

Université de Sherbrooke

**Caractérisation structurelle et fonctionnelle
d'un stimulateur d'épissage**

par

Lavanya Narasiah

Département de microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Sherbrooke, Québec, avril 1995



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-612-09500-2

Canada

30

- This memoir is dedicated to the memory of my grandmother Vishalakshi Krishnamurthy whose strength and "Lebenslust" which saw her through the hurdles of her life, were and will forever be a source of inspiration to me.

TABLES DES MATIERES

Tables des matières	III
Listes des illustrations	V
Liste des abréviations	VII
Résumé	IX
I. INTRODUCTION	1
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	15
1. Extraits nucléaires	15
2. Préparations des protéines SR	15
3. Digestions enzymatiques	15
4. Purification des fragments de DNA	15
5. PCR	16
6. Hybridation des oligonucléotides	18
7. Ligation	18
8. Transformation	19
9. Préparation de DNA plasmidique	20
10. Triage des clones après ligation	20
11. Séquencage	20
12. Transcription <i>in vitro</i>	21
13. Réactions d'épissage	23
14. Quantification par PhosphorImager	24
15. Essais de gels de rétention	25
16. Constructions plasmidiques	26
III. RÉSULTATS	29
1. Incapacité des motifs riches en purines de l'exon hnRNP A1 à stimuler l'utilisa- tion du site d'épissage 3' d'ED1 <i>in vitro</i>	32

2. Liaison des protéines SR aux éléments de l'exon 7B de hnRNP A1	35
3. Comportement des RNAs de l'exon 7B de hnRNP A1 dans les extraits nucléaires HeLa et S-100	38
4. Comportement des RNAs de l'exon 7B de hnRNP A1 dans les extraits nucléaires CB3C7, CB3C7-20 et DP27-17	43
5. Stimulation d'épissage par des motifs purines dégénérés	48
6. Essai sur un site d'épissage 3' différent	53
IV. DISCUSSION ET CONCLUSION	65
V. REMERCIEMENTS	80
VI. ANNEXES	81
VII. BIBLIOGRAPHIE	86

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.	Épissage <i>in vitro</i> de pré-mRNAs contenant une substitution de l'élément SE de fibronectine par des motifs riches en purines de l'exon 7B de hnRNP A1.....	30
Figure 2.	Les protéines SR peuvent lier les motifs riches en purines de l'exon 7B de hnRNP A1	33
Figure 3.	L'interaction de facteurs nucléaires avec l'exon 7B de hnRNP A1	36
Figure 4.	L'interaction de l'exon 7B de hnRNP A1 avec la protéine hnRNP A1	41
Figure 5.	Séquencage des éléments purines des constructions AF-Pu et A-ΦX7-F-Pu	44
Figure 6.	Stimulation de l'utilisation du site d'épissage 3' par des séquences de purines exoniques dans les constructions AF-Pu	46
Figure 7.	Stimulation de l'utilisation du site d'épissage 3' par des séquences de purines exoniques dans les constructions A-ΦX7-F-Pu	51
Légende pour les Tables A à E		54
Légende pour les Tables F et G		55

Tables des valeurs d'efficacité d'épissage des clones riches en purines:

Table A	56
Table B	57
Table C	58
Table D	59
Table E	60
Table F	61
Table G	62
Tableau 1. Efficacité relative d'épissage des mutants AF-Purines	63
Tableau 2. Efficacité relative d'épissage des mutants A- Φ X7-F-Purines	64
Tableau 3. Séquences exoniques riches en purines influencant l'épissage.....	72
Tableau 4. Influence du contexte sur la stimula- tion d'épissage par les motifs riches en purines	75

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

RNA	:	acide ribonucléique
DNA	:	acide désoxyribonucléique
A	:	adénine
C	:	cytosine
G	:	guanine
T	:	thymine
R	:	purines
Y	:	pyrimidines
μl	:	microlitre
ml	:	millilitre
L	:	litre
μg	:	microgramme
mg	:	milligramme
g	:	gramme
nm	:	nanomole
pmole	:	picomole
mM	:	millimolaire
M	:	molaire
s	:	seconde
min	:	minute
h	:	heure
°C	:	degré celcius
U	:	unités
nt	:	nucléotide(s)
pb	:	paire de bases
rpm	:	rotation par minute
CPM	:	coups par minute
Ci/m mole	:	Curie par millimole
tampon TBE	:	Tris, acide borique, EDTA
EDTA	:	éthylène diamine acide tetra-acétique
DEAE	:	diéthylaminoéthyl
TE	:	solution Tris - EDTA
PMSF	:	phényl méthyl sulfonyle de fluorure

SDS : dodécyl sulfate de sodium
EtOH : éthanol
H₂O : eau
DTT : dithiothréitol
BSA : bovine serum albumine
LB : L-Broth
iptg : isopropyl thiogalactoside
dNTP : nucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP)

RÉSUMÉ

Nous avons employé le pré-mRNA du gène de la fibronectine humaine comme modèle afin d'investiger le rôle des séquences exoniques dans le choix de sites d'épissage. Il a été précédemment démontré dans notre laboratoire qu'une séquence purinique de 9 nt (GAAGAAGAC) située dans l'exon alternatif ED1 pouvait stimuler l'utilisation *in vitro* du site d'épissage 3' en amont (Lavigneur et al., 1993. Genes Dev. 7: 2405-2417). Cet élément peut agir à partir de plusieurs endroits dans l'exon, peut stimuler l'épissage de sites 3' hétérologues ainsi qu'être reconnu par des protéines SR. Afin d'adresser la contribution de nucléotides à chaque position d'un tel élément stimulateur d'épissage, nous avons généré des variantes aux positions de purines. Premièrement, des oligonucléotides contenant une région dégénérée de 8 nt composée uniquement de purines, ont été cloné en aval du site d'épissage 3' d'ED1. Ainsi, nous avons vérifié la capacité de stimuler l'utilisation du site 3' d'ED1 pour plusieurs combinaisons de motifs puriniques. Nos résultats démontrent clairement que les motifs de purines n'ont pas tous une activité stimulatrice équivalente et que la force de leur stimulation dépend du contenu de leur séquence polypurine. De plus, il ne semble pas exister de patron particulier permettant de prédire l'efficacité d'un élément basé sur sa séquence. Ainsi, la présence d'un motif riche en purines dans un exon n'est pas en soi suffisant pour y associer une activité stimulatrice. Enfin, nos expériences suggèrent que plusieurs paramètres autre que la séquence influencent également l'activité d'un motif riche en purines, signalant la complexité et la prudence dans la définition des stimulateurs d'épissage de ce type.

I. INTRODUCTION

La plupart des gènes codant pour les protéines chez les eucaryotes supérieurs sont transcrits dans le noyau sous forme de RNA précurseurs (pré-mRNA). Dans ces molécules de pré-mRNAs, les séquences codantes sont arrangées en segments discontinus, nommés exons, interrompus par des séquences non-codantes ou introns. L'épissage, processus par lequel les introns sont excisés, permet alors la maturation vers les formes fonctionnelles de mRNA nécessaires à l'expression des gènes.

Le mécanisme biochimique général d'épissage a été élucidé chez la levure ainsi que dans les cellules de mammifères (Green, 1991). Des études *in vitro* (Ruskin et al., 1984; Padgett et al., 1984) et *in vivo* (Pikielny et al., 1983; Rodriguez et al., 1984; Domdey et al., 1984; Zeitlin et Efstratiadis, 1984) ont montré que l'épissage des pré-mRNAs s'effectue en deux étapes de réactions de transestérification. La première est la coupure au site d'épissage 5'. Les produits de cette réaction sont le premier exon (l'exon 5') ainsi qu'un intermédiaire en forme de lasso dans lequel le résidu guanosine de l'extrémité 5' de l'intron forme un lien phosphodiester avec le 2'OH du résidu adénosine près du site 3' d'épissage (site de branchement). La deuxième étape comporte le clivage au site 3' d'épissage simultanément à la ligation des exons via un lien phosphodiester 3'-5'. Ceci forme alors le RNA messenger mature et l'intron excisé sous forme de lasso (Frendewey et Keller, 1985; Maniatis, 1991).

Épissage constitutif

L'épissage s'effectue dans une grande structure ribonucléoprotéique appelée spliceosome. Ce dernier est assemblé de façon séquentielle par l'interaction entre le pré-

mRNA, les petites particules ribonucléoprotéiques (snRNPs) U1, U2, U4/U6 et U5 ainsi qu'un grand nombre de facteurs protéiques non-snRNPs (Krainer et Maniatis, 1988; Steitz, 1989; Bindereif et Green, 1990; Reed, 1990; Lamond, 1991; Green, 1991; Ruby et Abelson, 1991). L'épissage des pré-mRNAs implique une sélection précise des sites d'épissage 5' et 3' . Il y a quatre éléments de séquence, hautement conservés chez la levure mais moins chez les mammifères, requis pour l'efficacité de l'épissage, soit: 1) la séquence conservée à la jonction d'épissage 5', 2) le dinucléotide AG à la jonction d'épissage 3', 3) le site de branchement ou site de formation du lasso, 4) la région riche en pyrimidines de taille variable, le "polypyrimidine tract " (poly (Y)) (Padgett et al., 1986; Sharp, 1987; Krainer et Maniatis, 1988).

Ces éléments de séquences sont reconnus par des facteurs d'épissage, qui contribuent à la formation du spliceosome (Brody et Abelson, 1985; Frendewey et Keller, 1985; Grabowski et al., 1985; Chabot et Steitz, 1987). Ainsi, le snRNP U1 reconnaît le site 5' d'épissage en se liant à ce dernier, tandis que le snRNP U2 participe à la reconnaissance du site de branchement (Black et al., 1985; Chabot et al., 1985; Krainer et Maniatis, 1985; Zhuang et al., 1986). Dans ces deux cas, leur liaison implique l'interaction entre paires de bases complémentaires (Maniatis et Reed, 1987; Green, 1991; Rosbash et Séraphin, 1991; Michaud et Reed, 1991). La liaison du snRNP U2 au site de branchement nécessite auparavant celle de la protéine U2AF (U2 auxiliary factor) au poly(Y) (Ruskin et al., 1988; Zamore et Green, 1989). Bien que le snRNP U1 reconnaît la jonction 5', il influence également les interactions au site 3' (Zillman et al., 1987 et 1988; Côté et al., 1995). Subséquemment, les snRNPs U4/U5/U6 entrent dans le complexe, ceci complétant l'assemblage de base du spliceosome (Utans et al., 1992).

De plus, un certain nombre de facteurs protéiques, liant avec une certaine spécificité le poly(Y) et/ou le dinucléotide du site 3', ont été découverts. Ceux-ci incluent une protéine liant l'intron (IBP), qui semble être associée au snRNP U5 (Gerke et Steitz, 1986; Tazi et al., 1986), les particules nucléaires ribonucléoprotéiques hétérogènes, hnRNP A1, C1/C2, D et I/PTB (Swanson et Dreyfuss, 1988), liant le "polypyrimidine tract" (Garcia-Blanco et al., 1989; Gil et al., 1991; Patton et al., 1991).

De façon générale, plus la correspondance avec un consensus des quatre éléments de séquence décrits auparavant est significative, meilleure sera la liaison des facteurs d'épissage à ces sites (Nelson et Green, 1990; Zamore et al., 1992), qui seront alors utilisés préférentiellement comme sites d'épissage. Cependant, une séquence semblant bonne, ne sera pas toujours employée comme site d'épissage naturel et une séquence loin du consensus, sera parfois utilisée comme site d'épissage (Brunak et Engelbrecht, 1991; Jackson, 1991). Donc, bien qu'importants, les 4 éléments de séquence sont insuffisants pour justifier la haute spécificité avec laquelle s'effectue la discrimination entre introns et exons pour la sélection des sites d'épissage (Oshima et Gotoh, 1987; Senapathy et al., 1990).

Épissage alternatif

La complexité du mécanisme de sélection des sites d'épissage est amplifiée par l'existence de l'épissage alternatif. Les pré-mRNAs épissés de façon constitutive obéissent à une stricte fidélité dans le choix des sites d'épissage. Par contre, une flexibilité dans la reconnaissance des sites d'épissage soit 5' ou 3', forme la base de l'épissage alternatif, un mécanisme important dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression des gènes chez les eucaryotes (Smith et al., 1989; Green, 1991). Par ce mécanisme, un grand nombre de gènes peuvent

exprimer de multiples isoformes de protéines structurellement et fonctionnellement distinctes, à partir d'un transcrit primaire. Ce phénomène augmente alors la capacité de codage des gènes. Il y a plusieurs façons par lesquelles un pré-mRNA peut être épissé alternativement. Par exemple, l'utilisation de sites d'épissage 5' et/ou 3' alternatifs, l'omission d'exon, l'exclusion mutuelle d'exons ou la rétention d'introns (Smith et al., 1989; McKeown, 1992; Green, 1991; Maniatis, 1991). Le processus déterminant le patron d'épissage est souvent soumis à une régulation développementale ou histo-spécifique (Smith et al., 1989; Maniatis, 1991).

Ainsi, le mécanisme de choix des sites d'épissage doit d'un côté, être hautement spécifique pour ignorer les sites cryptiques, mais doit également être assez flexible afin de permettre l'épissage alternatif dépendant de l'état physiologique ou développemental de la cellule. Les mécanismes moléculaires responsable de la spécificité de sélection des sites d'épissage constitutif et alternatif commencent à peine à être déchiffrés.

En plus des éléments de séquence mentionnés et les facteurs de base du spliceosome, d'autres séquences et paramètres ont été impliqués dans la sélection des sites d'épissage.

Facteurs cis

Récemment, l'analyse systématique *in vivo* et *in vitro* de pré-mRNAs modèles a démontré que plusieurs éléments agissant de façon *cis* coopèrent pour définir la sélection de l'exon interne (Dominski et Kole, 1991 et 1992). En voici quelques uns.

1- La force d'un site 5' est définie par sa séquence, le contexte dans lequel il est situé, ainsi que sa proximité au site 3' (Aebi et al., 1987; Zhuang et al., 1987;

Fu et Manley, 1987; Nelson et Green, 1988; Petterson et Perry, 1989; Kuo et al., 1991; Lear et al., 1990).

2- La force d'un site 3' est définie par sa séquence, la position du site de branchement ainsi que la position et longueur du "polypyrimidine tract" (Fu et al., 1988; Noble et al., 1988; Reed et Maniatis, 1988; Smith et al., 1989; Wu et Manley, 1989; Zhuang et Weiner, 1989; Helfman et Ricci, 1989; Goux-Pelletan et al., 1990; Mullen et al., 1991).

3- L'assemblage des facteurs d'épissage avec des séquences à l'extrémité 3' de l'intron s'effectue de façon plus stable en présence d'un site 5' en aval (Robberson et al., 1990; Talerico et Berget, 1990; Kuo et al., 1991).

4- Dans certains transcrits, la sélection des sites d'épissage est influencé par les signaux de polyadénylation adjacents, (Luo et al., 1991; Niwa et al., 1991) ainsi que par le couplage de l'épissage à la transcription *in vivo* (Aebi et al., 1986; Beyer et al., 1988; Eperon et al., 1988).

5- Il a été noté que la longueur de l'exon (Furdon et Kole, 1988; Robberson et al., 1990; Black, 1991; Dominski et Kole, 1991) ou dans certains cas la formation de structures secondaires autour des sites d'épissage, peuvent influencer la sélection de ces sites (Solnick, 1985; Solnick et Lee, 1987; Eperon et al., 1988; Watakabe et al., 1989; Clouet et al., 1991; Libri et al., 1991; Estes et al., 1992). Par exemple, l'expression histo-spécifique *in vivo* de mRNA codant pour c- et N-src est déterminé par la longueur de l'exon interne dans le pré-mRNA. (Black, 1991)

6- Des séquences introniques autre que les séquences consensus peuvent également avoir un rôle dans la régulation. Ainsi, un élément de séquence présent dans l'intron en aval de l'exon N1 de c-src est requis pour son inclusion neuro-spécifique

(Black, 1992). Le gène de la β -tropomyosine du poulet contient une paire d'exons internes mutuellement exclusifs (6A et 6B) épissés de façon histo-spécifique. Des séquences présentes à l'extrémité 3' de l'intron ont un effet négatif sur la reconnaissance du site d'épissage 3' et à leur tour, des séquences à l'extrémité 5' de l'intron (environ 40 nt en aval du site 5') ont un effet positif sur la reconnaissance du site d'épissage 5' (Gallego et al., 1992).

7- Beaucoup d'évidences suggèrent que certaines séquences spécifiques contenues dans les exons ont un rôle dans la régulation de l'épissage. Dans ces études, par mutations des séquences exoniques, par substitution avec des séquences aléatoires ou par insertion de sites d'épissage dans différents endroits du pré-mRNA, le patron d'épissage observé en conditions normales fut aboli (Reed et Maniatis, 1986; Furdon et Kole, 1988; Nelson et Green, 1988). Les mécanismes moléculaires responsable de ces effets restent mal définis. Certaines séquences répriment l'utilisation de sites d'épissage adjacent (Gallego et al., 1992; Nemeroff et al., 1992; Siebel et al., 1992) alors que d'autres éléments exoniques agissent comme stimulateur d'épissage (Somasekhar et Mertz, 1985; Reed et Maniatis, 1986; Mardon et al., 1987; Ricketts et al., 1987; Helfman et al., 1988; Hampson et al., 1989; Streuli et Saito, 1989; Freyer et al., 1989; Tsai et al., 1989; Katz et Skalka, 1990; Nagoshi et Baker, 1990; Kakizuka et al., 1990; Libri et al., 1990; Ligtenberg et al., 1990; Fu et al., 1991; Hoshijima et al., 1991; Chain et al., 1991; Domenjoud et al., 1991; Guo et al., 1991; Ryner et Baker, 1991; Hedley et Maniatis, 1991; Cooper, 1992; Cote et al., 1992; Steingrimsdottir et al., 1992; Graham et al., 1992; Wakamatsu et al., 1992; Watakabe et al., 1993; Xu et al., 1993; Lavigueur et al., 1993).

Bien qu'un rôle central des séquences exoniques dans l'épissage est connu depuis quelque temps, ce n'est que dernièrement que

ces séquences ont commencé à être caractérisées (Lavigueur et al., 1993; Xu et al., 1993; Watakabe et al., 1993). Il a été remarqué que plusieurs de ces séquences exoniques nécessaires à l'épissage, contiennent des segments riches en résidus purines. Voici quelques exemples:

Il a été montré qu'une séquence riche en purines de 9 nt située dans l'exon alternatif ED1 de la fibronectine, pouvait stimuler l'utilisation *in vitro* du site d'épissage 3' en amont (Lavigueur et al., 1993) (voir plus loin).

