4 complet. En présence d'ARN, Dbp4 Δ Cterm a une activité ATPasique cinq fois plus grande que son

activité ATPasique basale sans ARN. Dbp4 complet réagi de manière attendue avec une augmentation de l'activité ATPasique d'approximativement quatre fois l'activité basale. On peut donc remarquer un fort impact de la délétion du domaine C-terminal sur l'activité ATPasique.

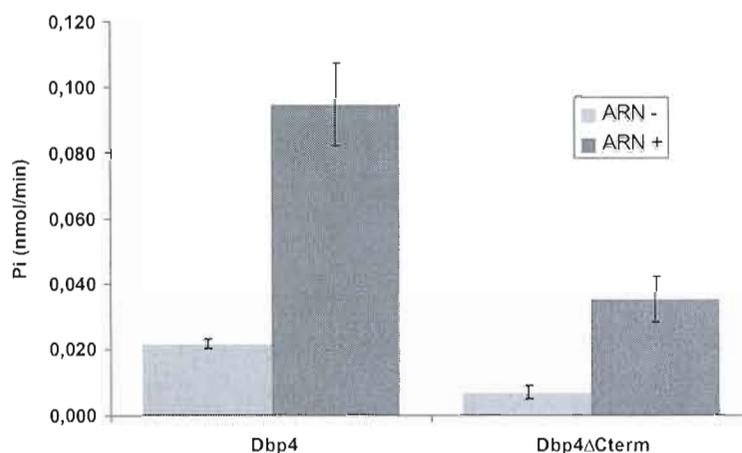


Figure 3.6 : Impact de la délétion du domaine C-terminal sur l'activité ATPasique de Dbp4. L'activité ATPasique de 5.8 pmol de Dbp4 et Dbp4ΔCterm est présentée en quantité de Pi libéré en solution par minute. Nous avons utilisé 10 μg d'ARN total dans les réactions enzymatiques nommées ARN +. Les réactions enzymatiques furent effectuées dans du tampon HMN100 pH 7.5 à 37°C durant 30 minutes.

3.7 Test d'interaction *in vivo* avec Dbp4

On retrouve en C-terminal de Dbp4 un motif de liaison protéine-protéine nommé « coiled-coil » (Figure 1.5). Pour cette raison une série de tests dans le système double hybride a été effectuée dans la souche *S. cerevisiae* AH109. La protéine appât est Dbp4. Les protéines qui furent testées comme protéines proies sont Dbp4, Esf1, Enp2 et Bfr2. Puisque des bases de données telles YRC (Riffle *et al.*, 2005) et yeast interactome (Collins *et al.*, 2007) suggèrent que les protéines Dbp4, Enp2, Esf1 et Bfr2 sont toutes présentes dans des gros complexes, il est intéressant de vérifier si elles ont une interaction les unes avec les autres. Les hélicases ont tendance à se lier à elles-mêmes pour former des multimères. Pour cette raison nous avons aussi vérifié si Dbp4 pouvait se lier à elle-même. Sur un milieu sans tryptophane et sans leucine toutes les souches réussissent à croître ce qui confirme que les souches

contiennent les vecteurs nécessaires pour le test double hybride (Figure 3.7). Des contrôles négatifs ont été effectués avec les vecteurs pGBKT7 (appât) et/ou pGADT7 (proies) vides. Lorsque l'on passe ces souches contrôles sur un milieu sélectif sans tryptophane, leucine et histidine, on remarque qu'aucune levure contenant un plasmide vide ne réussit à croître. Il n'y a donc pas de bruit de fond. Cependant, les souches contenant Dbp4 comme protéine appât et Dbp4, Esf1, Enp2 ou Bfr2 comme protéine proie, peuvent croître sur un milieu sélectif sans tryptophane, leucine et histidine. Donc les quatre protéines testées peuvent lier Dbp4 *in vivo* dans le système double hybride et permettre l'activation de la transcription du gène rapporteur *HIS3*. En ajoutant 20 mM de 3-AT on atténue l'activation du gène rapporteur *HIS3*, donc seulement les protéines qui sont fortement liées ensemble vont pouvoir activer ce gène. En présence de 3-AT on remarque que les souches avec les protéines proies Dbp4 et Esf1 ont de la difficulté à croître, alors que celles avec la protéine Enp2 ne poussent pas. Toutefois, la souche contenant la protéine appât Dbp4 et la protéine proie Bfr2 croissent très bien. Bfr2 est donc le meilleur candidat en tant que protéine pouvant lier Dbp4. Dans l'ordre de force de liaison avec Dbp4 on retrouve donc Bfr2 suivi de Esf1/Dbp4 et finalement Enp2. Des tests d'interaction double hybride ont été effectués avec le mutant tronqué en C-terminal mais les contrôles signalaient des interactions non-spécifiques (résultats non présentés).