Un élément stimulateur riche en purines a également été caractérisé dans l'exon alternatif (exon 5) du gène de la troponine T cardiaque (cTNT) chez le poulet. Ce dernier est requis pour l'épissage au site 3' avoisinant et facilite l'épissage d'exons alternatif et constitutif de gènes hétérologues (Cooper et Ordahl, 1989; Cooper, 1992; Xu et al., 1993).

Le dernier intron (intron D) du pré-mRNA de l'hormone de croissance bovine (bGH) est épissé de façon alternative dans la glande hypophyse, où une faible fraction du mRNA cytosolique retient l'intron D. (Hampson et Rottman, 1987; Cooke et al., 1988). L'épissage de l'intron D *in vitro* et dans des cellules transfectées, dépend d'un élément de 115 nt (élément FP) situé en aval dans l'exon 5. Cet élément est un stimulateur d'épissage exonique riche en purines qui active l'épissage de l'intron D en amont (Hampson et al., 1989; Sun et al., 1993; Dirksen et al., 1994). Un essai de compétition a révélé que l'influence de l'élément FP est médié par des interactions avec le facteur ASF/SF2, agissant en *trans* (Sun et al., 1993).

L'épissage entre les exons M1 et M2 du pré-mRNA de l'immunoglobuline μ (IgM) de souris nécessite une séquence polypurines contenue dans la partie 5' de l'exon M2. La délétion de cette partie 5' abolit l'épissage de l'intron en

amont. Par contre, lorsque la séquence purinique de la région délétée est réinsérée, l'épissage est rétablit. Ce même motif de l'exon M2 est capable de stimuler l'épissage d'un intron hétérologue possédant un site 3' sous-optimal (Watakabe et al., 1991, 1993).

D'autres exemples d'éléments stimulateurs riches en purines se retrouvent dans les gènes du virus sarco-leucémique aviaire (ASLV) (Katz et Skalka, 1990; Fu et al., 1991), de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (hprt) (Steingrimsdottir et al., 1992), de la β -tropomyosine du rat (Helfman et al., 1988; Tsukahara et al., 1994), ainsi que la calcitonine/CGRP (Yeakley et al., 1993).

Ainsi, bien que toutes les stimulateurs d'épissage exoniques constitutifs caractérisés jusqu'à présent consistent en des séquences riches en purines, les séquences précises requises pour l'activité sont encore mal définies.

Facteurs trans

Plusieurs facteurs agissant en trans pour moduler l'épissage constitutif et alternatif ont été identifiés. Les premières évidences de l'existence de ces types de protéines ont été rapportées suite à des études sur la hiérarchie des évènements d'épissage alternatif dans la détermination de sexe chez la *Drosophile*. Chez cette dernière, trois gènes, sex lethal (Sxl), transformer (tra) et transformer 2 (tra-2) codent pour des protéines modulant la sélection des sites d'épissage (Bingham et al., 1988; Baker, 1989; Maniatis, 1991). Par exemple, en empêchant la liaison du facteur essentiel U2AF au "polypyrimidine tract", le facteur Sxl inhibe spécifiquement l'utilisation du site d'épissage 3' en amont. (Valcarcel et al., 1993). Un des éléments exoniques le mieux caractérisé est présent dans l'exon femelle spécifique du gène doublesex (dsx) chez la drosophile. Dans ce cas, une séquence répétée de 13 nt

présente dans l'exon femelle spécifique et située à plus de 300 nucléotides du site d'épissage 3', est requise pour l'utilisation de ce site (Nagoshi et Baker, 1990; Hedley et Maniatis, 1991; Hoshijima et al., 1991). L'activation du site 3' est alors médiée par la liaison de transformer (tra) et transformer 2 (tra-2) à cet élément répété (Tian et Maniatis, 1992).

Les résultats obtenus sur le mécanisme d'épissage constitutif suggèrent que des différences dans les quantités ou activités de facteurs généraux d'épissage, participent également dans la régulation de l'épissage alternatif. Les protéines SR représentent une famille de phosphoprotéines nucléaires conservées dans l'évolution (Zahler et al., 1992). Plusieurs cellules animales expriment une série de protéines SR de masse moléculaire: 20, 30, 40, 55, et 70-75kD (Roth et al., 1991; Zahler et al., 1992). Deux polypeptides distincts de 30 kD ont été identifiés, soit ASF/SF2 (Krainer et al., 1991; Ge et al., 1991) et PR264/SC35 (Vellard et al., 1992; Fu and Maniatis, 1992). Très récemment, un autre membre de cette famille, le facteur 9G8 (35kD) fut identifié (Cavaloc et al., 1994).

Ces protéines contiennent toutes un ou plusieurs motifs de reconnaissance de RNA en N-terminal (RRM) ainsi qu'un domaine C-terminal composé presque uniquement de résidus serine et arginine en position alternées. Les RRM dirigent les interactions avec le RNA. Bien que la fonction exacte du domaine Arg/Ser n'est pas encore claire, ce domaine est essentiel pour l'épissage et pourrait jouer un rôle dans le ciblage nucléaire des facteurs d'épissage (Li et Bingham, 1991).

Ces protéines isolées des vertébrés et invertébrés fonctionnent comme facteurs d'épissage essentiels lorsqu'analysés dans des essais de déplétion et de reconstitution (Krainer et Maniatis, 1985; Krainer et al., 1991; Ge et al., 1991; Mayeda et al.,

1992a; Zahler et al., 1992). Elles sont requises pour l'assemblage du spliceosome ainsi que pour la première étape de la réaction d'épissage (Fu et Maniatis, 1992; Krainer et al., 1990a et 1990b; Ge et Manley, 1990). Également, les protéines SR, en compagnie de tra et tra-2 sont des composantes essentielles d'un complexe stimulateur d'épissage du site 3', du pré-mRNA doublesex de la Drosophile (Tian et Maniatis, 1993). Dans la famille des protéines SR, ASF/SF2 et SC35 sont les facteurs les mieux caractérisés. ASF/SF2 est associé avec une activité "RNA annealing" pouvant possiblement aider à la formation de paires de bases complémentaires entre les RNAs d'U1 et/ou d'U2 et le pré-mRNA (Krainer et al., 1990a; Kohtz et al., 1994). Dans les étapes précoces de l'assemblage du spliceosome, SC35 joue un rôle pour médier l'interaction entre U1 et U2AF sur le pré-mRNA (Fu et Maniatis, 1992; Wu et Maniatis, 1993). Cette proposition repose sur la démonstration que les protéines SR peuvent interagir entre elles via une interaction protéine-protéine (Wu et Maniatis, 1993; Amrein et al., 1994), avec la protéine U1 70K du snRNP U1 (Wu et Maniatis, 1993; Kohtz et al., 1994), ainsi qu'avec U2AF³⁵ (Wu et Maniatis, 1993).

Les protéines SR stimulent non seulement la liaison du snRNP U1 au site 5' (Eperon et al., 1993; Kohtz et al., 1994), mais également la liaison d'U2AF et l'association du snRNP U1 avec le site d'épissage 3' (Staknis et Reed, 1994a et b). Ces données ainsi que les travaux passés (Eperon et al., 1993; Michaud et Reed, 1993; Wu et Maniatis, 1993; Zamore et Green, 1992; Kohtz et al., 1994; Amrein et al., 1994) sont en faveur d'un modèle proposant que les protéines SR participent au rapprochement des sites d'épissage 5' et 3' dans le complexe E (complexe d'engagement) présplíceosomal via un réseau d'interactions impliquant le snRNP U1 et U2AF.

ASF/SF2 et SC35 modulent la sélection de sites d'épissage alternatifs 5' et 3' d'une façon dépendante de leur

concentration (Ge et Manley, 1990; Krainer et al., 1990b; Fu et al., 1992). Ainsi *in vitro*, à haute concentration, ces deux protéines favorisent l'utilisation de sites proximaux 5' ou 3'. Contrairement, la protéine hnRNP A1 antagonise l'action de ASF/SF2 en favorisant l'utilisation de sites 5' distaux (Mayeda et Krainer, 1992; Yang et al., 1994). Cependant, hnRNP A1 n'a pas d'effet démontré sur le choix du site 3' (Fu et al., 1992). L'augmentation de l'utilisation du site 5' proximal par ASF/SF2 semble être due à une hausse dans la force de liaison du snRNP U1 (Eperon et al., 1993).

Des études récentes démontrent que l'addition de grandes concentrations de protéines SR purifiées peuvent rétablir l'activité d'épissage dans les réactions déplétées des snRNPs U1 (Crispino et al., 1994; Tarn et Steitz, 1994). Il est proposé qu'en présence d'une grande concentration de protéines SR, le snRNP U1 ne serait pas essentiel pour la formation du spliceosome car les protéines SR palieraient au rôle de U1 en liant le substrat de façon directe et ainsi stabilisant l'association subséquente du snRNP U2 (Crispino et al., 1994).

Plusieurs études ont révélé des variations dans les quantités relatives de protéines SR dans différentes cellules, types tissulaires ou états de différenciation. Ces observations suggèrent que ces variations pourraient jouer un rôle dans la régulation histo-spécifique des choix de sites d'épissage (Zahler et al., 1993a).

Épissage alternatif de la fibronectine

Les fibronectines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire retrouvées dans le plasma, sur les surfaces cellulaires ainsi que dans les matrices extracellulaires. Par leur liaison aux macromolécules telle le collagène, la fibrine et l'héparine, les fibronectines jouent un rôle important dans

plusieurs processus de contact chez les vertébrés comme l'attachement et la migration cellulaire, le développement embryonnaire, la guérison des plaies, l'hémostase, l'opsonisation et la transformation oncogénique (Hynes, 1985; Owens et al., 1986).

La fibronectine est un dimère composé de sous unités identiques ou semblables et démontre une très grande hétérogénéité. De façon fonctionnelle, il est possible de distinguer deux types majeures de fibronectine:

- la fibronectine cellulaire, synthétisée par les fibroblastes et d'autres types cellulaires.
- la fibronectine plasmatique, synthétisée par les hépatocytes.

Toutes deux sont composées d'un mélange de plusieurs types protéiques qui diffèrent par leur structure primaire ainsi que par leur modifications post-traductionnelles. Toutes les variations de séquence de ces monomères de fibronectine sont produites par l'épissage alternatif d'un pré-mRNA commun, transcrit d'un même gène (Kornblihtt et al., 1985; Owens et al., 1986; Schwarzbauer et al., 1987). Trois régions d'épissage alternatif ont été décrites chez l'humain et le rat : IIICS, ED1 (ou EDIIIA) et ED2 (ou EDIIB). Les patrons d'épissage de chaque région varient entre les différents tissus, lignées cellulaires, dans l'organogénèse et la carcinogénèse. Il est rapporté que l'épissage alternatif histo-spécifique de la région ED1 est dérégulé dans les tumeurs malignes du foie de manière à augmenter la production de mRNA contenant cet exon. (Oyama et al., 1989). De la même façon, l'épissage alternatif de la region ED2 est dérégulé dans les tissus atteints du cancer du poumon (Oyama et al., 1990). Les exons alternatifs ED1 et ED2 sont retrouvés dans la fibronectine cellulaire mais non dans la fibronectine plasmatique.

Dans notre laboratoire, nous avons choisis la région ED1 du gène de la fibronectine comme système modèle naturel de

l'épissage alternatif afin d'étudier le rôle des séquences exoniques dans le choix des sites d'épissage. Il a été précédemment montré qu'une séquence de 81 nt située dans la région centrale de l'exon ED1 de 270 nt, était essentielle pour l'inclusion de cet exon dans les cellules HeLa (Mardon et al., 1987). Notre laboratoire a effectué une série d'expériences *in vitro* afin de mieux comprendre les aspects structurels et fonctionnels de cet élément de 81 nt. Ainsi, en utilisant des substrats chimères de pré-mRNAs modèles adénovirus/fibronectine, il fut observé que cet élément peut stimuler de façon significative, l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon ED1 (Lavigueur et al., 1993). Par une caractérisation plus poussée de ce motif, il a été remarqué que ce dernier pouvait stimuler l'épissage au site 3' d'ED1 à partir de plusieurs endroits dans l'exon, soit en aval ou amont de sa position en temps normal. Ainsi, en rapprochant l'élément de la jonction 3', l'effet de stimulation fut accrue, mais lorsque déplacé plus de 293 nt en aval, la stimulation fut abolie. Un autre aspect de cet élément purinique est qu'il peut stimuler l'épissage de pré-mRNAs contenant des sites 3' hétérologues, tel une séquence procaryotique (Φ X174) et la β -globine humaine, ceci avec des efficacités variables. Par contre, aucun effet stimulateur ne fut observé avec une construction d'adénovirus. Ces résultats suggèrent une influence sur l'utilisation du site d'épissage 3', de façon que plus le site d'épissage 3' est faible, plus grande sera la stimulation par l'élément. De par ses caractéristiques, ce motif fut alors dénoté l'élément SE pour stimulateur d'épissage ou "splicing enhancer". Par l'étude comparative des séquences de la région ED1 provenant de plusieurs espèces, il a été remarqué qu'une suite de 9 nt riche en purines était conservé entre l'humain, le rat, le poulet et Xenopus. Par des analyses de remplacement et de délétion, la séquence purinique de 9 nucléotides (GAAGAAGAC) fut montré responsable de la stimulation observée. Des résultats d'essais de compétition, utilisant des quantités croissantes d'un

fragment de RNA de 140 nt contenant l'élément SE ont suggéré que la stimulation est médiée par la liaison de facteurs à cet élément. Ainsi, il a été montré que les protéines SR interagissent de façon spécifique avec le motif riche en purines de l'exon ED1 de la fibronectine (Lavigne et al., 1993).

Étant donné qu'on observe une variabilité entre les séquences des éléments stimulateurs riches en purines connus jusqu'à présent (FN, TNTc, IgM, bGH), nous avons débuté nos études en adressant le rôle potentiellement stimulateur des séquences riches en purines existant dans le gène hnRNP A1 épissé de façon alternative. De façon générale, les résultats d'expériences sur les éléments de l'exon 7B d'hnRNP A1 ont suggéré que la présence de segments exoniques riches en purines n'était pas en soi suffisante pour stimuler l'épissage. Ainsi, dans le but de fournir une définition plus précise d'un élément stimulateur purinique, nous avons tenté d'établir la contribution en nucléotides à chaque position d'un élément stimulateur de ce type, en employant des variantes aux positions de purines du motif original de l'exon ED1 de fibronectine décrit précédemment. Par vérification de chaque combinaison pour sa capacité de stimuler l'épissage au site 3', nous démontrons clairement que les séquences riches en purines n'ont pas toutes une activité stimulatrice équivalente. De plus, bien que l'effet stimulateur dépend de la séquence de polypurines, il ne semble pas y avoir un consensus ou patron particulier permettant de corrélérer une combinaison particulière de purines, avec un degré de stimulation. Enfin, nos expériences ont dévoilé que de nombreux paramètres (autre que la séquence) influencent également l'activité d'un motif riche en purines, rendant leur caractérisation plus complexe que prévue.

II. MATERIEL ET METHODES

1. EXTRAITS NUCLEAIRES

Les extraits nucléaires et fractions S-100 ont été préparés selon la méthode de Dignam et al. (1983), à partir de cellules HeLa, DP27-17, CB3C7 et CB3C7-20 .

2. PRÉPARATIONS DES PROTÉINES SR

Les protéines SR ont été purifiées à partir de thymus de veau suivant la méthode décrite par Zahler et al. (1992).

3. DIGESTIONS ENZYMATIQUES

Les digestions enzymatiques de DNA ont été effectuées selon les recommandations des manufacturiers d'enzymes de restriction (Amersham, Pharmacia, Promega, New England Biolabs).

4. PURIFICATION DES FRAGMENTS DE DNA POUR CLONAGE

L'échantillon de DNA est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Le fragment voulu est découpé du gel, placé dans une membrane à dialyse et soumis au courant électrique à travers un tampon TBE 0,5X. Le DNA est ensuite purifié sur colonne de DEAE-52. Brièvement, la colonne est établie en gonflant le DEAE-52 dans du TE (10 mM Tris pH 8,0, EDTA 1 mM) + 0,1M NaCl. Des solutions de TE + 1M NaCl, TE seul et TE + 0,1M NaCl sont consécutivement passées à travers la colonne. L'échantillon est ensuite introduit. Si le fragment est de taille supérieure ou égale à 1000 pb, la colonne est lavée avec une solution de TE + 0,3M NaCl. Par contre, si le fragment est entre 500 à 1000 pb., une solution de TE + 0,2M NaCl est utilisé. L'ADN est élué avec une solution de TE + 1M NaCl,

extrait au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1), précipité avec 2 volumes d'EtOH et resuspendu dans un volume approprié d'H₂O (bidistillée et autoclavée).

Pour la purification de fragments inférieurs à 100-pb, le fragment est découpé à partir d'un gel d'acrylamide 8% (non-dénaturant) coloré au bromure d'étidium. La bande est broyée dans 400 µl d'une solution d'acétate de sodium 0,3 M, 0,2% SDS (filtrée) et le DNA est élué par agitation douce pendant 3 h. Après centrifugation à 12, 000 rpm pendant 3 min, le surnageant est recueilli, extrait au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) et précipité dans 3 volumes d'EtOH à -80°C pendant 20 min. Une deuxième centrifugation à 12,000 rpm pendant 10 min permet d'obtenir un culot qui est resuspendu dans un volume approprié.

5. PCR

L'exon 7B du gène d'hnRNP A1 a été synthétisé par PCR, à l'aide des oligonucléotides suivants:

LAL1: 5' - AGGCCTGCAGTGGTTATGGA -3'

LAL2: 5' - TCTAGAATTCACTACCACCG -3'

Le mélange réactionnel pour la réaction de PCR est la suivante: 4 µl de DTT 100 mM, 10 µl de tampon PCR 10X (100 mM Tris pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, et 3 µg/µl de BSA), 2,5 µl dNTPs (10 mM dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 1 µl de BSA (3 µg/µl) et 80 µl d'H₂O. À ce mélange, est ajouté 1 µl de plasmide contenant l'exon 7B en entier (pCMVSV40 A1B 0,05 µg/µl), préalablement chauffé dans l'eau bouillante pendant 5 min et rapidement refroidi sur glace. Ensuite, 1 µl (15 pmole) de chaque oligonucléotide (~ 0,1 µg/µl pour un 20-mer) ainsi que 1 µl de Taq DNA polymérase sont ajoutés. 100 µl d'huile minérale est

déposée sur l'échantillon et l'amplification procède selon le programme "Touchdown" de l'appareil PCR.