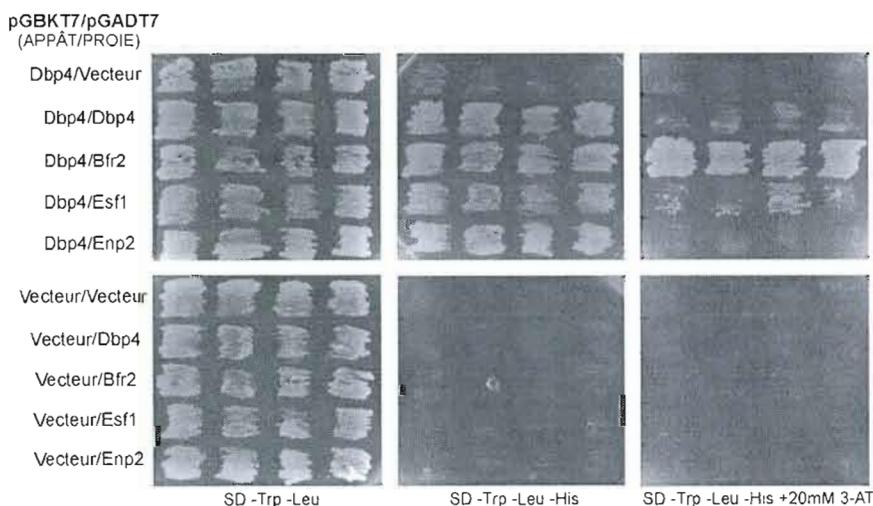


Figure 3.7 : Test d'interaction double hybride avec Dbp4. Les tests sont faits dans la souche *S. cerevisiae* AH109 qui est incapable de survivre sans tryptophane, leucine et histidine. Le plasmide pGADT7 (la proie) possède un gène de sélection *LEU2* et pGBKT7 (l'appât) a un gène de sélection *TRP1*. L'activation du gène rapporteur *HIS3* permet la survie des cellules sur milieux sans histidine et démontre une liaison entre les deux protéines testées dans ce système.

3.8 Expression de Dbp4 Δ cat pour l'immunisation de lapin.

La protéine Dbp4 Δ cat exprimée dans la bactérie fut purifiée par chromatographie d'affinité. La taille prédite de Dbp4 Δ cat est de 45 kDa. Des aliquotes de l'extrait, du « flow-through » (FT), du lavage et de l'éluât ont été analysés à l'aide d'un SDS-PAGE coloré au Coomassie et d'un immunobuvardage contre 6His (Figure 3.8). Les trois fractions de l'éluât contenant les protéines purifiées ont été chargées séparément afin de voir si différentes protéines sont présentes dans les différentes fractions. Les trois fractions possèdent toutes quatre bandes. Selon l'immunobuvardage fait sur la fraction 4 de l'éluât, les trois bandes à 60, 45 et 37 kDa contiennent Dbp4 Δ cat. Les bandes ont été vérifiées par spectrométrie de masse. La bande à 45 kDa correspond à Dbp4 Δ cat. Les bandes à 75, 60 et 37 kDa ne seront pas utilisées pour l'immunisation des lapins. Dbp4 Δ cat a été purifiée sur un gel SDS préparatif, la bande à 45 kDa a été électroéluée et a été utilisée pour immuniser les lapins.

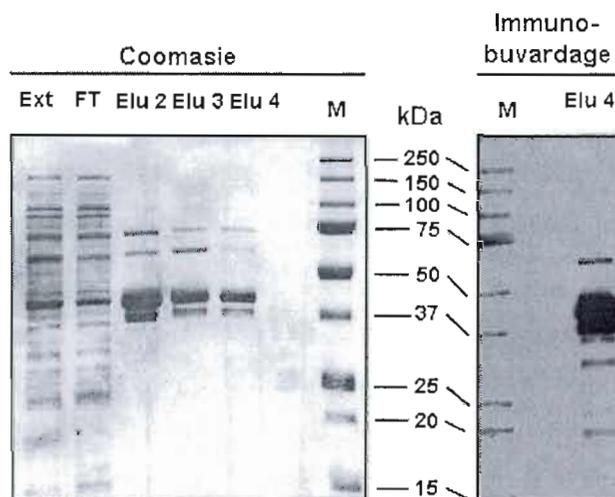


Figure 3.8 : Purification de Dbp4 Δ cat par chromatographie d'affinité. On retrouve à gauche un SDS-PAGE 10 % coloré au Coomassie et à droite un immunobuvardage contre 6His. Ext : 0.1% de l'extrait bactérien ; FT : 0.1% du « flow through » ; Elu 2, 3 et 4 : 0.07 % de l'éluât et M : standard de poids moléculaire.

3.9 Production d'anticorps de lapin contre Dbp4

Un suivi de la progression de l'immunisation a été fait et les titres des anticorps polyclonaux furent évalués (Figure 3.10). Les deux lapins utilisés pour l'immunisation sont nommés A et B. La protéine qui fut utilisée pour immuniser les lapins est une protéine recombinante qui fut

exprimée dans la bactérie. Le test du titre des anticorps est effectué avec de l'extrait de levure. Par conséquent, les bandes que l'on observe ne peuvent provenir que de Dbp4, Dbp4 dégradée ou d'une autre hélicase DEAD-box car la protéine Dbp4 Δ cat possède toujours le motif Q qui est caractéristique des ARN hélicases DEAD-box. Afin de s'assurer que les lapins ne possèdent pas déjà un anticorps qui réagit avec une protéine de levures avant l'immunisation, les sérums pré-immuns des deux lapins ont été testés. Aucun sérum pré-immun ne présente de bande. L'immunisation des lapins A et B a été suivie avec différents prélèvements. Pour les lapins A et B, il a été jugé, après le quatrième prélèvement, que l'immunisation était suffisante pour obtenir assez d'anticorps. À la suite de cette observation les deux lapins ont été sacrifiés par exsanguination et le titre des deux anticorps a été vérifié. Pour le lapin A, on peut observer l'apparition d'une bande au deuxième prélèvement sanguin. L'intensité de la bande augmente à chaque prélèvement sanguin. L'anticorps de lapin A (anti-Dbp4) peut lier une bande à 100 kDa jusqu'à une dilution de 1/2500. On peut aussi voir une légère bande à 75 et à 27 kDa qui peuvent être des bandes non spécifiques ou des bandes constituées de la protéine Dbp4 dégradée. La bande observée à approximativement 130 kDa dans les prélèvements du lapin A et les deux premières dilutions de l'exsanguination du lapin A sont des bandes non spécifiques qui disparaissent à plus forte dilution. Pour le lapin B, on observe l'apparition d'une bande à 100 kDa dès le premier prélèvement sanguin, mais ce n'est qu'au quatrième prélèvement sanguin que cette bande est fortement apparente. Elle n'est pas présente dans le deuxième prélèvement et à peine visible dans le troisième prélèvement. La bande est cependant présente dans des immunobuvardage précédents, ce qui nous laisse croire qu'une bulle d'air a nui au transfert dans cette région. Lorsque le sérum de l'exsanguination est testé, on peut facilement voir une bande à 100 kDa à une dilution de 1/2500. L'anticorps de lapin A et l'anticorps de lapin B ont tout les deux des bandes à 75 et 27 kDa qui ont la même intensité qui peuvent être des bandes non spécifiques ou des bandes constituées de la protéine Dbp4 dégradée. Il est à noter que le titre de l'anticorps B semble meilleur que l'anticorps A.

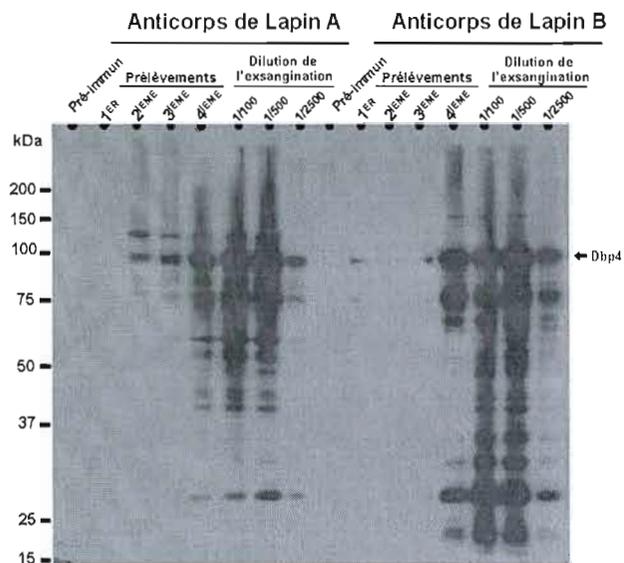


Figure 3.9 : Titrage de l'anticorps anti-Dbp4. Un immunobuvardage avec l'anticorps primaire provenant du lapin A ou B a été fait. Dbp4 est affiché avec une flèche. Les prélèvements et les pré-immuns ont été testés avec une dilution de 1/100.

CHAPITRE IV - DISCUSSION

Dbp4 contient des motifs qui sont caractéristiques d'une hélicase de la famille DEAD-box. Il est donc possible que Dbp4 possède les activités propres aux hélicases, soit une activité ATPasique et une hélicasique. L'activité ATPasique a été étudiée. L'activité hélicasique n'a pas été étudiée dû aux contraintes de temps et aux études antérieures qui ont révélé que les ARN hélicases DEAD-box montrent peu ou pas d'activité hélicasique lorsque testées *in vitro* (Cordin *et al.*, 2006). Dbp4 a un domaine C-terminal qui contient un motif « coiled-coil » qui pourrait jouer un rôle dans des interactions protéine-protéine. Puisque plusieurs hélicases, telle eIF4A, nécessitent l'ajout de cofacteur pour avoir une activité, il est possible que Dbp4 puisse lier des protéines et que ces protéines aient un effet de cofacteur. La caractérisation de Dbp4 nous permettra d'approfondir nos connaissances sur les premières étapes de la maturation de l'ARNr. Sachant que Dbp4 est une protéine conservée dans l'évolution, sa caractérisation nous aidera à mieux comprendre les mécanismes de maturation chez d'autres organismes, tel l'humain.

4.1 Les conditions nécessaires à une activité ATPasique optimale

Afin de caractériser Dbp4 nous avons purifié et utilisé la protéine Dbp4 recombinante produite dans la bactérie (Figure 3.1A). L'ATP a été utilisée comme source d'énergie puisque la majorité des enzymes DEAD-box utilise plus facilement l'ATP que d'autres NTP. Il aurait été intéressant de tester différents NTP afin de voir si Dbp4 se comporte comme les autres enzymes DEAD-box. Nous avons fait des tests ATPasiques avec Dbp4, en présence d'ARN. De l'ARN total de levure a été choisi à cause de la facilité à en obtenir. Des substrats comme le pré-ARN 35S, U14 et U3 seraient des bons candidats mais dans le cadre de cette étude ils n'ont pas été utilisés. Par l'ajout d'ARN total, on peut remarquer une augmentation de l'activité ATPasique (Figure 3.2). Dbp4 possède donc une activité ATPasique qui est augmentée en présence d'ARN, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle elle serait une ARN hélicase. On utilise donc 10 μ g d'ARN total pour faire les tests d'optimisation, car avec cette quantité d'ARN on atteint un plateau d'activité ATPasique maximale. Des tests contrôles auraient pu être effectués sans ATP ou avec de l'ATP non-hydrolysable. Ces

contrôles n'ont pas été faits puisque la seule différence entre les blancs et les tests est la présence de la protéine étudiée. Puisque Dbp4 est une protéine de levure, il est probable que ses températures et pH optimaux se situent près des températures et pH optimaux de la levure. Dans l'optique d'obtenir une activité ATPasique optimum, le pH optimum a été déterminé. Des réactions enzymatiques ont été faites dans des tampons Tris-HCl, Tris-maléate et HEPES (Figure 3.3). Le tampon à base de 50 mM d'HEPES a permis d'obtenir l'activité ATPasique la plus élevée. La variation d'activité ATPasique ne varie pas beaucoup en fonction du pH dans de l'HEPES. Cependant, une légère augmentation est observable à un pH de 7.5. Ce tampon à pH 7.5 est donc utilisé pour faire les prochains tests enzymatiques. Toujours dans l'optique d'avoir une activité ATPasique optimale, nous avons effectué des tests ATPasiques à différentes températures (Figure 3.4). Nous avons trouvé que Dbp4 a une activité ATPasique optimale à une température de 37°C. L'enzyme a donc une conformation à 37°C qui favorise l'utilisation de l'ATP. Cependant, il est à noter que son activité hélicasique, si elle en possède une, n'est pas nécessairement reliée à cette température optimale. La température utilisée pour les tests enzymatiques avec Dbp4 devrait donc être effectuée à 37 °C pour les prochains tests ATPasiques.