Une fois la procédure complétée, le DNA est extrait avec un volume égal de phénol : chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) et précipité dans 3 volumes d'EtOH 100% avec NaCl (concentration finale de 0,2 M) et 2 µl de glycogène 35 µg/µl, à -80°C pendant 20 min. Le culot obtenu après centrifugation à 12,000 rpm pour 10 min est lavé, séché et resuspendu dans 10 µl d'H₂O. La concentration du fragment de DNA est estimée sur gel d'agarose.

Programme PCR Touchdown (Modifié de Don et al., 1991):

- | | | | |
|-----|---|---------------|---------------|
| 1. | 94°C , 1,5 min. | 71°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 2. | 94°C , 1,5 min. | 69°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 3. | 94°C , 1,5 min. | 67°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 4. | 94°C , 1,5 min. | 65°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 5. | 94°C , 1,5 min. | 63°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 6. | 94°C , 1,5 min. | 61°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 7. | 94°C , 1,5 min. | 59°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 8. | 94°C , 1,5 min. | 57°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 9. | 94°C , 1,5 min. | 55°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 10. | 94°C , 1,5 min. | 53°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 11. | 94°C , 1,5 min. | 51°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 12. | 94°C , 1,5 min. | 50°C , 2 min. | 72°C , 3 min. |
| 13. | RETOUR À L'ÉTAPE 12 ET RÉPÉTER 15X OU PLUS. | | |
| 14. | 72°C, 15 min. | | |
| 15. | 4°C, 12 h. | | |

6. HYBRIDATION DES OLIGONUCLÉOTIDES RICHES EN PURINES

Nous avons commandé la synthèse d'oligonucléotides contenant une région dégénérée de 8 nt composée uniquement de purines (R) ou de pyrimidines (Y).

Bsu36I StuI

EcoRI

PRS-U: 5'- TGAGGCCTRRRRRRRRR CTCG -3'

PRS-D: 3'- CCGGAYYYYYYYY GAGCTTAA -5'

Ces oligonucléotides ont été appariés dans un mélange contenant 10 µl de chaque type d'oligonucléotides à 0,1 µg/µl, 20 µl de tampon "One for All" (Pharmacia) et 160 µl d'H₂O. Le mélange a été chauffé dans l'eau à 100°C pendant 5 min et immédiatement placé dans l'appareil PCR pour poursuivre le programme suivant:

1.	92°C	1 heure
2.	87°C	"
3.	72°C	"
4.	65°C	"
5.	56°C	"
6.	50°C	"
7.	40°C	"
8.	35°C	"
9.	30°C	"
10.	4°C	"

7. LIGATION

Les clonages de DNA dans les vecteurs d'expression ont été effectués selon la méthode standard de Sambrook et al. (1989). Le mélange (10 µl) contient 1,25 mM de rATP, 1 µl volume de tampon "One for All" (Pharmacia), 1 µl de ligase T4 (6,700 Weiss U/ml, Pharmacia), le DNA plasmidique linéarisé (0,1 à 0,5 µg) et le tout complété avec l'H₂O. Les proportions

molaires d'insert : vecteur utilisées ont été d'environ 3:1. Dans le cas des ligations avec les oligonucléotides riches en purines/pyrimidines hybridés, un excès molaire de 100X a été employé. Le mélange est incubé pour 2 à 4 h à la température de la pièce ou à 4 °C pour la nuit.

Traitement par Klenow

Dans la construction du clone pAdEDA-7Bex, suite à la ligation EcoRI/EcoRI de l'extrémité 3' terminal de l'exon 7B (insert) avec le vecteur, un remplissage à la Klenow a été effectué pour permettre la ligation de l'autre extrémité. Ainsi, 1 mM de dNTP, 2U/μg d'enzyme Klenow (Pharmacia) et du tampon 1X "One for All" (Pharmacia) ont été ajoutés. L'échantillon a été incubé à 30 °C pendant 15 min et l'enzyme Klenow fut inactivée à 65 °C pour 10 min.

8. TRANSFORMATION

Le mélange ligationnel est ajouté à 100 μl de cellules compétentes (*E.coli* DH5α) et placé sur glace pendant 30 min, puis à 42 °C pour 90 s et retourné sur glace pour 1 à 2 min. À ce mélange est ajouté 500 μl de milieu de culture LB (pour 1L: 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g d'NaCl) avec ou sans ampicilline et le tout est incubé à 37°C pour 30 min. S'il s'agit d'un plasmide contenant le gène lacZ, 10 μl d'Xgal 250 mg/ml et 20 μl d'IPTG 500 mM sont ajoutés. Environ 200 μl de ce mélange est étalé par pétri agar contenant ampicilline (100 μg/ml). Les pétris sont placés dans un incubateur à 37°C pour la nuit. En vue de préparer le DNA plasmidique, les colonies sont piquées et incubées dans 2 ml de LB avec ampicilline pour la nuit à 37°C avec agitation.

9. PRÉPARATION DE DNA PLASMIDIQUE

Les minipréparations rapide de DNA ont été effectués par la technique de lyse alcaline selon Sambrook et al. (1989). La méthode de purification de DNA plasmidique par gradient de chlorure de césium (CsCl) (Chabot, 1994) a été employée afin de produire des préparations à plus grande échelle.

10. TRIAGE DES CLONES APRES LIGATION

Les clones qui ont incorporé la séquence riche en purines ont été identifiés par l'analyse des produits de digestion aux enzymes de restriction appropriés.

11. SÉQUENCAGE

La séquence des motifs de purines incorporés dans chaque mutant a été identifiée à l'aide du T7-sequencing™ kit de Pharmacia, suivant le protocole fourni par le manufacturier. Les réactions de séquence ont été effectuées sur le DNA plasmidique provenant des mini-préparations obtenues par lyse alcaline. Les amorces de DNA étant de 20 pb, 2 µl d'une solution de DNA de 5 µg/ml a été employé par réaction. Le (alpha-³²P) dCTP (Amersham) a été utilisé pour le marquage et les conditions des réactions de séquence ont été établies pour la "courte lecture". La réaction de polymérisation fut assurée par le DNA polymérase du bactériophage T7 à partir de l'amorce synthétique complémentaire à une région en amont de la région à séquencer.

mutants	amorce utilisée
-pAd-ED-R:	oligonucléotide ED-S1
-pAd-ΦX7-ED-R:	oligonucléotide X-LAV

Les échantillons ont été déposés sur un long gel mince dénaturant de 5% d'acrylamide: bis-acrylamide (38:2)/7M urée, pré-migré auparavant pendant 90 min à une puissance constante de 25 watts. La migration s'est effectuée à 20 watts et le gel fut autoradiographié avec film XRP (sans écran) pour la nuit à -80°C.

12. PRÉPARATION DES SUBSTRATS PAR TRANSCRIPTION *in vitro* :

À 2,5 µg de vecteur linéarisé sont ajoutés 2,5 µl de rNTP (A:C:G en proportion 5:5:1 mM), 2,5 µl d'UTP 100 µM, 1 µl de GpppG (cap) 10 mM (Pharmacia), 5 µl de tampon 5XSP6 filtré (200 mM Tris pH 7.5, 30 mM MgCl₂, 10 mM spermidine; 50 mM DTT (dithiothréitol)), 1 µl de RNA guard (Pharmacia), 1 µl de RNA polymérase T3, T7 ou SP6 (Pharmacia), 5 µl de UTP (alpha-³²P, 800 Ci/mme, Amersham) lyophilisé et un volume approprié d'H₂O, pour un total de 25 µl. Pour la synthèse d'un transcrit de taille supérieure à 700 nt, 5 µl ³²P-UTP et 5 µl UTP 100 µM ont été utilisés. Pour la transcription des mutants riches en purines, 5 µl UTP 100 µM et 2,5 µl ³²P-UTP ont été utilisés.

Lorsque des RNAs sont produits par digestion avec oligonucléotides et RNase H (Chabot, 1994), 0,1 µg (15 pmoles) de deoxyoligonucléotides et 1 µl de RNase H (Pharmacia) sont ajoutés au mélange transcriptionnel.

Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 1 h, 10-15 µl de colorant formamide (95% v/v formamide, 10 nM EDTA pH 8.0, 0,1% pd/v de bleu bromophénol et 0,1% pd/v de xylène cyanol; filtré) est ajouté et la solution est chauffée à 100°C pendant 90 s. Les échantillons sont déposés sur un gel dénaturant de 5 ou 8% d'acrylamide : bis-acrylamide (38:2)/7 M urée. La migration s'effectue dans un tampon TBE 1X (pour un volume 1L: 10,8 g de base Tris, 5,5 g d'acide borique et 4 ml EDTA 0,5 M pH 8,0), à 200 volts. Le gel est exposé sur film XAR pendant 30-90 s. La bande correspondante à la sonde est découpée et broyée dans

400 µl d'une solution filtrée de 0,3M d'acétate de sodium, 0,2% SDS.

Le DNA est élué par agitation douce pendant 3 h. Après une centrifugation à 12,000 rpm pendant 3 min, le surnageant est recueilli, extrait au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) et précipité dans 3 volumes d'EtOH 100% à -80°C, pendant 20-30 min. Une centrifugation de 10 min à 12,000 rpm permet de recueillir un culot qui est lavé à l'EtOH et séché. Le substrat marqué est resuspendu dans 25 µl d'H₂O (bidistillée et autoclavée).

Pour certains transcrits faits à partir des plasmides pKA1-7Bex et pAdEDA-7Bex, la digestion à la RNase H s'est effectuée après la transcription. Ainsi, selon les conditions optimales établies, 0.001 µg d'oligonucléotide A1B2 ou 0,002 µg d'oligonucléotide A1B3, ainsi que 0,5 µl de RNase H ont été ajoutés au mélange et incubé à 37°C pendant 5 min.

La transcription de RNA dans le cas des nombreux mutants riches en purines, ne s'est pas effectuée à partir de DNA purifié sur gradient de chlorure de césium. Plûtôt, le DNA provenant des mini-préparations a été resuspendu dans du TE + RNase A et ces échantillons ont ensuite été traités à la protéinase K afin d'inactiver toute activité ribonucléasique. Ainsi, dans un volume final de 500 µl contenant 0,1% de SDS, 100 à 200 µg/ml de protéinase K et 1X de tampon "One for all" (Pharmacia), le DNA est incubé à 37°C pendant 1 h, extrait 3 fois au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1), précipité à l'EtOH 100% à -80°C pour 20 min et resuspendu dans l'H₂O (bidistillée et autoclavée).

13. RÉACTIONS D'ÉPISSAGE

Un mélange standard d'épissage pour une réaction contient 1 μ l d'ATP 12.5 mM, 1 μ l de $MgCl_2$ 80 mM, 1 μ l de créatine phosphate 0,5 M, 5 μ l de polyvinyl alcool 13%, 0,5 μ l de RNA guard (Pharmacia) et 0,5 μ l de DTT 100mM. À ce mélange gardé sur glace, 10-15 μ l d'extrait nucléaire et 1 μ l de RNA substrat marqué au ^{32}P sont ajoutés. Si nécessaire, le tampon D (20 mM Hepes pH 7.9, 100 mM KCl, 20% glycérol, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF et 0,5 mM DTT) est utilisé pour compléter le volume à 25 μ l. Généralement des 1/2 réactions d'épissage (12,5 μ l) sont effectuées utilisant, 5000 CPM de substrat marqué, 5 μ l d'extrait nucléaire, 5 μ l du mélange d'épissage et 2,5 μ l de tampon D.

Pour les extraits nucléaires CB3C7, CB3C7-20 et DP27-17, 1 μ l de créatine kinase 1 μ g/ μ l est ajouté et le volume total est complété avec 1,5 μ l de tampon D.

L'échantillon est incubé à 30°C pendant 2 h. Ensuite, 300 μ l d'une solution de 0,3 M d'acétate de sodium et 0,2% SDS (filtré) est ajouté. Le tout est extrait au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) et précipité dans 3 volumes d'EtOH 100% avec 2,5 μ l de tRNA de levure (10 μ g/ μ l), à -80°C pendant au moins 20 min. Après une centrifugation de 10 min, le culot est lavé, séché et resuspendu dans 5 μ l de colorant formamide. L'échantillon est chauffé à 100°C pendant 90 s et déposé sur un gel dénaturant de 5% d'acrylamide: bis-acrylamide (38:2)/7M urée. La migration s'effectue à 20 watts. Le gel est enfin transféré sur du papier Whatman, recouvert de papier Saran Wrap^R et exposé sur un film XRP (avec écran) à -80°C pour une nuit.

14. QUANTIFICATION PAR PHOSPHORIMAGER

Le gel transféré sur papier Whatman est séché et ensuite exposé pour 24 h sur l'écran cassette du PhosphorImager.

Exemple de calculs

L'intensité des bandes sur le gel d'épissage est quantifiée par la fonction "integrate volume" du programme "MOLECULAR DYNAMICS":

produit du substrat d'essai : a
bruit de fond : r
pré-mRNA (transcrits) du substrat d'essai : b
pré-mRNA (transcrits) du contrôle interne : c
produit du contrôle interne : d

Pour les valeurs calculées sans correction à l'aide d'un contrôle interne:

1. L'efficacité d'épissage des substrats d'essais ont été estimés par le rapport:

$$\text{produit lasso/pré-mRNA substrat} = \frac{a - r}{b}$$

* Étant donné que les valeurs de bruit de fond (r) étaient négligeables comparativement aux valeurs quantifiées de pré-mRNA du substrat d'essai (b), il n'a pas été soustrait de ces valeurs, ceci n'influençant pas les résultats du rapport d'efficacité d'épissage calculés.

2. En attribuant une valeur arbitraire de 10 pour l'efficacité d'épissage du témoin positif AF+9 nt ou A-φX7-F/S employé, des valeurs relatives à ce témoin ont été calculées pour les substrats d'essais.

Ex.: valeur d'efficacité d'épissage du témoin positif:

$$\frac{a-r}{b} = 0,029$$

b

valeur d'efficacité d'épissage d'un substrat d'essai:

$$\frac{a-r}{b} = 0,0019$$

b

En supposant pour le témoin positif que $0,029 = 10$

Alors l'efficacité d'épissage relatif du substrat d'essai sera = $\frac{10 \times 0,0019}{0,029} = 0,6$

15. ESSAI DE GELS DE RETENTION

À 9 µl d'un mélange d'épissage (1 µl rATP 12,5 mM, 1 µl MgCl₂ 80 mM, 1 µl créatine phosphate 0,5 M, 5 µl de polyvinyl alcool 13%, 0,5 µl DTT 100 mM et 0,5 µl de RNA guard (Pharmacia)), 1 µl de transcrit marqué au ³²P (~5000 CPM) est ajouté. Ensuite, 2 µl de ce mélange est incubé sur glace pendant 10 à 15 min avec 3 µl d'extrait nucléaire, de protéines SR ou 3 µl de tampon D (témoin). L'héparine est ajoutée à une concentration finale de 2 mg/ml. Enfin, 0,5 µl de colorant d'agarose est ajouté et l'échantillon est déposé sur un gel de 5% acrylamide: bis-acrylamide (29:1) avec 5% de glycérol, préparé avec un tampon Tris-Glycine (1X final). Le gel est pré-migré pendant 30 min à 150 volts et la migration des échantillons s'effectue à 190 volts. Les gels sont transférés sur papier Whatman et exposés sur film XRP (sans écran) pour la nuit à -80°C.

CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES

La description des constructions de clones est présentée ci-dessous de façon séquentielle. Pour les conditions d'isolations de fragments ainsi que digestion par les enzymes de restriction, de ligation et de traitement à la Klenow, se référer à la section Matériel et Méthodes (pp.15 et 18).

La majorité des constructions présentées dans ce travail ont été faites à partir de fragments provenant du clone pAdED (#167), fait par Alain Dorais. Cette construction est décrite dans l'annexe A et dans Lavigueur et al. (1993).

On retrouve également dans l'annexe A tous les plasmides employés pour parvenir aux clones décrits ici ainsi que ceux utilisés pour l'étude de l'épissage *in vitro* et les expériences de réticulation aux u.v.

p K⁺-A17Bex (#220)

Ce plasmide a été construit par l'insertion d'un fragment de DNA amplifié de l'exon 7B du gène hnRNP A1 synthétisé par PCR (voir p. 16), aux sites PstI et EcoRI présents dans le "polylinker" du vecteur pBluescript KS (+/-) de Stratagene. Le plasmide pCMVSV40A1B, contenant l'exon 7B en entier et utilisé pour l'amplification au PCR, fut éliminé dans le tube de ligation par traitement avec l'enzyme de restriction NcoI.

Le site de restriction EcoRI a été utilisé pour linéariser le vecteur et effectuer la transcription *in vitro* d'un RNA 7B (~157nt) à partir du promoteur T7.

pAdEDA-7Bex (#221)

Le plasmide pAdEDA-7Bex a été obtenu par l'insertion d'un fragment de DNA 7B (175pb) coupé par SmaI et EcoRI, provenant du clone pK⁺-A17Bex, dans le vecteur pAdED (Annexe A) coupé aux sites Bsu36I et EcoRI (3610pb). Ainsi, suite à la ligation des extrémités RI/RI, un remplissage à la Klenow de l'extrémité Bsu 36I de pAdED a permis la ligation de l'extrémité SmaI de l'insert 7B. Le vecteur seul pAdED interférant, fut éliminé par un traitement de l'échantillon avec l'enzyme NcoI.

Ce plasmide a servi pour la préparation des transcrits de RNAs AF-7B, par linéarisation au site EcoRI et transcription *in vitro* à partir du promoteur SP6.

pAdEDA-Pu (construction de base des mutants)

Les clones pAdEDA-Pu ont été obtenus par ligation aux sites Bsu36I et EcoRI du vecteur pAdED, d'un mélange d'oligonucléotides hybridés riches en purines (PRS-U/PRS-D; p. 18), présent en excès molaire de 100X. La vérification et sélection des mutants ayant incorporé l'insert riche en purines se sont effectuées par digestion avec l'enzyme de restriction StuI.

Ces clones ont servis pour la préparation des transcrits de RNAs AF-Pu et Mt/S, par linéarisation aux sites EcoRI et StuI respectivement et ensuite transcription *in vitro* à partir du promoteur SP6.

pK⁺A1-7B8 (#234)

Ce plasmide a été construit par l'insertion d'un fragment de l'exon 7B, provenant du clone pK⁺-A17Bex, aux sites PstI et BstXI du vecteur pK⁺893 (Annexe A). Pour ce faire, le vecteur pK⁺893 fut digéré par PstI et partiellement par BstXI

(55°C/10min) et le fragment (3700pb) fut isolé sur gel d'agarose 0,8% et purifié par électroélution (180 volts/1h 15min). L'insert 7B de 80 pb coupé par PstI et BstXI, fut isolé sur gel d'acrylamide non dénaturant de 8% et la purification s'est effectué selon les conditions décrites à la p. 16 de Matériel et Méthodes.

Le site de restriction BamHI a été utilisé pour linéariser le vecteur et effectuer la transcription *in vitro* d'un RNA 7B-8 à partir du promoteur T3.

pAd-ΦX7-EDA-Pu (construction de base des mutants)

Les clones pAd-ΦX7-EDA-Pu ont été obtenus par ligation aux sites Bsu36I et EcoRI du vecteur pΦX7 (Annexe A), d'un mélange d'oligonucléotides hybridés riches en purines (PRS-U/PRS-D; p. 18), en excès molaire de 100X. La vérification et sélection des mutants ayant incorporé l'insert riche en purines se sont effectuées par digestion avec les enzymes de restriction StuI et PvuII.

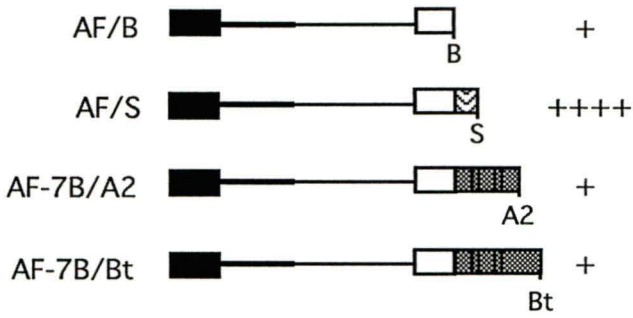
Ces clones ont servis pour la préparation des transcrits de RNAs A-ΦX7-F-Pu, par linéarisation aux sites EcoRI et transcription *in vitro* à partir du promoteur SP6.

III. RÉSULTATS

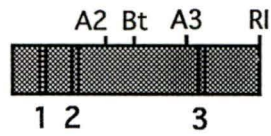
Figure 1. Épissage *in vitro* de pré-mRNAs contenant une substitution de l'élément SE de fibronectine par des motifs riches en purines de l'exon 7B de hnRNP A1.

(A) Représentation schématique des pré-mRNAs vérifiés pour l'épissage *in vitro*. Boîtes: séquences exoniques; lignes horizontales: introns. Substrats chimères Adénovirus/Fibronectine: AF et Adénovirus/Fibronectine/hnRNP A1: AF-7B. L'exon ED1 de fibronectine (boîte claire) est divisé en deux parties afin d'illustrer la position de l'élément SE (boîte ondulée). Boîtes noires: séquences exoniques d'adénovirus; boîtes ombragées: séquences de l'exon 7B de hnRNP A1. Les positions des sites de restriction BstEII (B) et StuI(S) dans l'exon ED1 et BstXI(Bt) dans l'exon 7B utilisés pour générer les transcrits, sont illustrées. L'extrémité créée dans l'exon 7B par digestion dirigée avec l'oligonucléotide A1B2 (A2) est indiquée. (B) Épissage *in vitro* des substrats indiqués en A. Les pré-mRNAs ont été incubés pour 2 h dans un extrait nucléaire HeLa et leurs produits séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant de 5%. Les positions des pré-mRNAs (P), produits lasso (I) et les intermédiaires en lasso (L) sont indiquées. L'efficacité relative d'épissage au site 3' d'ED1 indiqué est basé sur la production de l'intron lasso. (C) Les motifs riches en purines de l'exon 7B d'hnRNP A1 (souris) sont indiqués.

A

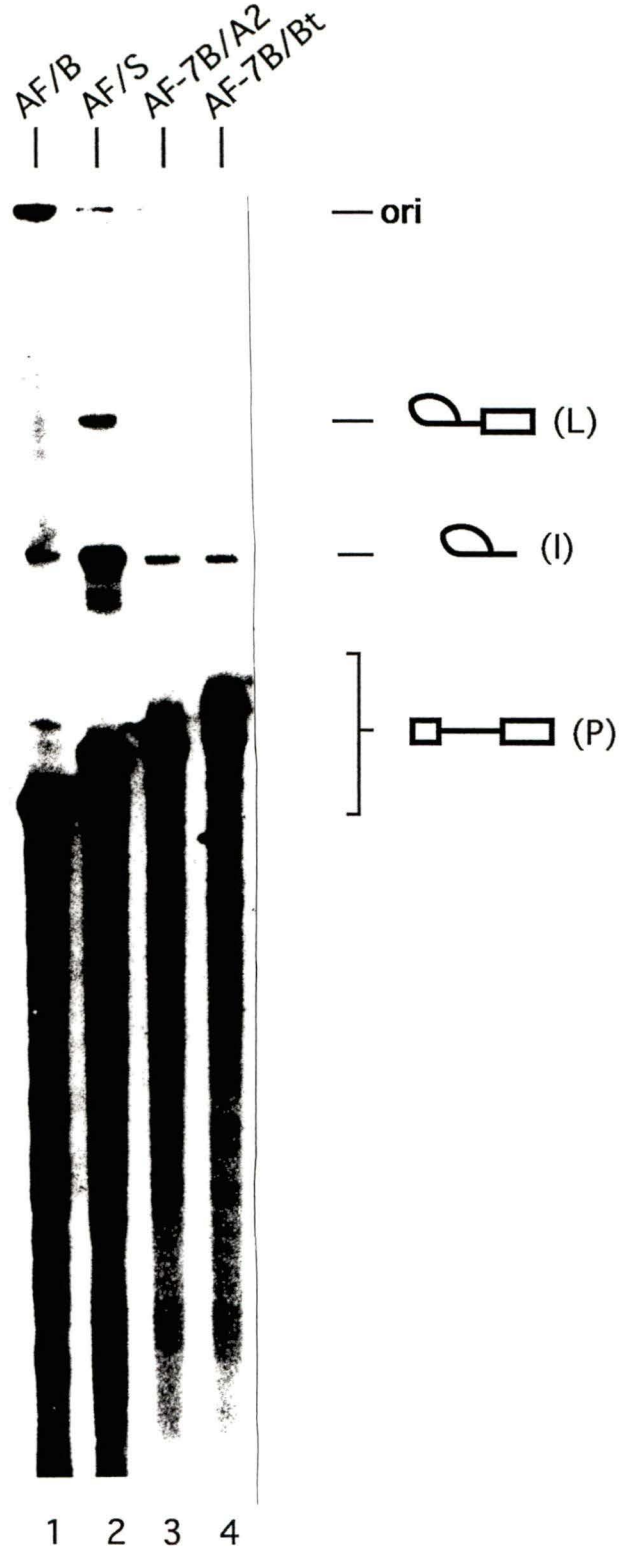


C



1: GGAGGAGGC
 2: GGAGGAAGC
 3: GGAGGAGGC

B



Incapacité des motifs riches en purines de l'exon 7B de hnRNP A1 à stimuler l'utilisation du site d'épissage 3' d'ED1 *in vitro*.

Plusieurs études démontrent l'existence d'éléments exoniques riches en purines agissant comme stimulateur d'épissage dans divers gènes. Suite à des expériences *in vitro*, notre laboratoire a démontré qu'une séquence de 9 nucléotides riche en purines présente dans l'exon ED1 de fibronectine stimulait l'épissage au site 3' en amont (Lavigneur et al., 1993). Afin de vérifier le rôle stimulateur possible de motifs riches en purines retrouvés dans l'exon 7B du pré-mRNA de hnRNP A1, nous avons construit des pré-mRNAs chimères pour étude *in vitro*. La construction de base AF/S contient l'exon L1 d'adénovirus, un intron hybride de 408 nucléotides et les premiers 180 nucléotides de l'exon ED1 de fibronectine incluant l'élément SE en entier (Fig. 1A). Cet RNA est épissé efficacement *in vitro* (AF/S; Fig. 1B, piste 2), tandis que la délétion de SE provoque une réduction considérable de l'épissage L1/ED1 (AF/B; Fig. 1B, piste 1). Nous avons remplacé l'élément SE de fibronectine par des séquences de l'exon 7B de hnRNP A1 contenant des motifs riches en purines (Fig. 1C), afin d'évaluer la capacité de ces derniers à stimuler l'utilisation du site d'épissage 3' d'ED1 (Fig. 1A). Avec les transcrits AF-7B/A2 et AF-7B/Bt nous n'observons qu'un faible niveau d'épissage, comparable au contrôle négatif AF/B délété de l'élément stimulateur de fibronectine (Fig. 1B, pistes 3, 4). Ces résultats indiquent que les deux premiers éléments riches en purines de l'exon 7B ne réussissent pas à stimuler l'épissage L1/ED1 *in vitro*.

A

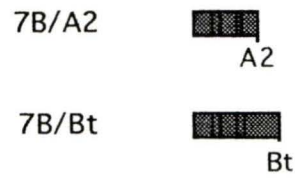
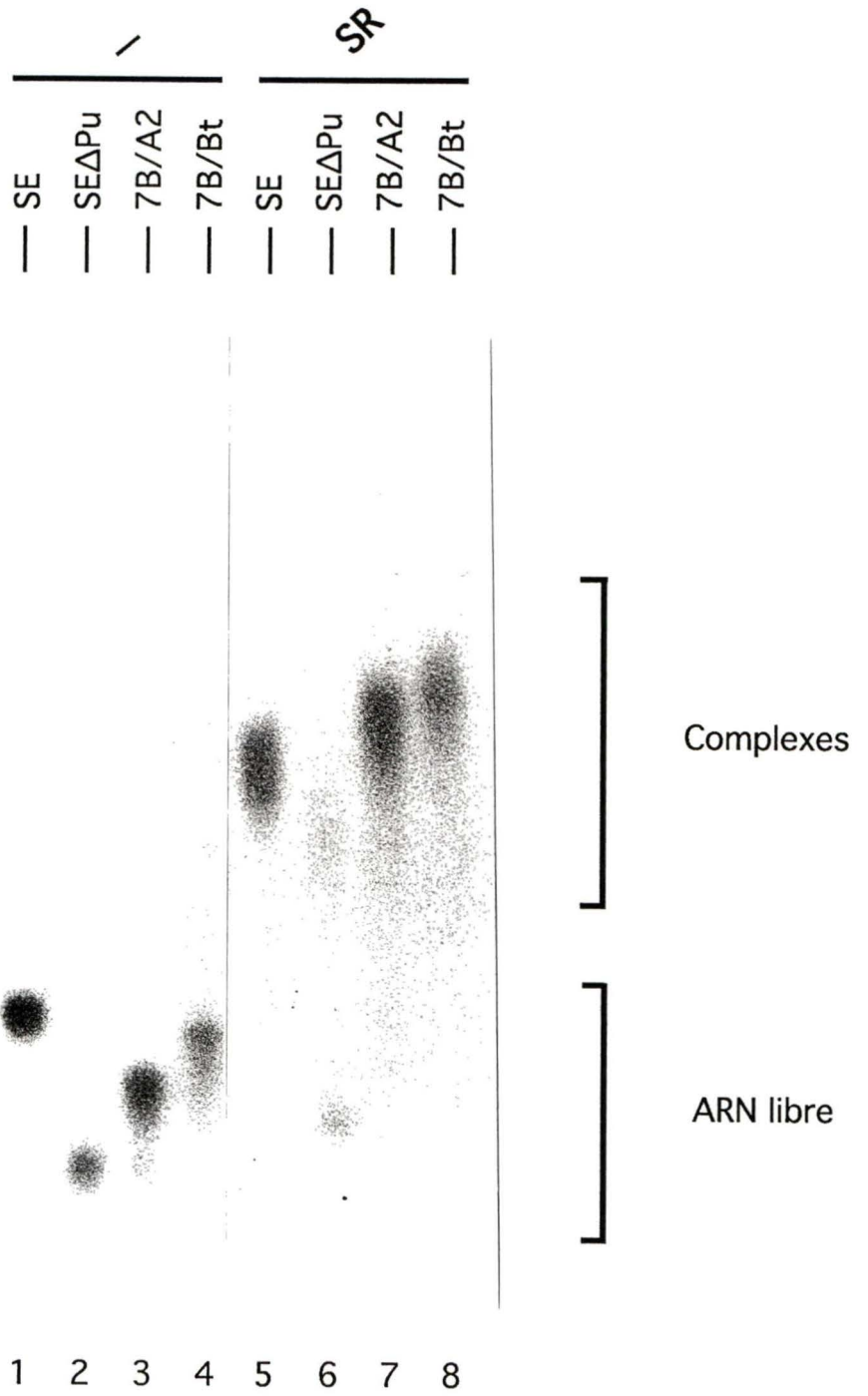


Figure 2. Les protéines SR peuvent lier les motifs riches en purines de l'exon 7B de hnRNP A1.

Le RNA SE contient l'élément SE en entier (BstEII à StuI) ainsi que 64 nucléotides à l'extrémité 5' dérivés du vecteur de transcription. SE Δ Pu est une version raccourcie de SE d'environ 45 nucléotides à l'extrémité 3' (oligo FN 1394) donc sans le motif riche en purines. (A) Les sites BstXI (Bt) et de l'oligonucléotide A1B2 (A2) employés pour générer les deux RNAs de l'exon 7B ainsi que les motifs riches en purines (raies ombragées) sont illustrés. (C) Les RNAs marqués au ³²P ont été incubés à 0°C en présence de 0,75 μ l de protéines SR purifiées du thymus de veau (pistes 5, 6, 7, 8). Les complexes RNA-protéines ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant contenant 5% de glycérol. Les positions des RNAs libres et complexes sont indiquées.

B



Liaison des protéines SR aux éléments de l'exon 7B de hnRNP A1.

Afin de vérifier l'interaction des protéines SR avec les motifs riches en purines de l'exon 7B, nous avons effectué des essais de gels de rétention avec des protéines SR purifiées à partir de thymus de veau. Comme il a été déjà constaté par Lavigueur et al. (1993), le RNA SE est considérablement retardé lorsque incubé avec les protéines SR (Fig. 2, piste 5). Par contre, l'incubation de ces protéines avec le RNA SEAPu, délété pour les séquences essentielles à l'activité stimulatrice, ne démontre pas ce type d'association stable car le RNA se retrouve sous forme libre en proportion non négligeable (Fig. 2, piste 6). Le retard de migration de 50% du RNA SEAPu observé comparativement à 100% avec le RNA SE, s'expliquerait par une interaction de type affinité générale (non-spécifique) entre les protéines SR et le RNA SEAPu, qui serait dépendante de la concentration. Les protéines SR interagissent donc de façon spécifique avec l'élément SE de l'exon ED1 de fibronectine (Lavigueur et al., 1993). Lorsque nous avons testé les séquences de l'exon 7B dans ce type d'essai, nous avons observé un retard dans la migration des RNAs 7B/A2 et 7B/Bt lorsqu'incubés en présence de protéines SR (Fig. 2, pistes 7, 8). Ces résultats suggèrent que les protéines SR sont capable d'interagir avec les deux premiers éléments riches en purines présents dans l'exon 7B de hnRNP A1.

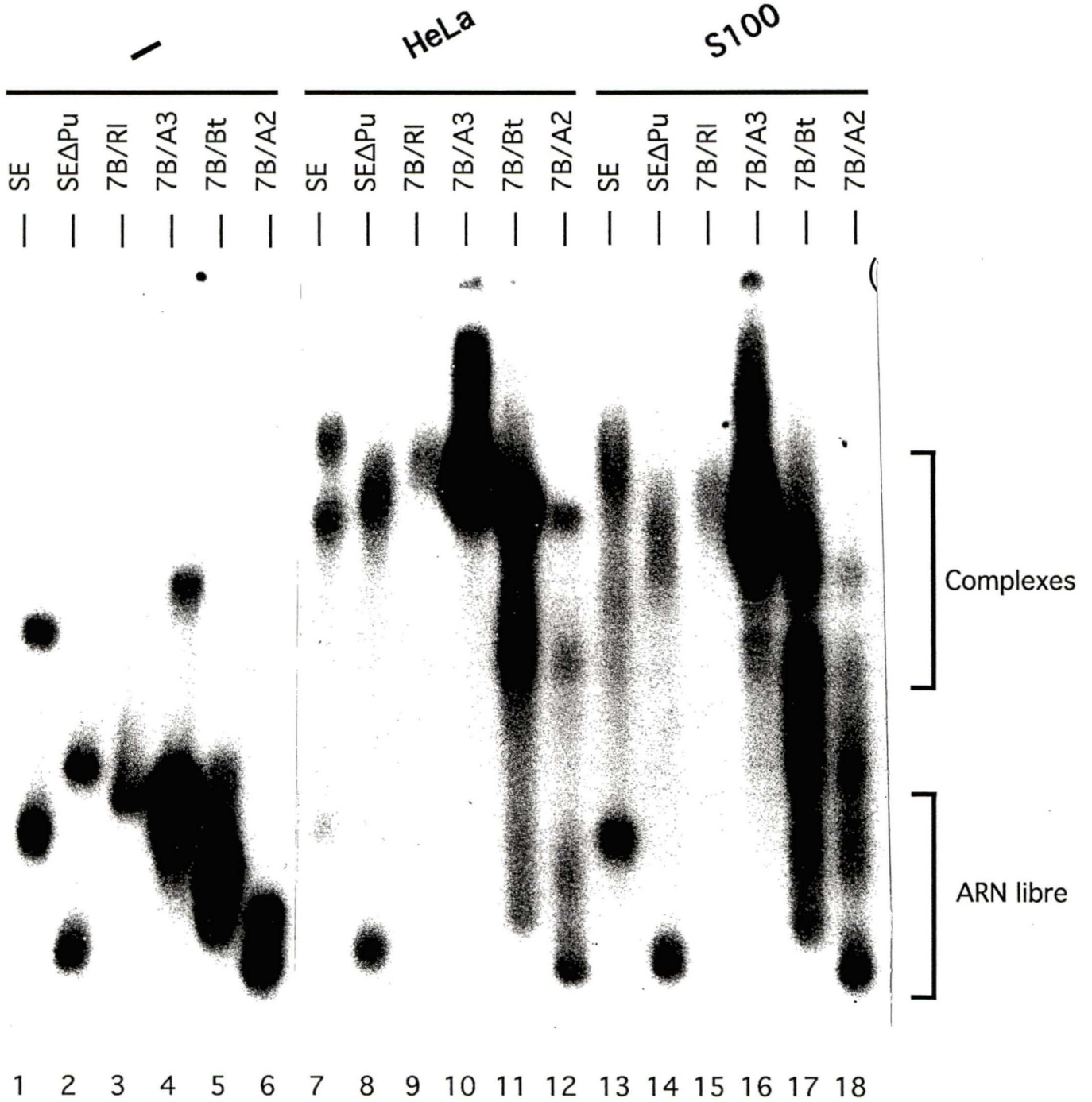
A



Figure 3. L'interaction de facteurs nucléaires avec l'exon 7B de hnRNP A1.