4.2 L'activité ATPasique de Dbp4 est stimulée par la présence d'ARN

Il a déjà été discuté ci-haut que Dbp4 réagit comme un ARN hélicase pour ce qui est de son activité ATPasique. Cependant, le test précédent a été effectué à un seul temps d'incubation dans des conditions qui n'étaient pas optimales pour l'activité ATPasique. Donc, des tests d'activité ATPasiques dans les conditions optimales ont été effectués dans le temps avec ou sans ARN total (Figure 3.5). En général, Dbp4 a une bonne activité ATPasique qui reste assez constante dans le temps. Puisque de l'ARN total est utilisé, il nous est impossible de savoir si un ou plusieurs ARN stimulent l'activité et donc aucun modèle de cinétique enzymatique ne peut être utilisé. On peut tout de même confirmer que Dbp4 a une activité ATPasique qui augmente en présence d'ARN et que l'enzyme est capable de garder cette activité et de dégrader de l'ATP durant cinquante minutes de manière constante.

4.3 Implication du domaine en C-terminal de Dbp4 dans l'activité ATPasique.

Les hélicases sont constituées d'un cœur hélicasique conservé qui est flanqué de régions N- et C-terminales peu conservées. Puisque Dbp4 est constituée d'un grand domaine C-terminal peu conservé, il est normal d'envisager que cette partie de Dbp4 puisse avoir une importance pour son activité et/ou sa spécificité pour un substrat. Lorsque la section en C-terminal du cœur hélicasique a été éliminée, on a pu remarquer une forte diminution de l'activité ATPasique avec et sans ARN (Figure 3.6). Puisque l'activité basale et l'activité en présence d'ARN ont diminué, il est probable que la portion en C-terminal aie un rôle à jouer dans l'utilisation de l'ATP, ou bien en stabilisant l'enzyme, ou bien en favorisant la réaction de dégradation de l'ATP. Il est cependant évident que le domaine C-terminal n'a pas de rôle à jouer pour la liaison au substrat d'ARN car dans cette situation l'ARN aurait eu plus de difficulté à stimuler l'activité ATPasique et on aurait remarqué une diminution de l'activité ATPasique en présence d'ARN et il n'y aurait pas eu de différence entre l'activité de Dbp4 et Dbp4 Δ Cterm sans ARN. Ici, l'activité ATPasique avec et sans ARN diminue de manière proportionnelle. Donc l'activité ATPasique est affectée par la délétion de la région C-terminale mais la liaison à son substrat d'ARN ne l'est pas. Il est probable que la portion C-terminale, qui fut tronqué, ait un impact sur la conformation de l'enzyme et donc sur son activité ATPasique. La diminution d'activité ATPasique de la protéine tronquée pourrait avoir un impact sur l'activité hélicasique.

4.4 Protéines associées à Dbp4.

Le test d'interaction double hybride est fait dans des levures. Puisque ce test est effectué avec des protéines de levure il est possible que certaines protéines endogènes favorisent les interactions. Pour cette raison nous ne pouvons affirmer que la liaison avec Dbp4 est directe. Cependant puisque les protéines dans le test sont surexprimées, il est peu probable qu'une tierce protéine soit impliquée. La section C-terminale de Dbp4 est très importante pour l'activité ATPasique. Cette section C-terminale détient un motif de liaison « coiled-coil ». Dbp4 peut donc lier d'autres protéines qui renferment ce motif. Plusieurs hélicases ont une activité ATPasique qui est grandement augmentée en présence de cofacteur. On peut penser à eIF4A qui voit son activité ATPasique augmentée en présence de eIF4B et eIF4G (Korneeva *et al.*, 2005). Dbp4 a été trouvée dans des complexes composés de nombreuses protéines. Il

est donc possible que Dbp4 lie une autre protéine et tout aussi possible que l'une de ces protéines soit un cofacteur. Les protéines Bfr2, Enp2 et Esf1 sont trois protéines qui se retrouvent le plus souvent dans des complexes contenant Dbp4 (Riffle *et al.*, 2005 ; Collins *et al.*, 2007). Les tests effectués grâce au système du double hybride ont permis de confirmer que ces protéines pouvaient lier Dbp4 (Figure 3.7). Ces mêmes tests ont aussi démontré que Dbp4 peut se lier à elle-même, ce qui est courant chez les hélicases. Aucun test quantitatif n'a été effectué avec le dosage de la β -galactosidase, un des gènes rapporteur de AH109, puisqu'avec l'ajout de 3-AT nous avons obtenu une seule forte interaction (Dbp4-Bfr2). Il serait cependant intéressant d'effectuer ce test à des fins de comparaison. Tout comme Dbp4, U3 et U14, la protéine Esf1 est essentielle au clivage du pré-ARN 35S (Peng *et al.*, 2004). Elle possède deux motifs prédits « coiled-coil » qui lui permettent possiblement de lier Dbp4. Cette protéine est donc un très bon candidat pour être testé en tant que cofacteur. Enp2 est une protéine de fonction inconnue qui est essentiellement localisée dans le nucléole (Bernstein *et al.*, 2004). Elle possède un motif prédit « coiled-coil ». Puisque que nous avons démontré que Dbp4 pouvait lier cette protéine et que Enp2 ne possède aucune fonction connue, il serait très intéressant de tester si cette protéine est un cofacteur de Dbp4. La protéine Bfr2 est aussi une très bonne candidate pour des tests en tant que cofacteur car, bien qu'elle ne soit pas présente dans le SSU processome, elle est tout de même essentielle à la production d'ARNr 18S et elle est localisée dans le nucléole (Bernstein *et al.*, 2004). De plus, elle est capable de lier fortement Dbp4 et elle a trois motifs « coiled-coil » prédit dans sa séquence. Dans une étude de Chabane *et al.* (1998), Bfr2 a été suggérée comme étant une protéine essentielle pour la croissance dû au fait que l'expression de son gène était corrélée avec la croissance de la masse et la prolifération cellulaire. Dans un rôle possible de cofacteur pour Dbp4, Bfr2 pourrait facilement être lié à la croissance de la cellule qui nécessite une machinerie ribosomique fonctionnelle pour bien croître. De plus il est à noter que les protéines Bfr2, Esf1 et Enp2 possèdent des homologues chez l'humain qui sont respectivement ABTAP, NOL10 et AATF. ABTAP (« ABT1-associated protein ») lie la protéine ABT1. ABT1 joue un rôle dans l'activation basale de la transcription (Oda *et al.*, 2004). La protéine NOL10 est une protéine présente dans le nucléole. Le rôle de NOL10 dans n'a pas encore été découvert. AATF est un facteur de transcription qui inhibe l'apoptose et son gène est surexprimé dans toutes les leucémies étudiées à ce jour (Kaul et Mehrotra, 2007).