Les sites de restriction EcoRI (RI), BstXI (Bt) et les oligonucléotides A1B2 (A2) et A1B3 (A3) ont été utilisé pour générer les différents RNAs de l'exon 7B du gène hnRNP A1, à partir de pK⁺-A17Bex. Ces sites sont illustrés dans la figure ci-haute (3A). Raies ombragées: motifs riches en purines (voir Fig.1C). Les RNAs marqués au ³²P ont été incubés à 0°C en présence de 3 µl d'extrait nucléaire HeLa (3B, pistes 9, 10, 11, 12) ou 3 µl de Hela S100 (3B, pistes 15, 16, 17, 18). Les complexes RNA-protéine ont été séparés sur un gel non-dénaturant de polyacrylamide 5% contenant 5% de glycérol. Les positions des RNAs libres et complexes sont indiquées.

B



Comportement des RNAs de l'exon 7B de hnRNP A1 dans les extraits nucléaires HeLa et S-100.

Nous avons ensuite vérifié le comportement des RNAs contenant les motifs riches en purines de l'exon 7B dans des extraits nucléaires. Pour ce faire, nous avons effectués des gels de rétention avec des RNAs de l'exon 7B de taille croissante, le plus petit comportant deux motifs riches en purines (RNA 7B/A2) et le plus long en comportant trois (RNA 7B/R1). Les RNAs SE et SEAPU, décrits auparavant, ont été utilisés comme témoins expérimentaux.

L'incubation dans les extraits HeLa montre un changement de mobilité de tous les RNAs de l'exon 7B (Fig. 3, pistes 9, 10, 11, 12). Par contre dans le cas des dérivés plus petits, soit 7B/Bt et 7B/A2, nous observons une diminution dans l'efficacité d'association avec les facteurs nucléaires, étant donné qu'une bonne proportion de RNA migre sous-forme libre (Fig. 3, pistes 11, 12). Ceci semble suggérer un rôle du contexte dans lequel les motifs purines se retrouvent pour la reconnaissance par les facteurs présents dans les extraits. Nous avons aussi utilisés des extraits S-100 pour les expériences de rétention. Les extraits S-100 sont déficients dans l'épissage dû à une concentration trop faible en protéines SR (Krainer et al., 1990a; Mayeda et al., 1992b; Zahler et al., 1993b). Dans le cas des essais effectués avec les extraits S-100, nous observons encore une fois une migration totale sous forme complexée des RNAs 7B/R1 et 7B/A3, cependant à une position plus basse que dans l'extrait HeLa. Cette différence de mobilité observé pourrait correspondre à la liaison de protéines SR résiduelles dans l'extrait S100, ainsi que la différence de concentration de facteurs nucléaires entre les deux extraits (A. Lavigueur et B. Chabot, résultats non-publiés). De plus, la réduction progressive de la taille du RNA 7B provoque une réduction de l'efficacité de l'interaction

avec les composantes de l'extrait S-100 (Fig. 3, pistes 17, 18).

Les résultats obtenus dans les extraits HeLa et S-100 peuvent être interprétés de plusieurs façons. Premièrement, il est possible que les motifs de l'exon 7B constituent de très bons sites de liaison pour les protéines SR, car tous les RNAs de 7B démontrent un retard de migration, même dans l'extrait S-100, ne contenant qu'une très faible quantité de ces facteurs. Ainsi, la différence remarquée entre un extrait nucléaire et un extrait S-100, en ce qui a trait à la position des complexes formés avec les RNAs 7B/R1 et 7B/A3 et à la baisse dans l'efficacité de formation des complexes avec les RNAs 7B/Bt et 7B/A2, pourrait être attribuée à une plus faible concentration de protéines SR dans l'extrait S-100. De plus, la réduction du nombre de motifs riches en purines et le changement de contexte de ces derniers, par l'utilisation des RNAs de taille décroissante, pourrait également contribuer à influencer la migration des RNAs.

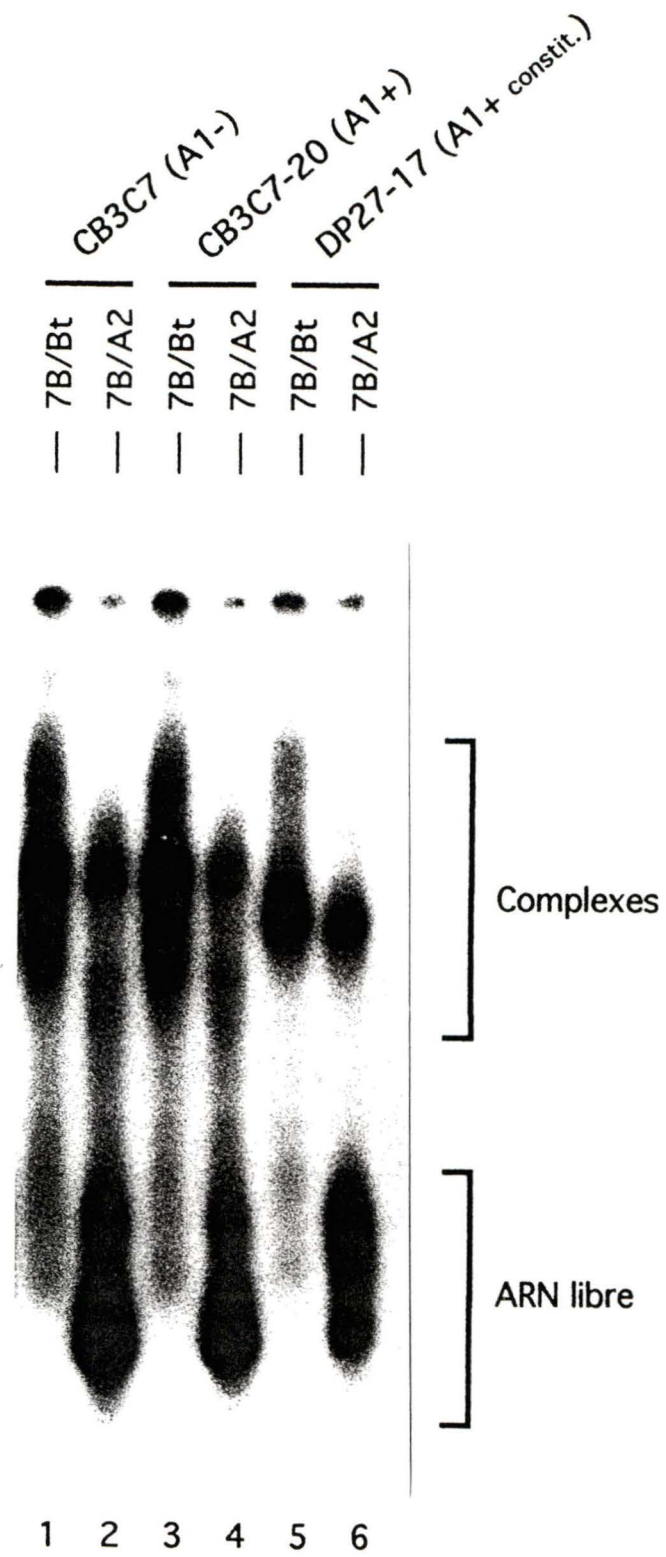
Il existe une autre explication permettant de réconcilier les différences observées avec les protéines SR purifiées et avec les extraits nucléaires HeLa et S-100. Il est possible que d'autres facteurs nucléaires, présent dans les deux types d'extraits, lient les motifs de purines ou d'autres séquences, de façon à interférer ou à déstabiliser la liaison par les protéines SR. Ainsi, tous les patrons de migration retardés, soit dans les extraits HeLa ou S-100, seraient causés par l'interaction de protéines autre que les protéines SR. Dans ce cas, les différences de retard remarqués entre l'extrait HeLa et S-100, pourrait s'expliquer simplement par la présence d'une plus faible concentration de ces facteurs non-identifiés dans l'extrait S-100.

Enfin, il est possible que des sites de liaison pour les protéines SR se situent au début de l'exon 7B, soit jusqu'au

site A1B2 (A2) ou BstXI (Bt) et que la deuxième partie de l'exon possède une région purines pouvant lier les SR et des régions de liaison pour d'autres facteurs nucléaires. Donc dans le contexte de l'exon 7B entier (RNA 7B/R1) ou presque entier (RNA 7B/A3), tous les facteurs seraient liés de façon stable, causant les retards observés dans les extraits HeLa et S-100. Par contre, dans le cas des RNAs de taille plus faible, la présence des autres facteurs nucléaires libres de l'extrait pourrait en partie interférer avec la liaison par les protéines SR, ceci diminuant l'efficacité de formation des complexes observés pour les RNAs 7B/A2 et 7B/Bt lorsqu'incubés dans ces milieux. Les différences de patrons observées entre les deux extraits HeLa et S-100, pourraient encore s'expliquer par des concentrations inégales de facteurs nucléaires entre ces deux types de préparations.

Figure 4. L'interaction de l'exon 7B de hnRNP A1 avec la protéine hnRNP A1.

Les RNAs utilisés sont identiques à ceux de la Fig. 2. Les transcrits marqués au ^{32}P ont été incubés à 0°C en présence de $0,75 \mu\text{l}$ d'extrait nucléaire CB3C7 (pistes 1, 2), $0,75 \mu\text{l}$ d'extrait CB3C7-20 (pistes 3, 4) ou $0,75 \mu\text{l}$ d'extrait DP27-17 (pistes 5, 6). Les complexes ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant contenant 5% de glycérol. Les positions des RNAs libres et complexés sont indiquées.



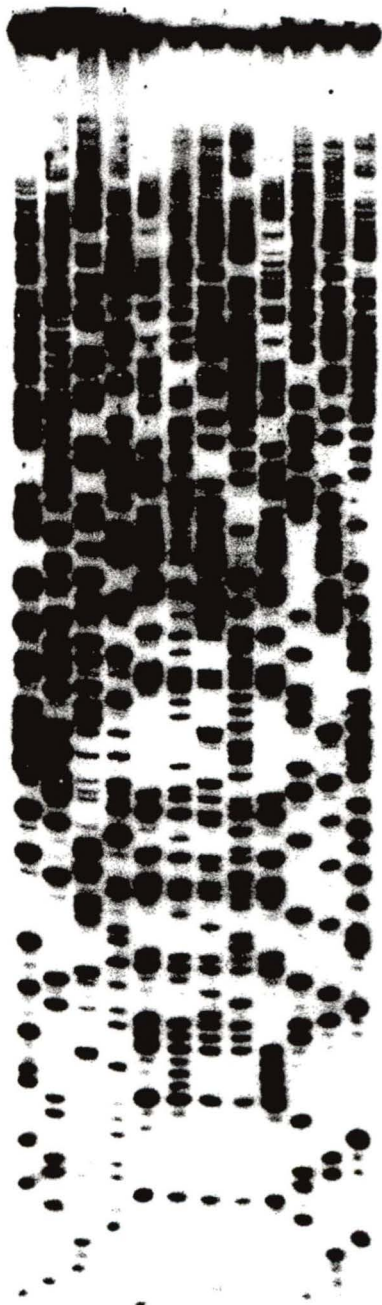
Comportement des RNAs de l'exon 7B de hnRNP A1 dans les extraits nucléaires CB3C7, CB3C7-20 et DP27-17.

Il a été démontré que la protéine nucléaire hnRNP A1 interfère avec l'activité des protéines SR dans la sélection des sites d'épissage 5' *in vitro* (Mayeda et Krainer, 1992b). Afin d'étudier l'interaction possible des protéines hnRNP A1 avec les motifs riches en purines de l'exon 7B, nous avons procédé à des essais de gels de rétention en utilisant des extraits nucléaires dérivés d'une lignée cellulaire érythroleucémique de souris (MEL). La lignée DP27-17 exprime A1 de façon constitutive, tandis que CB3C7 est déficiente dans son expression (Ben-David et al., 1992). Les cellules CB3C7-20 ont été rétablies stablement pour l'expression de A1 (Y. Ben David et B. Chabot, résultats non-publiés). Dans tout ces extraits, soit en présence ou en absence de hnRNP A1, on observe des patrons de migration retardés (Fig. 4, pistes 1, 2, 3, 4, 5, 6). Il est intéressant de noter que les profils de retardation obtenus dans les extraits CB3C7 (A1-) et CB3C7-20 (A1+) sont identiques. La migration des complexes dans l'extrait DP27-17 est légèrement différente probablement à cause d'une différence dans la concentration des facteurs nucléaires entre les extraits CB3C7 et DP27-17. De façon générale, ces résultats montrent que les deux premiers motifs purines de l'exon 7B n'interagissent pas de façon forte avec les facteurs nucléaires. Par contre, étant donné que l'on observe une meilleure efficacité de formation de complexes dans tous les extraits pour le RNA 7B/Bt comparativement au RNA 7B/A2, il semble que la présence de la séquence (riche en purines ou non) entre A1B2 et BstXI favorise une interaction relativement forte avec des facteurs nucléaires quelconque. Il ne semble cependant pas que la protéine hnRNP A1 soit impliquée dans ces interactions.

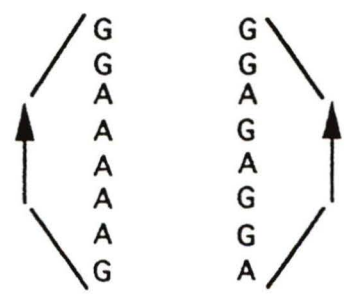
Figure 5. Séquencage des éléments purines des constructions
AF - Pu et A- Φ X7-F-Pu.

Pour chaque clone, la séquence du motif de purines a été identifiée. Le plasmide pAdEd (avec l'oligonucléotide ED-SI) a été employé comme contrôle permettant la vérification de la présence et site d'insertion du motif dégénéré de 8 nt riches en purines dans les clones mutants. Pour les réactions de séquences dans le cas des substrats AF-Pu, l'oligonucléotide ED-SI fut utilisé, tandis que pour les constructions A- Φ x7-F-Pu, l'oligonucléotide X-LAV a été employé. Des exemples de lecture des motifs riches en purines des mutants suite à des réactions de séquence employant les nucléotides A, G, C, T ou seulement A et G sont illustrés.

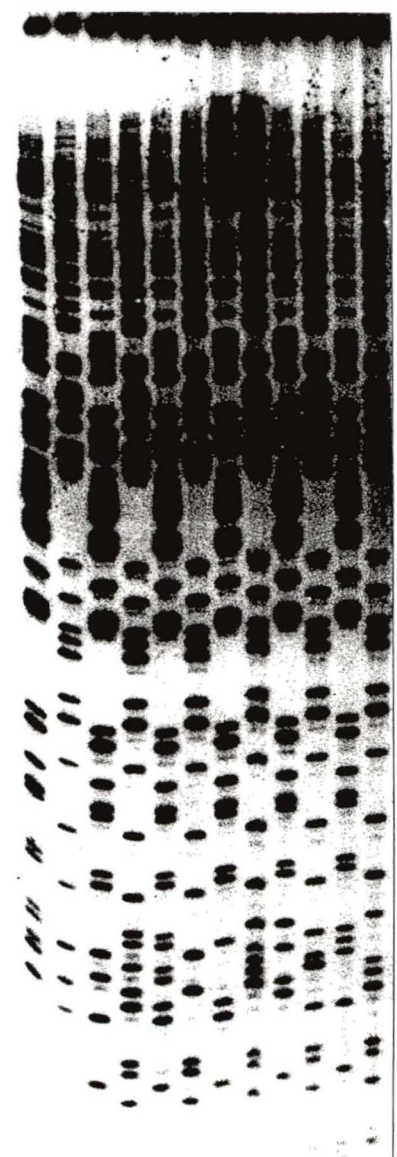
Contrôle mutant
 A G C T



1 2 3 4



Contrôle mutants
 A G A G A G A G A G



1 2

A

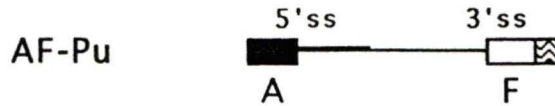
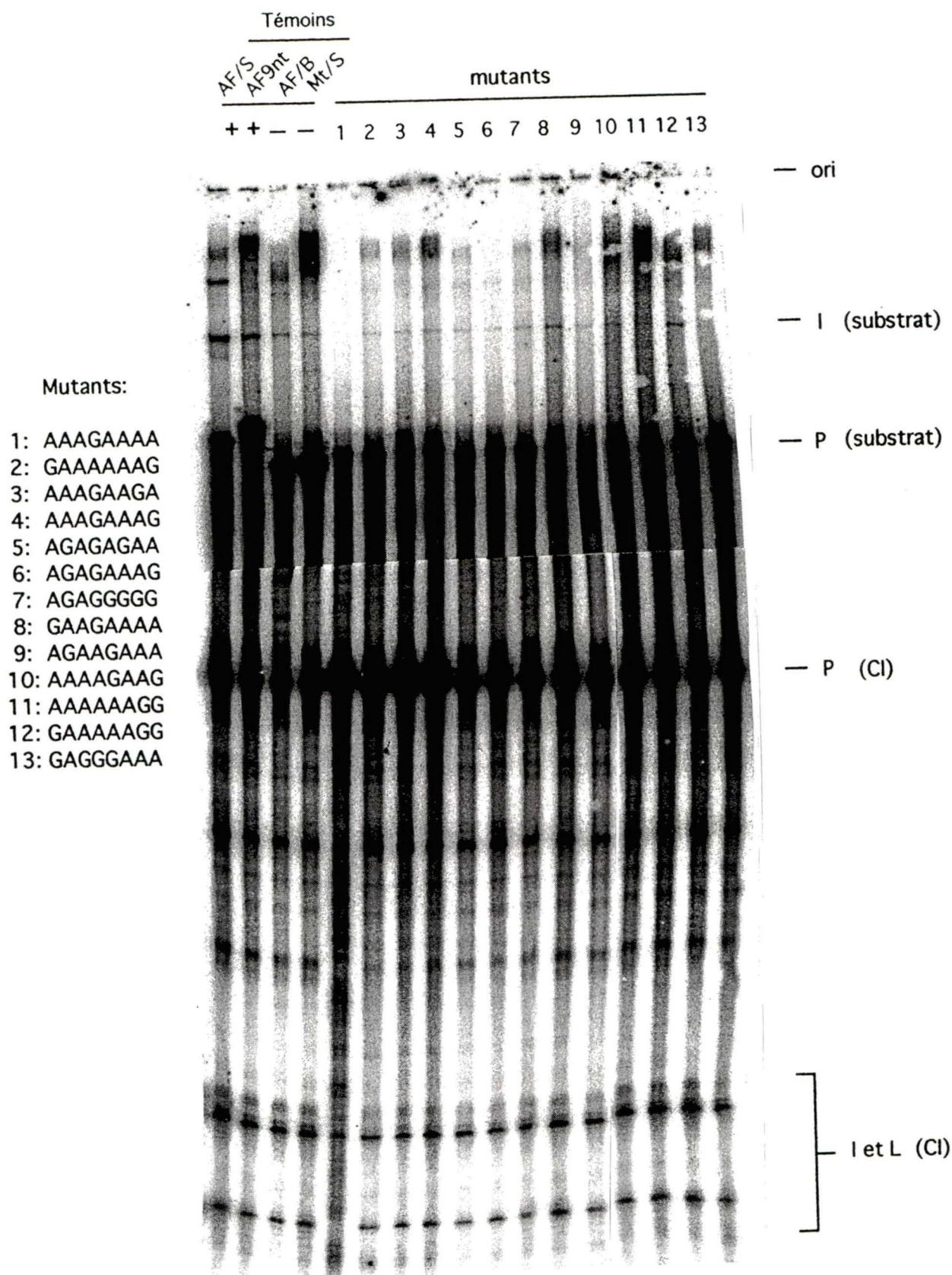


Figure 6. Stimulation de l'utilisation du site 3' d'épissage par des séquences de purines exoniques dans les constructions AF-Pu.

(A) Représentation schématique de la construction modèle utilisé pour vérifier l'épissage *in vitro*. Substrats chimères des mutants d'essais Adénovirus/Fibronectine-Purines (AF-Pu): Boîte noire: séquences d'adénovirus; lignes horizontales: intron chimère AF; boîte claire: exon ED1 de fibronectine tronqué où l'élément SE (81nt) est remplacé par une séquence de 8 nt dégénérée composé uniquement de purines (boîte ondulée). (B) Exemple d'un gel d'épissage *in vitro* des mutants riches en purines AF-Pu. Les substrats utilisés dans ces expériences sont illustrés dans la Légende pour les Tables A à E. Les pré-mRNAs ont été incubés dans des extraits nucléaires HeLa pour 2h à 30°C. Les produits de réaction d'épissage ont été séparés sur un gel polyacrylamide 5%, contenant 7M d'urée. Les positions des pré-mRNAs (P), intron en lasso (I) et intermédiaire lasso (L) pour les substrats d'essais ainsi que pour les contrôles internes (CI) sont indiquées. Les témoins (+) et (-) de 1^{er} choix ainsi que les témoins alternatifs sont indiqués; pistes 1 à 13: mutants AF-Pu, chacun avec un motif de purines distincts. Les bandes sur les gels ont été quantifiés par PhosphorImager de sorte que P(substrat)= b; I(substrat)= a; P(CI)= c et I(CI)= d. Ces données ont été employés pour estimer une valeur relative d'efficacité d'épissage pour chaque mutant (voir Tables A à E). Les séquences des motifs de purines des clones vérifiés ainsi sont illustrées dans les Tables A à G.

B



Stimulation d'épissage par des motifs purines dégénérés.

Afin de confirmer l'importance de la séquence et d'adresser la contribution de nucléotides à chaque position d'un élément stimulateur riche en purines, nous avons évalué l'efficacité d'épissage d'environ cinquante substrats d'ARN possédant chacun un motif purine distinct. Pour ce faire, nous avons généré une batterie de mutants AF-Pu en remplaçant l'élément SE de l'exon ED1 de fibronectine de la construction de base hybride Adénovirus/Fibronectine (AF) par une région dégénérée de 8 nucléotides composée uniquement de purines (voir Légende pour les Tables A à E). Ces clones ont été individuellement séquencés afin d'identifier leur motif purines (Fig.5) et ensuite vérifiés pour leur capacité à stimuler l'utilisation du site d'épissage 3' d'ED1 *in vitro* (Fig.6).

Un substrat agissant comme contrôle interne (CI) a été inclus dans chaque réaction d'épissage. Cet RNA provient du gène de hnRNP A1 et est normalement épissé très efficacement *in vitro* (gracieusement offert par Isabelle Lapierre). Dans notre analyse, nous n'avons pas considéré les échantillons dans lesquels le contrôle interne n'a été épissé que très faiblement.

Les gels d'épissage ont été exposés et quantifiés sur PhosphorImager (PI) afin d'obtenir le ratio de produits intron lasso/pré-mRNA pour chaque mutant. La valeur arbitraire 10 a été attribuée au témoin positif AF+9nt contenant la séquence originale de l'exon ED1 de fibronectine (GAAGAAGAC). Ensuite, nous avons calculé les valeurs d'efficacité relative de stimulation d'épissage, pour chaque mutant possédant un motif riche en purines distinct (Tables A, B, C, E). Dans les expériences où le témoin AF+9nt n'a pas fonctionné, le témoin alternatif AF/S fut utilisé. Étant donné que l'efficacité d'épissage de AF/S était généralement de 1,5 à 4X supérieure à l'efficacité d'épissage de AF+9nt, toutes les valeurs calculées

relativement à AF/S ont été multipliées par un facteur de 2,5 (Tables A, B, D; valeurs avec *). Nous avons jugé ceci important afin de pouvoir comparer les valeurs des mutants les unes aux autres.

En supposant que le niveau d'épissage du contrôle interne (CI) doit théoriquement être équivalent dans chaque échantillon, nous avons considéré que les différences observées dans l'épissage de CI dans chaque réaction, indiquait des conditions particulières à chaque mélange réactionnel (ex: contamination du pré-mRNA à tester). Ainsi, notre première stratégie a été de corriger toutes les valeurs des mutants pour les variations observées avec le contrôle interne (voir Annexe B). Cette correction a amené une grande variabilité entre les valeurs obtenues pour un même pré-mRNA d'un essai à l'autre. Cependant, lorsque placé par ordre d'efficacité d'épissage, le profil général d'efficacité a été reproductible d'une expérience à l'autre. Il est possible que certains paramètres (ex: sels, contaminants d'acrylamide, etc...) influencent seulement le contrôle interne. Nous avons alors calculé les valeurs d'efficacité de stimulation d'épissage cette fois sans correction pour le CI (Tables A à G). De cette façon, nous observons une bonne reproductibilité non seulement au niveau de l'ordre d'efficacité d'épissage, mais aussi entre les valeurs obtenues pour les mutants répétés plusieurs fois. Il a donc été possible de pondérer une moyenne pour les échantillons vérifiés à reprise. Pour les mutants testés à plusieurs reprises, de légères variations entre les valeurs d'efficacité d'épissage ont été observés. Nous proposons que ceci pourrait être en partie causé par la présence du site de terminaison du transcrit près de la séquence de purines, rendant l'extrémité de ce dernier sensible aux nucléases. Il serait alors intéressant de répéter nos expériences pour certains clones, cette fois avec l'ajout d'une structure secondaire à l'extrémité 3' du transcrit, offrant une protection à la dégradation. Exceptionnellement, les échantillons AAAGAAGA

(
(Table A, gel #29); AGGGGGAA, GAGGGAGA (Table C, gel #10); et GAAAAGGG (Table D, gel #12), ont démontré un trop grand écart d'efficacité entre les deux essais. Pour ceux-ci, nous avons abandonné une des valeurs, soit celle provenant du gel sur lequel nous avons observés des bandes relativement diffuses.

Malgré nos précautions pour incuber une quantité équivalente de chaque pré-mRNA à tester, nous avons remarqué certaines variations importantes dans la quantité de matériel radio-marqué sur l'autoradiogramme. Des tests subséquents ont révélés que ces différences étaient dûes principalement à des différences initiales dans la quantité du matériel radio-marqué introduit dans la réaction d'épissage, et non pas dûes à une dégradation sélective du pré-mRNA durant l'incubation. Ces différences n'ont possiblement aucune conséquence dans notre estimation des efficacités d'épissage puisque la même valeur d'efficacité est obtenue avec une variation allant de 5X moins à 3X fois plus de pré-mRNA incubé (résultats non-montrés).

(
Basé sur les valeurs et les moyennes obtenues, les mutants ont été placés dans un tableau de classement préliminaire quant à leur capacité à stimuler l'épissage au site 3' d'ED1 (Tableau 1). Nos résultats montrent clairement une différence dans la capacité des résidus purines à stimuler l'épissage. De plus, on remarque que les motifs hautement stimulateurs (catégorie 7 à 10 et +) sont nettement minoritaires.

A

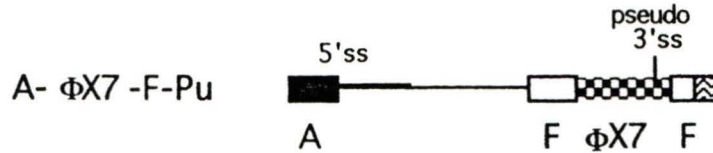
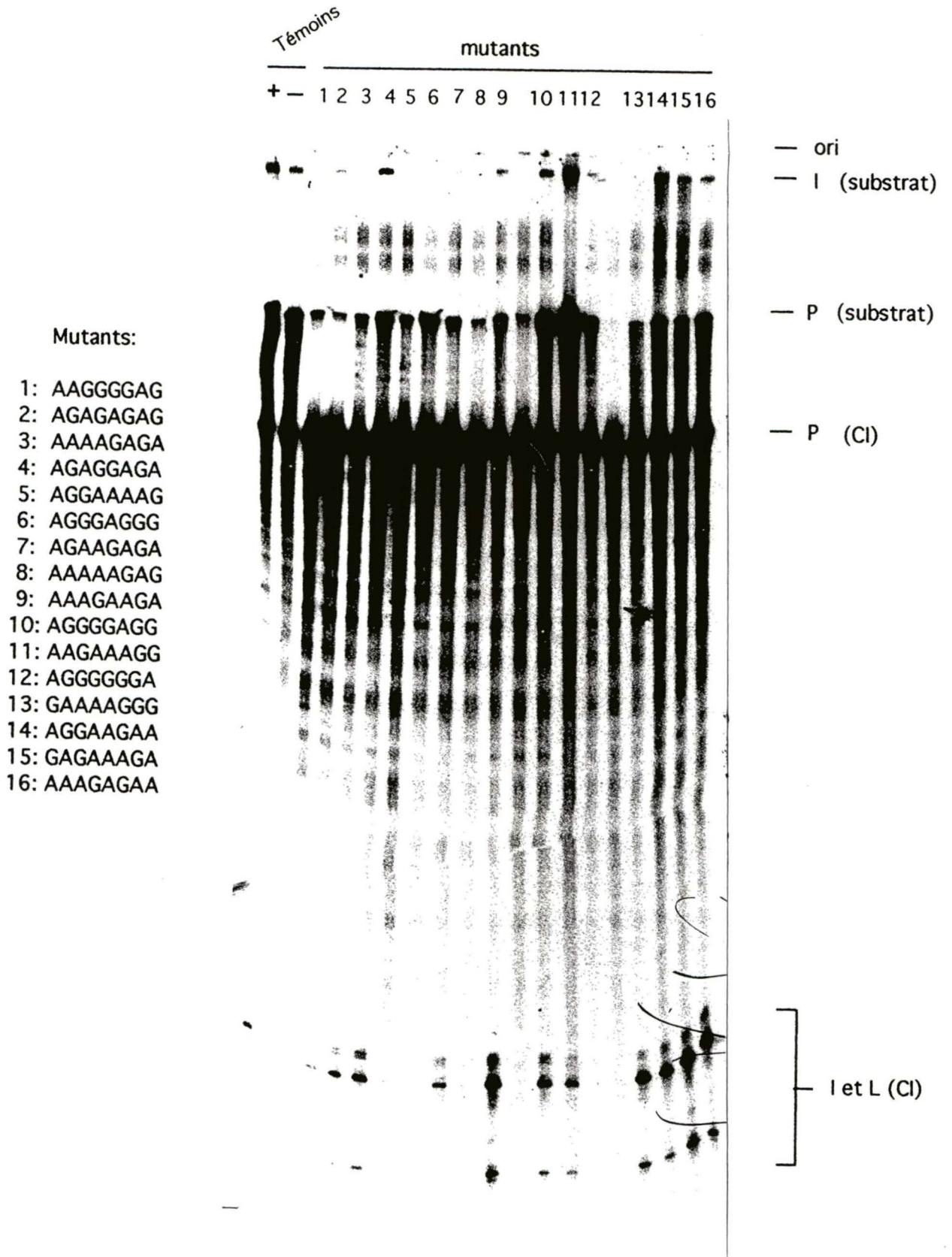


Figure 7. Stimulation de l'utilisation du site d'épissage 3' par des séquences de purines exoniques dans les constructions A-ΦX7-F-Pu.

(A) Représentation schématique de la construction modèle utilisé pour vérifier l'épissage *in vitro*. Substrats chimères des mutants d'essais Adénovirus-ΦX7-Fibronectine-Purines (A-ΦX7-F-Pu): Boîte noire: séquences d'adénovirus; lignes horizontales: intron chimère AF; boîte carrotée: séquence hétérologue de ΦX174; boîte claire: exon ED1 de fibronectine tronqué où l'élément SE (81nt) est remplacé par une séquence de 8 nt dégénérée composé uniquement de purines (boîte ondulée). (B) Exemple d'un gel d'épissage *in vitro* pour les mutants riches en purines A-ΦX7-F-Pu. Les pré-mRNAs ont été incubés dans des extraits nucléaires HeLa pour 2 h à 30° C. Les produits de réaction d'épissage ont été séparés sur un gel polyacrylamide 5%, contenant 7M d'urée. Les positions des pré-mRNAs (P), intron en lasso (I) et intermédiaire lasso (L) pour les substrats d'essais ainsi que pour les contrôles internes (CI) sont indiquées. Témoin +: A-ΦX7-F/S et (-): A-ΦX7-F/Bu ; pistes 1 à 16: mutants A-ΦX7-F-Pu, chacun avec un motif de purines distincts. Les séquences des motifs de purines sont illustrées. Les bandes sur les gels ont été quantifiées par PhosphorImager de sorte que P(substrat)= b; I(substrat)= a; P(CI)= c et I(CI)= d. Ces données ont été employés pour estimer une valeur d'efficacité d'épissage relative pour chaque mutant (voir Tables F et G et Tableau 2).

B



Essai sur un site d'épissage 3' différent.

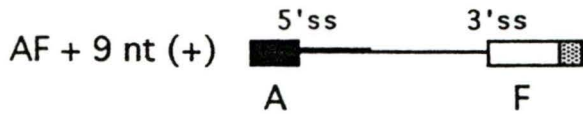
Afin de vérifier l'influence du contexte dans la capacité de stimulation des éléments riches en purines, nous avons effectué les mêmes expériences, cette fois employant un dérivé de la construction de base L1/ED1 qui contient un insert (281 nt) de séquences procaryotes de Φ X174. Notre laboratoire a précédemment démontré que la présence de l'élément SE de fibronectine stimule de façon considérable l'épissage à un pseudo-site 3' sur les séquences de Φ X174 (Lavigneur et al., 1993). Ainsi, nous avons évalué la capacité d'utilisation de ce site (Fig.7) pour environ 25 mutants (Tables F et G) comportant encore une fois un remplacement de l'élément SE par une région dégénérée de 8 nt composée uniquement de purines (voir Légende pour les Tables F et G). Nous avons utilisé la même approche qu'auparavant pour le calcul des efficacités d'épissage des mutants et ensuite placés les valeurs relatives dans le Tableau 2. Il est important de noter que dans toutes les expériences avec Φ X174, le témoin négatif A- Φ X7-F/Bu, délété pour l'élément stimulateur, démontre des valeurs d'efficacité d'épissage plus élevée que prévue. Cependant, le témoin positif A- Φ X7-F/S semble avoir bien fonctionné, car nous n'obtenons pas de valeurs relatives pour les mutants qui sont plus élevées que ce dernier. Ainsi pour ces expériences, nous n'avons pas tenue compte du témoin négatif. Les résultats obtenus démontrent encore une fois l'importance de la séquence du motif de purines dans la capacité de stimulation de l'épissage.

LÉGENDE POUR LES TABLES A à E

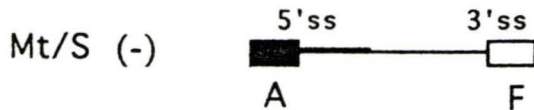
Substrats utilisés

Description

Témoins

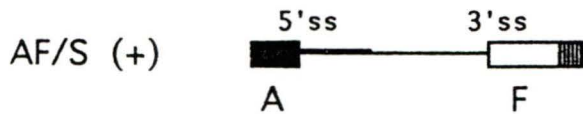


L'élément SE (81 nt) de l'exon ED1 de fibronectine du substrat Adénovirus/Fibronectine (AF) est remplacé par la séquence originale de 9 nt riche en purines de fibronectine. (Boîte ombragée:GAAGAAGAC)

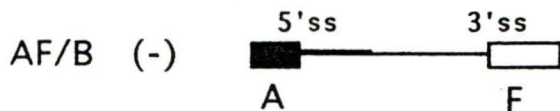


Construction du mutant (Mt) délétée pour son motif de purines.

Témoins alternatifs

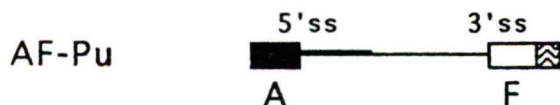


Construction de base Adénovirus/Fibronectine (AF) comportant l'élément SE en entier. (Boîte rayée:SE 81 nt)



Construction A/F délétée pour l'élément SE.