4.5 Production d'anticorps anti-Dbp4

Les tests effectués dans cette étude sur Dbp4 ont été faits sur une protéine recombinante qui fut produite dans des bactéries. Il est évident que certaines modifications post-traductionnelles n'ont pas été effectuées par la bactérie. Ces modifications peuvent avoir un impact marqué sur l'activité et/ou la stabilité de Dbp4. La production d'anticorps pourrait donc apporter un avantage important dans les futures études sur Dbp4. La détection et la purification de Dbp4 seraient possibles chez la levure. Lorsque les anticorps sont utilisés avec un extrait de levure on peut retrouver une bande qui migre à 100 kDa, où Dbp4 recombinante migre, et quelques bandes plus bas (Figure 3.8). Les anticorps produits par les deux lapins sont capables de détecter Dbp4 qui se situe à 100 kDa à une dilution de 1/2500. Plus la dilution augmente pour les anticorps, moins on voit les bandes non spécifiques, mais la bande à 100kDa qui représente Dbp4 reste relativement intense. On peut donc supposer qu'en utilisant les anticorps A et B à plus haute dilution que 1/2500 on pourra réussir à obtenir une seule bande qui identifiera Dbp4. Les bandes plus basses à 25 et 75 kDa sont probablement des morceaux de la protéine Dbp4 dégradée. En effet, puisque la protéine Dbp4 recombinante fut produite chez la bactérie, les anticorps produits ne peuvent être que contre Dbp4 ou des protéines de bactérie. De l'extrait de levure est utilisé pour vérifier le titre des anticorps. Donc, la seule protéine qui va réagir est Dbp4 ou des portions dégradées de celle-ci, ou bien des protéines ayant des homologues avec des protéines bactériennes. Il est tout de même possible que l'anticorps reconnaisse une autre hélicase de la famille DEAD, car la protéine utilisée pour l'immunisation des lapins possédait le motif Q. Cependant les chances que cela se produise sont assez faibles si l'on considère la petite portion que ce motif représente dans toute la protéine. Néanmoins, l'idéal serait d'effectuer un test avec un extrait bactérien afin de vérifier les interactions possibles avec des protéines de bactérie. Il serait aussi intéressant de purifier les anticorps qui reconnaissent Dbp4; ceci pourrait se faire par chromatographie d'affinité avec une résine couplée à Dbp4 de façon covalente.

CHAPITRE V – CONCLUSIONS

5.1 Conclusion

Dbp4 est une protéine qui possède tous les motifs d'une hélicase de la famille DEAD-box. Tout comme on aurait pu s'y attendre d'une ARN hélicase, Dbp4 recombinante a une activité ATPasique qui augmente en présence d'ARN. Les conditions optimales à utiliser afin d'obtenir une activité ATPasique maximale sont les suivantes : on doit faire le test enzymatique à 37°C dans du tampon HMN100 à pH 7.5 avec 10 µg d'ARN total de levure. Le domaine en C-terminal joue un rôle important dans le bon fonctionnement de l'activité ATPasique. La présence d'un motif « coiled-coil » dans ce domaine et la présence de Dbp4 dans des gros complexes protéiques laissent supposer que celle-ci pourrait lier des protéines. En se basant sur les résultats du système double hybride on peut affirmer que Dbp4 lie fort probablement les protéines Enp2, Esf1 et Bfr2, l'interaction la plus forte étant avec la protéine Bfr2. Il a aussi été démontré que Dbp4 pouvait se lier à elle-même, ce qui concorde avec la tendance des ARN hélicases à se lier en dimère. La production d'anticorps de lapin anti-Dbp4 sera utilisée pour la purification de Dbp4 et pour la détection dans différents tests, tel des immunobuvardages et des immunolocalisations chez la levure. Donc à ce jour, Dbp4 possède les caractéristiques d'une ARN hélicase. Cependant, il reste à caractériser son activité hélicasique.

5.2 Perspectives

Il reste à déterminer si les protéines qui lient Dbp4 le font de manière directe. Pour se faire, le système Fusion-Alpha pourrait être utilisé. Par l'utilisation d'un « protein-protein interaction assay », il serait possible de déterminer si les protéines Bfr2, Esf1 et Enp2 lient Dbp4 de manière directe. Il serait aussi important de déterminer si les protéines qui lient Dbp4 sont des cofacteurs. À ce jour, aucun test ATPasique n'a bien fonctionné avec GST-Bfr2, GST-Enp2 et GST-Esf1 dû à la présence d'ATPase contaminante dans les fractions purifiées (résultats non présentés). Une série de purifications en deux étapes avec une chromatographie ionique suivie d'une chromatographie d'affinité avec GST à forte concentration en sel devrait permettre d'obtenir des protéines pures. Des tests d'activité hélicasique devront aussi être faits afin de prouver que Dbp4 est bien une hélicase. Le principe qui devra être utilisé dans ce

test est basé sur le fait qu'un oligonucléotide d'ARN double brin migre plus lentement dans un gel de polyacrylamide qu'un ARN simple brin (Soni *et al.* 2003). Parmi les possibilités de substrats qui s'offrent à nous, il y a la boîte A de U3 (Figure 1.2) et le domaine A de U14 (Figure 1.3) couplés avec leurs séquences complémentaires qui proviennent du pré-ARNr 35S. Puisque ces deux snoRNA ont un rôle à jouer dans des clivages où Dbp4 est essentielle, il est possible que U3 et/ou U14 soient des substrats de Dbp4. Des tests hélicasiques avec la portion C-terminale en moins devraient aussi être effectués afin de voir l'importance de ce domaine sur l'activité hélicasique.