Mutants d'essais Adénovirus/Fibronectine-Purines



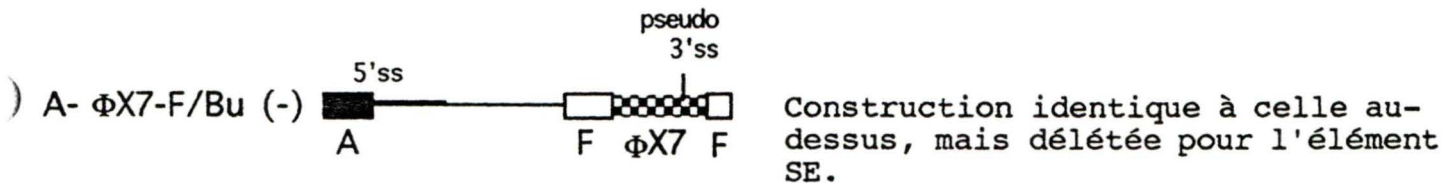
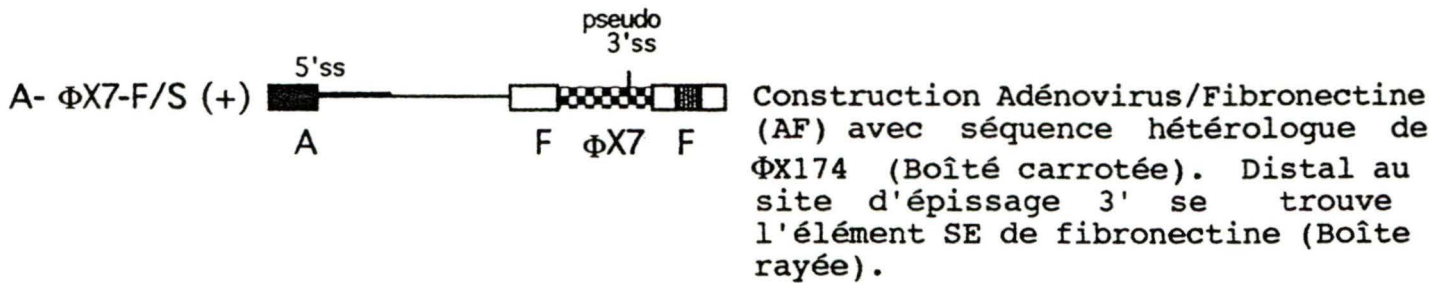
L'élément SE (81 nt) de l'exon ED1 de fibronectine est remplacé par une séquence de 8 nt dégénérée, composée uniquement de purines (Boîte ondulée).

LÉGENDE POUR LES TABLES F ET G

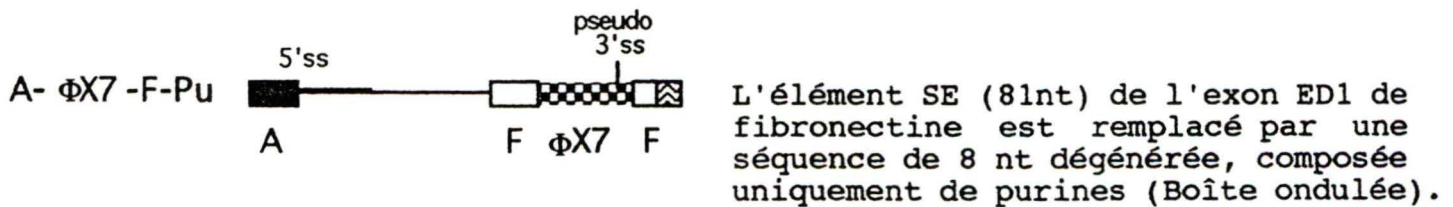
Substrats utilisés

Description

Témoins



Mutants d'essais Adénovirus- Φ X7-Fibronectine-Purines



	GEL#8	GEL#29	
<u>Témoins</u>			
AF+9nt (+)	10 (AF/S=10)	10 (AF/S)	
Mt/S (-)	0,7 (AF/B=0,9)	5 (AF/B)	
<u>Motifs purine des mutants AF-Pu</u>			
			<u>Moyenne</u>
AAAGAAAA	0,6		
GAAAAAAG	3 (1*)	0*	(X2,5) 1,3*
AAAGAAGA	2	9?	
AAAGAAAG	2		
AGAGAGAA	3		
AGAGAAAG	2		
AGAGGGGG	3		
GAAGAAAA	6		
AGAAGAAA	6		
AAAAGAAG	6		
AAAAAAGG	3		
GAAAAAGG	4		
GAGGGAAA	0,6 (0,2*)	2*	(X2,5) 2,8*

Table A

Symboles: * = Valeur calculée relative au témoin + alterne AF/S
 ? = Valeur ambiguë et non considérée

GEL#10

Témoins

AF+9nt (+)	10
Mt/S (-)	2

Motifs purine des
mutants AF-Pu

AGAAAGAA	6
AAAGAAGG	3
AAAAGGAG	2

GEL#29

Témoins

AF/S (+)	10
AF/B (-)	5

Motifs purine des
mutants AF-Pu

AAAAGGGG	6* (X2,5 =15*)
----------	----------------

Table B

Symbole: * = Valeur calculée relative au témoin + alterne AF/S

GEL#9 GEL#10 GEL#11 GEL#13 GEL#14

Témoins

AF+9 nt (+)	10	10	10	10	10
Mt/S (-)	0	2	3	2	2

Motifs purine des
mutants AF-Pu

					<u>Moyenne</u>
AGAAAGGG	5	4		0	3
AAGAGAGG		5	5	5	5
AAAGGGGA	6	7		8	7
AGGGGGAA	2	7?			
AGAGGGAG	13	11		10	11,3
AAGAGGGG	0	6		7	4,3
AAAGGGGG	11	10		13	11,3
AGGGAGGG	3	9		16	9,3
GAGGGAGA	2	7?			

Table C

Symbole: ? = Valeur ambiguë et non considérée

	GEL#11	GEL#12	GEL#29	
<u>Témoin</u>				
AF/S (+)	10	10	10	
AF/B (-)	3	1	5	
 <u>Motifs purine des mutants AF-Pu</u>				
				<u>Moyenne</u>
AAAAAGGA	4*	2*	(x2,5)	7,5*
GAGAGAAA	2*	1*	"	3,8*
AGAAAGGA	6*	8*	"	17,5*
AAGGAAAG	2*	0,3*	"	2,9*
AAGAGGAA	2*	2*	"	5*
AAAAAGGG	4*	3*	0*	" 5,8*
AAGAGAAG	6*	3*	"	11,3*
GAAAAGGG	1*	7?		
GAGAAGAG	4*	3*	5*	" 10*

Table D

Symboles: * = Valeur calculée relative au témoin + alterne AF/S
 ? = Valeur ambiguë et non considérée

	GEL#13	GEL#14	
<u>Témoins</u>			
AF+9nt (+)	10	10	
Mt/S (-)	2	2	
<u>Motifs purine des mutants AF-Pu</u>			
			<u>Moyenne</u>
AAGGGGAG	4	4	4
AGAAGGGG	5	4	4,5
AGGGGAGA	2	3	2,5
AGGGGAAG	5	3	4
AGGGAGGA	5	5	5
AGGAGAGG	1	2	1,5
AGAGAGGG		10	
GAGAGGGA	0	3	1,5

Table E

GEL#22 GEL#24b GEL#27 GEL#28

Témoins

A-ΦX7-F/S (+)	10	10	10	10
A-ΦX7-F/Bu (-)	6?	8?	4?	4?

Motifs purine des
mutants A-ΦX7-F-Pu

					<u>Moyenne</u>
AGGGGAGG	14	10	3		9
GAAAAGGG	3	0	1		1,3
AGGAAGAA	5	8	4		5,7
GAAAAAAG	3	4			3,5
GAGAAAGA		8	3		5,5
AAAGAGAA	7	9	5		7
AAAGGGGG	6	10		4	6,7
AGGGGAGA	1	5		0,6	2,2
AGAGGAGA		2	7	0	3
AGAAAAAA	2	1		0	1
AAGAGAAA		0,1		0	0,1
GAGAAGAG		2			2
AGAAAAGG		2		0	1

Table F

Symbole: ? = Valeur ambiguë et non considérée

Témoins

A-ΦX7-F/S (+)	10
A-ΦX7-F/Bu (-)	4?

Motifs purine des
mutants A-ΦX7-F-Pu

AAGGGGAG	2
AGAGAGAG	14
AAAGAGAG	4
AGGAAAAG	2
AGGGAGGG	2
AGAAGAGA	3
AAAAAGAG	2
AAAGAAGA	6
AAGAAAGG	4
AGGGGGGA	3

Table G

Symbole: ? = Valeur ambiguë et non considérée

7,0 - 10 <small>ETPLUS</small>	4,0 - 6,9	0 - 3,9
AGAGGGAG ⁽³⁾	AAGAGGGG ⁽³⁾	AGAAAGGG ⁽³⁾
AAAGGGGG ⁽³⁾	AAGAGAGG ⁽³⁾	GAAAAAAG ⁽²⁾
AGGGAGGG ⁽³⁾	AAAAAGGG ^{(3)*}	GAGGGAAA ^{(2)*}
AAAGGGGA ⁽³⁾	AAGAGGAA ^{(2)*}	GAGAGAAA ^{(2)*}
GAGAAGAG ^{(3)*}	AGGGAGGA ⁽²⁾	AAGGAAAG ^{(2)*}
AGAAAGGA ^{(2)*}	AGAAGGGG ⁽²⁾	AGGGGAGA ⁽²⁾
AAAAAGGA ^{(2)*}	AGGGGAAG ⁽²⁾	AGGAGAGG ⁽²⁾
AAGAGAAG ^{(2)*}	AAGGGGAG ⁽²⁾	GAGAGGGA ⁽²⁾
AAAAGGGG ^{(1)*}	GAAGAAAA ⁽¹⁾	AAAGAAAA ⁽¹⁾
AGAGAGGG ⁽¹⁾	AGAAGAAA ⁽¹⁾	AAAGAAGA ⁽¹⁾
	AAAAGAAG ⁽¹⁾	AAAGAAAG ⁽¹⁾
	GAAAAAGG ⁽¹⁾	AGAGAGAA ⁽¹⁾
	AGAAAGAA ⁽¹⁾	GAAAAGGG ^{(1)*}
		AGAGAAAG ⁽¹⁾
		AGAGGGGG ⁽¹⁾
		AAAAAAGG ⁽¹⁾
		AAAGAAGG ⁽¹⁾
		AAAAGGAG ⁽¹⁾
		GAGGGAGA ⁽¹⁾
		AGGGGGAA ⁽¹⁾

Tableau 1. Efficacité relative d'épissage des mutants AF-Purines.

Les mutants ont été placés dans une des trois catégories d'efficacité d'épissage, selon la valeur ou la moyenne des résultats obtenus dans les différents essais (voir Tables A à E). (1): valeur unique; (2): moyenne de 2 valeurs; (3): moyenne de 3 valeurs; *: valeur relative au témoin AF/S et corrigée, donc X2,5 pour la comparaison.

7,0 - 10 ET PLUS	4,0 - 6,9	0 - 3,9
AGGGGAGG (3)	AGGAAGAA (3)	GAAAAGGG (3)
AAAGAGAA (3)	AAAGGGGG (3)	AGGGGAGA (3)
AGAGAGAG (1)	GAGAAAGA (2)	AGAAAAAA (3)
	AAAGAGAG (1)	AGAGGAGA (3)
	AAAGAAGA (1)	GAAAAAAG (2)
	AAGAAAGG (1)	AAGAGAAA (2)
		AGAAAAGG (2)
		GAGAAGAG (1)
		AAGGGGAG (1)
		AGGAAAAG (1)
		AGGGAGGG (1)
		AGAAGAGA (1)
		AAAAAGAG (1)
		AGGGGGGA (1)

Tableau 2. Efficacité relative d'épissage des mutants Φ X7-F-Purines.

Les mutants ont été placés dans une des trois catégories d'efficacité d'épissage, selon la valeur ou la moyenne des résultats obtenus dans les différents essais (Tables F et G). (1): Valeur unique; (2): Moyenne de 2 valeurs; (3): Moyenne de 3 valeurs.

IV. DISCUSSION

Il y a de plus en plus d'évidences suggérant que des séquences, autres que celles aux sites d'épissage et au site de branchement, jouent un rôle critique dans la sélection des sites d'épissage. La plupart de ces séquences auxiliaires se retrouvent à l'intérieur d'exons et, à part quelques exceptions, la nature exacte et le rôle de ces séquences dans l'épissage ne sont pas encore définis.

Il a déjà été rapporté que l'exon alternatif ED1 de fibronectine contient des séquences participant à la sélection des sites d'épissage. La délétion ou l'inversion d'un segment central de 81 nucléotides (élément SE) abolit l'inclusion de cet exon dans les cellules HeLa (Mardon et al., 1987). Par la suite, notre laboratoire a démontré qu'il s'agissait en fait d'une séquence de 9 nucléotides riche en purines (GAAGAAGAC), présent dans l'élément SE, qui stimule l'épissage au site 3'. De plus, une séquence stimulatrice semblable (GGAGAAGAC) a été identifiée dans l'exon constitutif en aval, soit l'exon +1 (Lavigneur et al., 1993). De façon comparable, des éléments riches en purines nécessaires à la stimulation de l'utilisation du site d'épissage 3' ont également été identifiés dans l'exon M2 de l'IgM de souris ainsi que dans l'exon 5 de la troponine T cardiaque (Watakabe et al., 1993; Xu et al., 1993). Watakabe et al. (1993), ont aussi noté que plusieurs séquences exoniques, dont la mutation ou délétion affecte la sélection des sites d'épissage, contiennent des segments de polypurines.

Se basant sur ces travaux, nous avons remarqué l'existence de 3 segments de séquences riches en purines présents dans l'exon 7B du gène hnRNP A1, épissé de façon alternative. Nous avons alors adressé leurs contributions dans l'épissage. Nos résultats montrent que le remplacement de l'élément SE de fibronectine par ces séquences de 7B (RNAs AF-7B/A2 et AF-

7B/Bt) ne rétablit pas de façon efficace l'épissage au site 3' d'ED1 *in vitro* (Fig. 1B). Ces résultats ne semblent pas être causés par le raccourcissement de l'exon 3' dans le chimère modèle utilisé (AF-7B), puisque l'épissage efficace de pré-mRNAs de taille semblable ou même inférieure a déjà été observé dans notre laboratoire. Donc à première vue, il semble que les éléments riches en purines de l'exon 7B ne possèdent pas de potentiel stimulateur en épissage. Toutefois, d'autres interprétations peuvent être envisagées. Premièrement, nous avons pensé à la possibilité que les éléments de l'exon 7B puissent agir comme stimulateur de l'utilisation d'un site d'épissage 5' plutôt que 3'. Il a déjà été observé, par d'autres membres de notre laboratoire, qu'une construction comportant la deuxième moitié de l'exon 7B suivi de l'exon 8 d'hnRNP A1, était déficiente en épissage. Ainsi dans le but de vérifier l'effet des motifs purines de l'exon 7B sur un site 5', et ce, dans son contexte naturel, nous avons testé l'épissage d'une construction similaire, mais cette fois comportant la totalité de l'exon 7B. Les résultats de ces expériences (non présentés dans cet ouvrage) n'ont pas démontré de stimulation d'épissage. Deuxièmement, il est possible que les motifs de l'exon 7B possède une activité stimulatrice mais seulement dans le contexte normal du site d'épissage 3' de l'exon 7B. En faveur de ceci sont les résultats très récents de notre laboratoire portant sur l'épissage d'un pré-mRNA comportant l'exon 7 ainsi que la première moitié de l'exon 7B du gène hnRNP A1. Ces derniers, suggèrent que les deux premiers motifs de purines de l'exon 7B possèdent une capacité de stimulation d'épissage, car leurs délétion empêche l'utilisation du site 3' de 7B *in vitro*. Ainsi, dans son contexte naturel, les éléments polypurines de l'exon 7B démontrent un potentiel stimulateur, suggérant un rôle du contexte dans l'efficacité de ces motifs. Deux autres interprétations sont possibles. Certaines recherches ont montrées l'influence de la structure secondaire sur l'épissage alternatif (Solnick, 1985; Solnick et Lee, 1987; Eperon et al.,

1988; Watakabe et al., 1989; Libri et al., 1991; Clouet et al., 1991; Estes et al., 1992). En conséquence, la formation de structure secondaire pourrait séquestrer les segments riches en purines de l'exon 7B et empêcher leurs actions. Cependant, ceci nous semble moins probable étant donné qu'une analyse d'ordinateur à ce sujet n'a pas révélé de structure secondaire stable pouvant expliquer nos observations. Enfin, plusieurs études impliquent la liaison de protéines SR dans le mécanisme d'action probable des éléments riches en purines (Sun et al., 1993; Lavigueur et al., 1993; Staknis et Reed., 1994a). Ainsi, il est possible que les éléments riches en purines ne soient pas tous équivalents, soit parce qu'ils ne lient pas les protéines SR ou parce qu'ils lient certaines de ces protéines mais que la configuration de leur liaison n'est pas compatible avec une stimulation (voir plus loin).

Il a été précédemment démontré dans notre laboratoire que les protéines SR interagissaient de façon spécifique avec l'élément SE de l'exon ED1 de fibronectine (Lavigueur et al., 1993). En concordance, nos expériences avec des protéines SR purifiées ont également révélé une interaction avec les éléments riches en purines de l'exon 7B de hnRNP A1 (Fig. 2). Par le biais d'expériences effectuées avec les extraits nucléaires HeLa et fractions S-100 (déficientes en SR), nous avons voulu vérifier cette interaction. Cependant, l'interprétation des résultats de ces études n'a pas été aussi simple. Avec les RNAs possédant 2 (7B/A3) et 3 (7B/R1) motifs riches en purines de l'exon 7B, nous avons observé une interaction très efficace avec des facteurs présent dans les deux types d'extraits (Fig. 3, pistes 9 à 12, 15 à 18). D'autre part, il se produit une baisse d'interaction avec les composantes des extraits par la réduction progressive de la taille d'ARN de 7B/A3 à 7B/A2 sans que ceci soit causé à première vue par une diminution du nombre de motifs de purines. Ainsi, il semblerait que le contexte entourant les motifs de purines influence la reconnaissance par les facteurs nucléaires. Nous proposons que la migration plus

rapide de tous les ARNs de 7B dans l'extrait S-100 soit due à la présence d'une concentration plus faible de facteurs nucléaires en cause dans ces extraits. Concernant l'identité des facteurs nucléaires interagissant avec les RNAs de 7B dans ces deux extraits, plusieurs explications sont possibles. D'abord, il se peut que les motifs de l'exon 7B constituent de très bons sites de liaison pour les protéines SR, puisque même dans l'extrait S-100, contenant qu'une très faible concentration de ces protéines, on observe une interaction entre ARNs et facteurs nucléaires (Fig. 3). Par la suite, possiblement d'autres facteurs nucléaires présents dans les deux types d'extraits lient certains éléments (purines ou non) de l'exon 7B, pour ainsi déstabiliser l'interaction probable par les protéines SR. En faveur de ceci, l'étude récente de Staknis et Reed suggère que les hnRNPs compétitionnent avec les protéines SR pour la liaison de l'ARN dans les extraits nucléaires (Staknis et Reed, 1994a). Une explication permettant de reconcilier les deux autres serait que dans la première partie de l'exon 7B se situe des sites de liaison pour protéines SR, tandis que dans la deuxième portion, se situe des régions de liaison pour d'autres facteurs nucléaires pas encore identifiés.