BIBLIOGRAPHIE

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.**, 1999, Short Protocols in Molecular Biology, 4th Edition, Édition WILEY. pp 13-51 to 13-52.
- Ba, K.**, 2007, « Identification de protéines associées à la RNA hélicase DBP4 chez la levure *saccharomyces cerevisiae* ». Mémoire sous la direction de Dr. François Dragon. Montréal : U.Q.À.M.
- Balakin, A. G., Lempicki, R. A., Huang, G. M. and Fournier, M. J.**, 1994, *Saccharomyces cerevisiae* U14 small nuclear RNA has little secondary structure and appears to be produced by post-transcriptional processing. *J Biol Chem* 269, 739-746.
- Balakin, A. G., Smith, L. and Fournier, M. J.**, 1996, The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 86, 823-834.
- Bartel, P. L., Chien, C. T., Sternglanz, R. and Fields, S.** 1993, Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In cellular interactions in development: a practical approach, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp 153–179.
- Beltrame, M., Henry, Y. and Tollervey, D.**, 1994, Mutational analysis of an essential binding site for the U3 snoRNA in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-rRNA. *Nucleic Acids Res* 22, 5139-5147.
- Bernstein, K. A., Gallagher, J. E., Mitchell, B. M., Granneman, S. and Baserga, S. J.**, 2004, The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryote Cell* 3, 1619-1626.
- Bernstein, K. A., Granneman, S., Lee, A. V., Manickam, S. and Baserga, S. J.**, 2006, Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases involved in large ribosomal subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* 26, 1195-1208.
- Caruthers, J. M., Johnson, E. R. and McKay, D. B.**, 2000, Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13080-13085.
- Caruthers, J. M. and McKay, D. B.**, 2002, Helicase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 12, 123-133.
- Chabane, S., Gachet, E. and Kepes, F.**, 1998, Over-expression of the yeast *BFR2* gene partially suppresses the growth defects induced by Brefeldin A and by four ER-to-Golgi mutations. *Curr Genet* 33, 21-28.
- Collins, S. R., Kemmeren, P., Zhao, X. C., Greenblatt, J. F., Spencer, F., Holstege, F. C., Weissman, J. S. and Krogan, N. J.**, 2007, Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 6, 439-450.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K. and Linder, P.**, 2006, The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17-37.
- Daugeron, M. C. and Linder, P.**, 2001, Characterization and mutational analysis of yeast Dbp8p, a putative RNA helicase involved in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* 29, 1144-1155.
- de la Cruz, J., Kressler, D. and Linder, P.**, 1999, Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci* 24, 192-198.
- Dragon F., Gallagher J. E., Compagnone-Post P. A., Mitchell B. M., Porwancher K. A., Wehner K. A., Wormsley S., Settlege R. E., Shabanowitz J., Osheim Y., Beyer A. L.,**

- Hunt D. F. and Baserga S. J.**, 2002, A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-970.
- Dunbar, D. A., Wormsley, S., Agentis, T. M. and Baserga, S. J.**, 1997, Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. *Mol Cell Biol* 17, 5803-5812.
- Enright, C. A., Maxwell, E. S., Eliceiri, G. L. and Sollner-Webb, B.**, 1996, 5'ETS rRNA processing facilitated by four small RNAs: U14, E3, U17, and U3. *RNA* 2, 1094-1099.
- Fairman, M. E., Maroney, P. A., Wang, W., Bowers, H. A., Gollnick, P., Nilsen, T. W. and Jankowsky, E.**, 2004, Protein displacement by DEXH/D "RNA helicases" without duplex unwinding. *Science* 304, 730-734.
- Fry, D. C., Kuby, S. A. and Mildvan, A. S.**, 1986, ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 907-911.
- Fuller-Pace, F. V.**, 1994, RNA helicases: modulators of RNA structure. *Trends Cell Biol* 4, 271-274.
- Ganot, P., Bortolin, M. L. and Kiss, T.**, 1997, Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* 89, 799-809.
- Gautier, T., Berges, T., Tollervey, D. and Hurt, E.**, 1997, Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 7088-7098.
- Goessens, G., Thiry, M. and Lepoint, A.**, 1987, Relations between nucleoli and nucleolus-organizing regions during the cell cycle. *Chromosomes Today* 9, 261-271.
- Gorbalenya, A. E. and Koonin, E. V.**, 1993, Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr Opin Struct* 3, 419-429.
- Granneman, S., Bernstein, K. A., Bleichert, F. and Baserga, S. J.**, 2006, Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases required for small ribosomal subunit synthesis. *Mol Cell Biol* 26, 1183-1194.
- Grifo, J. A., Tahara, S. M., Leis, J. P., Morgan, M. A., Shatkin, A. J. and Merrick, W. C.**, 1982, Characterization of eukaryotic initiation factor 4A, a protein involved in ATP-dependent binding of globin mRNA. *J Biol Chem* 257, 5246-5252.
- Hall, M. C. and Matson, S. W.**, 1999, Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol Microbiol* 34, 867-877.
- Harder, K. W., Owen, P., Wong, L. K. H., Aebersold, R., Clark-Lewis, I. and Jirik, F. R.**, 1994, Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase ft (HPTP) using synthetic phosphopeptides. *Biochem. J.*, 298, 395-401.
- Henras, A., Henry, Y., Bousquet-Antonelli, C., Noaillac-Depeyre, J., Gelugne, J. P. and Caizergues-Ferrer, M.**, 1998, Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J* 17, 7078-7090.
- Hernandez-Verdun, D.**, 2006, The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* 126, 135-148.
- Huang, G. M., Jarmolowski, A., Struck, J. C. and Fournier, M. J.**, 1992, Accumulation of U14 small nuclear RNA in *Saccharomyces cerevisiae* requires box C, box D, and a 5', 3' terminal stem. *Mol Cell Biol* 12, 4456-4463.
- Hughes, J. M. and Ares, M., Jr.**, 1991, Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J* 10, 4231-4239.

- Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S. and Pyle, A. M.**, 2001, Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science* 291, 121-125.
- Jansen, R., Tollervey, D. and Hurt, E. C.**, 1993, A U3 snoRNP protein with homology to splicing factor PRP4 and G beta domains is required for ribosomal RNA processing. *EMBO J* 12, 2549-2558.
- Junéra, H., Masson, C., Géraud, G. and Hernandez-Verdun, D.**, 1995, The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *J Cell Sci* 108, 3427-3441.
- Kass, S. and Sollner-Webb, B.**, 1990, The first pre-rRNA-processing event occurs in a large complex: analysis by gel retardation, sedimentation, and UV cross-linking. *Mol Cell Biol* 10, 4920-4931.
- Kaul, D. and Mehrotra, A.**, 2007, Functional characterization of AATF transcriptome in human leukemic cells. *Mol. Cell. Biochem* 297, 215-20.
- Kessler, M. M., Henry, M. F., Shen, E., Zhao, J., Gross, S., Silver, P. A. and Moore, C. L.**, 1997, Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast. *Genes Dev* 11, 2545-2556.
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C. and Caron, P. R.**, 1998, Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 6, 89-100.
- Kim, S. H., Smith, J., Claude, A. and Lin, R. J.**, 1992, The purified yeast pre-mRNA splicing factor PRP2 is an RNA-dependent NTPase. *EMBO J* 11, 2319-2326.
- Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J. P., Caizergues-Ferrer, M. and Kiss, T.**, 1996, Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85, 1077-1088.
- Kiss-László Z., Henry Y. and Kiss T.**, 1998, Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *EMBO J* 17, 797-807.
- Koonin, E. V.**, 1996, Pseudouridine synthases: four families of enzymes containing a putative uridine-binding motif also conserved in dUTPases and dCTP deaminases. *Nucleic Acids Res* 24, 2411-2415.
- Korneeva, N. L., First, E. A., Benoit, C. A. and Rhoads R. E.**, 2005, Interaction between the NH2-terminal domain of eIF4A and the central domain of eIF4G modulates RNA-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem* 280, 1872-1881.
- Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G. H., Lohman, T. M. and Waksman, G.**, 1997, Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of E. coli Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell* 90, 635-647.
- Korolev, S., Yao, N., Lohman, T. M., Weber, P. C. and Waksman, G.**, 1998, Comparisons between the structures of HCV and Rep helicases reveal structural similarities between SF1 and SF2 super-families of helicases. *Protein Sci* 7, 605-610.
- Kos, M. and Tollervey, D.**, 2005, The putative RNA helicase Dbp4p is required for release of the U14 snoRNA from preribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 20, 53-64.
- Kressler, D., de la Cruz, J., Rojo, M. and Linder, P.**, 1997, Fal1p is an essential DEAD-box protein involved in 40S-ribosomal-subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 7283-7294.

- Kressler, D., Linder, P. and de La Cruz, J.**, 1999, Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7897-7912.
- Lafontaine, D. L. and Tollervey, D.**, 1999, Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA* 5, 455-467.
- Leader, D. J., Sanders, J. F., Waugh, R., Shaw, P. and Brown, J. W.**, 1994, Molecular characterisation of plant U14 small nucleolar RNA genes: closely linked genes are transcribed as polycistronic U14 transcripts. *Nucleic Acids Res* 22, 5196-5203.
- Lee, C. G. and Hurwitz, J.**, 1992, A new RNA helicase isolated from HeLa cells that catalytically translocates in the 3' to 5' direction. *J Biol Chem* 267, 4398-4407.
- Li, D. and Fournier, M. J.**, 1992, U14 function in *Saccharomyces cerevisiae* can be provided by large deletion variants of yeast U14 and hybrid mouse-yeast U14 RNAs. *EMBO J* 11, 683-689.
- Li, H. D., Zagorski, J. and Fournier, M. J.**, 1990, Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 1145-1152.
- Liang, W. Q., Clark, J. A. and Fournier, M. J.**, 1997, The rRNA-processing function of the yeast U14 small nucleolar RNA can be rescued by a conserved RNA helicase-like protein. *Mol Cell Biol* 17, 4124-4132.
- Liang, W. Q. and Fournier, M. J.**, 1995, U14 base-pairs with 18S rRNA: a novel snoRNA interaction required for rRNA processing. *Genes Dev* 9, 2433-2443.
- Lin, C. and Kim, J. L.**, 1999, Structure-based mutagenesis study of hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol* 73, 8798-8807.
- Linder, P.**, 2006, Dead-box proteins: a family affair—active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res* 34, 4168-4180.
- Linder, P., Gasteiger, E. and Bairoch, A.**, 2000, A comprehensive web resource on RNA helicases from the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 507-509.
- Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J. and Slonimski, P. P.**, 1989, Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337, 121-122.
- Liu, J., Zheng, Q., Deng, Y., Cheng, C. S., Kallenbach, N. R. and Lu, M.**, 2006, A seven-helix coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15457-15462.
- Lorsch, J. R. and Herschlag, D.**, 1998, The DEAD box protein eIF4A. 2. A cycle of nucleotide and RNA-dependent conformational changes. *Biochemistry* 37, 2194-2206.
- Luking, A., Stahl, U. and Schmidt, U.**, 1998, The protein family of RNA helicases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33, 259-296.
- Maden, B. E. H. and Hughes, J. M. X.**, 1997, Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma* 105, 391-400.
- Maxwell, E. S. and Fournier, M. J.**, 1995, The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem* 64, 897-934.
- Mohr, S., Stryker, J. M. and Lambowitz, A. M.**, 2002, A DEAD-box protein functions as an ATP-dependent RNA chaperone in group I intron splicing. *Cell* 109, 769-779.
- Morrissey, J. P. and Tollervey, D.**, 1993, Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol Cell Biol* 13, 2469-2477.
- Mougey, E. B., Pape, L. K. and Sollner-Webb, B.**, 1993, A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA. *Mol Cell Biol* 13, 5990-5998.

- Ni, J., Tien, A. L. and Fournier, M. J., 1997, Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* 89, 565-573.
- Oda, T., Fukuda, A., Hagiwara, H., Masuho, Y., Muramatsu, M. A., Hisatake, K. and Yamashita, T., 2004, ABT1-associated protein (ABTAP), a novel nuclear protein conserved from yeast to mammals, represses transcriptional activation by ABT1. *J Cell Biochem* 93, 788-806.
- Patel, S.S. and Picha, K.M., 2000, Structure and function of hexameric helicases. *Annu Rev Biochem* 69, 651-697.
- Pause, A., Methot, N. and Sonenberg, N., 1993, The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol* 13, 6789-6798.
- Piekna-Przybylska, D., Decatur, W. A., and Fournier, M. J., 2007, New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modifications in eukaryotic rRNA. *RNA* 13, 305-312.
- Peng, W. T., Krogan, N. J., Richards, D. P., Greenblatt, J. F. and Hughes, T. R., 2004, ESF1 is required for 18S rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 32, 1993-1999.
- Reichow, S. L., Hamma, T., Ferre-D'Amare, A. R. and Varani, G., 2007, The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res* 35, 1452-1464.
- Riffle, M., Malmstrom, L. and Davis, TN., 2005, The yeast resource center public data repository. *Nucleic Acids Res* 33, 378-382.
- Rocak, S. and Linder, P., 2004, DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 232-241.
- Rogers, G. W., Jr., Richter, N. J., Lima, W. F. and Merrick, W. C., 2001, Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem* 276, 30914-30922.
- Samarsky, D. A. and Fournier, M.J., 1999, A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 27, 161-164.
- Samarsky, D. A., Schneider, G. S. and Fournier, M. J., 1996, An essential domain in *Saccharomyces cerevisiae* U14 snoRNA is absent in vertebrates, but conserved in other yeasts. *Nucleic Acids Res* 24, 2059-2066.
- Savino, T. M., Gebrane-Younes, J., De Mey, J., Sibarita, J. B. and Hernandez-Verdun, D., 2001, Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* 153, 1097-1110.
- Schwer, B., 2001, A new twist on RNA helicases: DExH/D box proteins as RNPsases. *Nat Struct Biol* 8, 113-116.
- Shiratori, A., Shibata, T., Arisawa, M., Hanaoka, F., Murakami, Y. and Eki, T., 1999, Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and northern analysis. *Yeast* 15, 219-253.
- Silverman, E., Edwalds-Gilbert, G. and Lin, R. J., 2003, DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* 312, 1-16.
- Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S. D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J. K., Gazdar, A. F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B. H., Bachman, K. E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. and Velculescu, V. E., 2006, The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-274.

- Smith, C. A. and Rayment, I.**, 1996, Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys J* 70, 1590-1602.
- Soni, R. K., Mehra, P., Choudhury, N. R., Mukhopadhyay, G. and Dhar, S. K.**, 2003 Functional characterization of *Helicobacter pylori* DnaB helicase. *Nucleic Acids Res* 31, 6828-6840.
- Staley, J. P. and Guthrie, C.**, 1998, Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-326.
- Story, R. M. and Steitz, T. A.**, 1992, Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature* 355, 374-376.
- Tanner, N. K.**, 2003, The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition. *Cell Cycle* 2, 18-19.
- Tanner, N. K. and Linder, P.**, 2001, DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* 8, 251-262.
- Tollervey, D.**, 1987, A yeast small nuclear RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. *EMBO J* 6, 4169-4175.
- Tollervey, D. and Kiss, T.**, 1997, Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 9, 337-342.
- Trinh-Rohlik, Q. and Maxwell, E. S.**, 1988, Homologous genes for mouse 4.5S hybRNA are found in all eukaryotes and their low molecular weight RNA transcripts intermolecularly hybridize with eukaryotic 18S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res* 16, 6041-6056.
- Velankar, S. S., Soultanas, P., Dillingham, M. S., Subramanya, H. S. and Wigley, D. B.**, 1999, Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* 97, 75-84.
- Venema, J., Bousquet-Antonelli, C., Gelugne, J. P., Caizergues-Ferrer, M. and Tollervey, D.**, 1997, Rok1p is a putative RNA helicase required for rRNA processing. *Mol Cell Biol* 17, 3398-3407.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J.**, 1982, Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945-951.
- Wang, Y. and Guthrie, C.**, 1998, PRP16, a DEAH-box RNA helicase, is recruited to the spliceosome primarily via its nonconserved N-terminal domain. *RNA* 4, 1216-1229.
- Watkins, N. J., Gottschalk, A., Neubauer, G., Kastner, B., Fabrizio, P., Mann, M. and Luhrmann, R.**, 1998, Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure. *RNA* 4, 1549-1568.
- Wu, P., Brockenbrough, J. S., Metcalfe, A. C., Chen, S. and Aris, J. P.**, 1998, Nop5p is a small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18 S rRNA processing in yeast. *J Biol Chem* 273, 16453-16463.
- Xi, X. G.**, 2007, Helicases as antiviral and anticancer drug targets. *Curr Med Chem* 14, 883-915.
- Xie, P.**, 2006, Model for helicase translocating along single-stranded DNA and unwinding double-stranded DNA. *Biochim Biophys Acta* 1764, 1719-1729.