Etant donné qu'il fut démontré que la protéine nucléaire hnRNP A1 interfère avec l'activité des protéines SR dans la sélection des sites d'épissage 5' *in vitro* (Mayeda et Krainer, 1992a), la possibilité que la nature des facteurs non-identifiés dans les expériences précédentes soient en fait hnRNP A1 nous a semblé intéressante. Par contre, les résultats d'expériences avec les extraits déficients dans l'expression de cette protéine suggèrent que cette dernière n'est pas impliquée de façon critique dans les interactions observées avec les régions riches en purines de l'exon 7B (fig. 4).

Il est intéressant de noter que le RNA 7B/Bt (2 motifs purines) montre une meilleure interaction avec les facteurs nucléaires

de tous les extraits (HeLa, S-100, CB3C7, CB3C7-20 et DP27) comparativement au RNA 7B/A2 (2 motifs purines). Ainsi il semble que des régions riches en purines ou non, présentes entre les sites AlB2 et BstXI de l'exon 7B, interagissent spécifiquement avec certains facteurs nucléaires (Fig. 3 et 4) mais que ceci n'est pas associé à une stimulation d'épissage au site 3' d'ED1 (Fig. 1). Enfin, bien que nous observons de fortes interactions entre les RNAs de taille plus longue 7B/A3 et 7B/RI avec les facteurs nucléaires (SR ou autres) dans les extraits HeLa et S-100, nous ne pouvons pas supposer une stimulation d'épissage associée à ce stade.

De façon générale, nos résultats sur les éléments purines de l'exon 7B d'hnRNP A1 suggèrent que la présence de segments exoniques riches en purines n'est pas suffisante pour stimuler l'épissage ou même faciliter la liaison des protéines SR en présence de d'autres facteurs nucléaires. Il existe possiblement d'autres variables impliquées dans l'efficacité de l'activité stimulatrice d'un élément riche en purines. Ainsi, dans le but de fournir une définition plus précise d'un élément stimulateur d'épissage purinique, nous avons voulu établir la contribution de nucléotides à chaque position d'un élément stimulateur de ce type. Pour ce faire, nous avons produits des variants aux positions de purines du motif original de 8 nt présent dans l'exon ED1 de la fibronectine. Nous avons ensuite vérifié chaque combinaison pour sa capacité à stimuler l'épissage. La construction chimère de base Adénovirus/Fibronectine a servi comme pré-mRNA modèle (AF) dans cette analyse. Des extraits nucléaires HeLa ont été utilisés afin d'examiner l'épissage *in vitro* au site 3' de l'exon ED1 des mutants.

En comparant les efficacités d'épissage obtenues avec les mutants AF-Pu (Tableau 1), nos résultats démontrent clairement que les séquences riches en purines n'ont pas toutes une activité stimulatrice équivalente. Nos études indiquent que

l'effet stimulateur dépend de la séquence de polypurines. Il ne semble pas y avoir un consensus ou patron particulier ressortant de cette classification préliminaire permettant de corréliser une combinaison particulière de purines avec une plus grande efficacité d'épissage. Ces observations nuancent les résultats obtenus par Xu et al. (1993) et Tanaka et al. (1994). Xu et al., proposent que les motifs puriniques présents dans les régions exoniques requise pour l'épissage efficace de divers gènes, présentent un aspect commun (mais non universel), soit une séquence de 3 nucléotides répétées, GAR, où R est un A ou un G donnant le motif commun variable GARGARGAR. Bien que l'élément original de l'exon ED1 de la fibronectine, GAAGAAGAC, suit le patron défini du motif GAR, la grande majorité de nos motifs testés et plus particulièrement ceux catégorisés parmi les meilleurs stimulateurs d'épissage, parfois même mieux que l'élément original, ne sont pas du type GAR. Concernant le contenu en purines d'un élément stimulateur, Tanaka et al. (1994), concluent suite à une analyse de séquences riches en purines artificielles de 30 nucléotides, qu'un motif composé de résidus A et G juxtaposés peut stimuler l'épissage tandis qu'une séquence poly(A) ou poly(G) ne le peut pas. Par contre, nous avons observés que les séquences AAAGGGG⁽³⁾, AAAAAGGA^{(2)*} ou AAAAGGGG^{(1)*} se classent parmi les meilleurs stimulateurs d'épissage dans nos essais (catégorie 7-10 et + ; Tableau 1). De plus, nous avons retrouvé des segments du type AG juxtaposés démontrant une stimulation faible ou nulle.

Bien que nos études démontrent qu'il y ait une grande flexibilité dans la définition d'un motif riche en purines, certains aspects très intéressants sont notés de nos expériences. Par exemple, nous avons observé que dans certains cas, le changement d'un nucléotide à une position peut transformer un très bon motif stimulateur (catégorie 7-10 et +) en un de faible activité (catégorie 0-3,9):

+++		+
AGAGGG <u>G</u> (³) -----		AGAGGG <u>G</u> (¹) (Tableau 1)
AGAAAG <u>G</u> (³) -----		AGAAAG <u>G</u> (³) (Tableau 1)
AAAGGG <u>G</u> (³) -----		AGAGGG <u>G</u> (¹) (Tableau 1)
AGGGAG <u>G</u> (³) -----		AGGGAG <u>A</u> (³) (Tableau 2)

Par contre, dans d'autres cas, ce type de modification ne semble pas altérer l'efficacité de l'épissage au site 3'. (Tableau 1)

+++		+++
AAAGGG <u>G</u> (³) -----		AAAGGG <u>A</u> (³)
AG <u>G</u> GAGGG(³) -----		AG <u>A</u> GAGGG(¹)
++		++
AAGAG <u>G</u> G(³) -----		AAGAG <u>A</u> G(³)

Pour certains de ces éléments, il semble que la position du changement soit importante. Soit pour le segment AAAGGGGG, un changement à la position 8 (G pour un A) ne modifie pas son potentiel, mais le changement de nucléotide à la position 2 (A pour un G) réduit grandement son efficacité. Pour la séquence AGGGAGGG(³) (+++), un changement à la position 3 ne semble pas influencer sa force de stimulation. Par contre, nous avons noté qu'une modification additionnelle, soit à la position 4 (AGAAAGGG(³)), peut diminuer l'activité de stimulation d'environ 3 fois.

Tel que mentionné auparavant, plusieurs études ont démontré l'existence de séquences riches en purines présentes dans des

Exon	Séquence	Référence
Exon ED1, FN humaine	...AGCCCT GAGGATGG ...TGGT GAAGAAGACAC ...	Lavigueur et al., 1993 Mardon et al., 1987
Exon +1, FN humaine	...GACCCCA AGGAGAAGACCGGACC ...	Lavigueur et al., 1993
Exon M2, IgM souris	... GGAAGGACAGCAGAGACCAAGAG ...	Watakabe et al., 1993
Exon 5, BGH	...TCTCCTGCTTCC GGAAGGAC ...	Dirksen et al., 1994
Exon 5, cTNT	... AAGAGGAAGAATGGCTTGAGGAAGACGACG ...	Xu et al., 1993
Exon 3, hprt humaine	...GAGATGTGAT GAAGGAGATGGGAGGTCAAGGGGGGCTATAAA...	Steingrimsdottir et al., 1992
Exon 3' env, ASLV	...CGAGCA AGAAGGACTCCAAGAAGAAGCCGCAAGCA AGAAGGACCCG ...	Fu et al., 1991 Katz et Skalka, 1990
Exon 8, β -TM rat	...CCACCA AGAGGACAAATACGAAGAAGAGATTCT GGAGGAGAAGCTGAAGGAGGC ...	Helfman et al., 1988 Tsukahara et al., 1994
Exon 3, Calcitonine/CGRP	... GAAGAAGAAGCTC ...	Yeakley et al., 1993

Tableau 3. Séquences exoniques riches en purines influençant l'épissage.

Les séquences riches en purines présentes dans les exons de divers gènes sont représentées (gras). Abréviations: FN: fibronectine; IgM: immunoglobuline μ ; BGH: hormone de croissance bovine; cTNT: troponine T cardiaque; hprt: hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransférase; ASLV: virus sarco-leucémique aviaire; β -TM: β -tropomyosine; CGRP: peptide dérivé du gène de la calcitonine.

régions exoniques de plusieurs gènes. Basé sur la similarité des séquences ainsi que leur effet semblable sur l'épissage *in vitro*, il a été proposé que le rôle des séquences exoniques dans l'épissage puisse être en partie attribué aux éléments puriniques (Tanaka et al., 1994). En comparant les séquences riches en purines de ces gènes (Tableau 3) avec celles de nos mutants, plusieurs similarités ont été retrouvées. Par exemple, la suite AAGGGGG de l'exon 3 du gène de hprt humaine est retrouvée dans le motif AAAGGGGG⁽³⁾ (Tableau 1) qui à trois reprises a démontré une bonne activité stimulatrice d'épissage (catégorie 7-10 et +). De la même façon, la séquence GGGAGG de hprt est présente dans deux de nos motifs puriniques essayés, soit AGGGAGGG⁽³⁾ (Tableau 1) et AGGGGAGG⁽³⁾ (Tableau 2), classés parmi les meilleurs stimulateurs d'épissage au site 3' *in vitro*. Toutefois, cette même séquence se retrouve dans deux motifs placés dans la catégorie stimulateurs moyen et faible respectivement, soit AGGGAGGA⁽²⁾(++) et AGGGAGGG⁽¹⁾(+) (Tableau 1). Dans deux de nos mutants, on retrouve une partie d'un des motifs riches en purines de l'exon 5 du gène de la troponine T cardiaque, soit la suite de 8 nucléotides AAGAGGAA⁽²⁾* (Tableau 1) et AGGAAGAA⁽³⁾ (Tableau 2), qui se sont montrés d'efficacité moyenne (catégorie 4,0-6,9). Finalement, la suite AGAAGAGA présente dans l'exon 8 du gène β -TM du rat, n'a eu qu'une faible efficacité dans le contexte de nos essais.

Il est important de noter que dans ces diverses régions exoniques jouant un rôle dans l'épissage des gènes mentionnés jusqu'à présent, la longueur du segment polypurine ainsi que le nombre de ces motifs, varient d'un gène à l'autre. Cette considération est importante puisque plusieurs études suggèrent que l'augmentation de la longueur d'une suite purinique (Xu et al., 1993; Watakabe et al., 1993; Tanaka et al., 1994; Dirksen et al., 1994) ou le nombre de tels motifs présents dans un élément (Watakabe et al., 1993; Tanaka et al., 1994), ont tous deux un effet additif sur le potentiel de stimulation. Ainsi, nos résultats démontrent que des séquences de 8 purines

consécutives retrouvées dans divers gènes pourraient varier quant à leur potentiel stimulateur.

Outre la comparaison d'éléments riches en purines stimulateurs, une étude récente par Caputi et al. (1994) rapporte l'existence d'un autre type d'élément de purines (CAAGG) présent dans l'exon ED1 de la fibronectine, situé à 12 nucléotides en aval de l'élément GAAGAAGAC. L'élément contenant la séquence CAAGG serait un modulateur négatif de l'épissage au site 3'. Cependant, les résultats antérieurs de notre laboratoire (Lavigneur et al., 1993), n'ont pas révélé ce type d'activité. De plus, parmi les combinaisons testées dans la présente étude, nous retrouvons la séquence AAGG dans plusieurs motifs efficaces, suggérant pas nécessairement une inhibition par la présence de cette dernière.

L'étude de plusieurs paramètres autres que la séquence, la longueur et le nombre de motifs riches en purines, pourrait également contribuer à caractériser l'aspect fonctionnel des éléments stimulateurs riches en purines. Un de ces aspects serait le contexte, c'est-à-dire les séquences adjacentes à l'élément polypurine et par extension le site d'épissage 3' sur lequel nous rapportons ou vérifions son activité stimulatrice. Afin d'étudier ce paramètre, nous avons vérifié l'efficacité d'épissage de motifs de purines juxtaposés au pseudo-site 3' de Φ X7 (séquences procaryotiques Φ X174). En accord avec les résultats obtenus avec les constructions AF-Pu (Tableau 1), nous avons encore observé une grande variabilité dans le potentiel stimulateur des motifs purines en fonction de leur composition (Tableau 2). Sur les 6 motifs communs testés sur le site 3' d'ED1 et le site 3' de Φ X7, 4 présentaient des potentiels stimulateurs différents dépendant du site d'épissage 3' (Tableau 4). Par exemple, les segments AAAGGGGG, GAGAAGAG et AGGGAGGG ont démontré une très bonne capacité stimulatrice sur le site 3' d'ED1 (Tableau 1) mais n'ont révélé être que des stimulateurs moyens ou faibles dans le contexte de la

MOTIF PURINE	Site 3' d'ED1	Site 3' de Φ X7
GAAAAGGG	+ (1)	+ (3)
GAAAAAAG	+ (2)	+ (2)
AAAGGGGG	+++ (3)	++ (3)
GAGAAGAG	+++ (3)	+ (1)
AGGGAGGG	+++ (3)	+ (1)
AAAGAAGA	+ (1)	++ (1)

Tableau 4. L'influence du contexte sur la stimulation d'épissage par les motifs riches en purines.

La comparaison est effectuée d'après les résultats des Tableaux 1 et 2. +: catégorie 0-3,9 ; ++: catégorie 4-6,9 ; +++: catégorie 7-10 et +. (1) : valeur unique; (2) : moyenne de 2 valeurs; (3) : moyenne de 3 valeurs. Le site 3' d'ED1 se rapporte à la construction AF-Pu et le site 3' de Φ X7 se rapporte à la construction A- Φ X7-F-Pu.

construction A-ΦX7-F-Pu (Tableau 2). L'importance des séquences entourant la séquence riche en purines (en excluant le site 3') est également suggérée par une différence d'environ 2,5 fois entre l'efficacité d'épissage de nos deux contrôles positifs soit AF/S et AF+9nt, qui diffèrent par environ 100 nt immédiatement adjacents à l'élément riche en purines d'ED1. En faveur de ces constatations, notre laboratoire avait noté auparavant que l'insertion de l'élément SE dans trois pré-mRNAs hétérologues stimule l'épissage *in vitro* avec une efficacité spécifique à chacun des pré-mRNAs. De façon générale, ces recherches ainsi que d'autres, semblent suggérer que plus les séquences du site 5' et 3' se rapprochent du consensus, constituant ainsi de forts sites d'épissage, moins importante sera la contribution par de tels stimulateurs d'épissage (Inoue et al., 1992; Tian et Maniatis, 1992; Lavigueur et al., 1993).

L'élément stimulateur de l'exon ED1 de la fibronectine peut être déplacé à plusieurs endroits, en aval ou en amont de sa position normale, sans perdre son abilité de stimuler l'utilisation du site d'épissage 3' d'ED1. Bien qu'il perd cette capacité lorsque déplacé plus de 293 nucléotides en aval du site d'épissage 3', le rapprochement de l'élément stimulateur au site 3', par rapport à sa position normale, a l'effet d'accroître l'efficacité d'épissage (Lavigueur et al., 1993). Ainsi, un autre paramètre pouvant influencer la capacité de stimulation des éléments riches en purines est rajouté, soit la distance de cet élément par rapport au site d'épissage 3'.

Tanaka et al. (1994) ont démontré que la substitution des résidus C pour des résidus U dans l'élément riche en purines de IgM, provoquait une diminution considérable de son activité. Contrairement, Staknis et Reed (1994a), ont observés que 6 résidus U introduits dans l'élément stimulateur purinique du virus sarco-leucémique aviaire (ASLV) n'interfèraient pas avec la stimulation. Un élément sans aucune suite ou motifs de

purines semble donc pouvoir agir comme amplificateur d'épissage. Cette divergence d'observations ne fait que suggérer la complexité et donc la grande prudence dans la définition des paramètres régissant l'activité des éléments exoniques riches ou non en purines.

Le but original de notre étude était de développer un outil pouvant permettre d'estimer l'activité stimulatrice potentielle de divers éléments riches en purines retrouvés dans plusieurs exons alternatifs et constitutifs chez les mammifères. Nos expériences ont dévoilé que cette tâche ne sera pas simple puisque de nombreux paramètres influencent l'activité d'un motif riche en purines. Cependant, d'après nos études, nous pouvons conclure que les segments riches en purines ne sont pas tous équivalents. De plus, ces essais préliminaires révèlent qu'il ne semble pas exister de patron ou règle particulière permettant de prédire l'efficacité d'un élément basé sur sa séquence. Nos études permettent de conclure que la présence d'un motif riche en purine dans un exon n'est pas en soi suffisant pour y associer une activité stimulatrice. Rétrospectivement, à la lumière de cet énoncé, les résultats obtenus avec les séquences puriniques de l'exon 7B de hnRNP A1 nous semblent moins surprenants.

Il n'est pas encore clair quel mécanisme est à la base de la stimulation de l'épissage par les éléments riches en purines. À ce sujet, plusieurs études ont tenté d'identifier les facteurs impliqués dans la reconnaissance ainsi que la stimulation par les éléments exoniques. Des travaux par Tian et Maniatis (1993) ont montré que la protéine SR, SC35, était essentielle pour l'activité d'un stimulateur d'épissage impliqué dans l'épissage alternatif du pré-mRNA dsx de la Drosophile. Ces auteurs proposent que SC35 agit par interaction avec d'autres protéines SR, ainsi que 2 protéines régulatrices, tra et tra-2, en formant un complexe sur l'élément stimulateur exonique. La protéine SR ASF/SF2 a

montré une liaison spécifique et une réticulation aux ultraviolets à un stimulateur riche en purine (désigné l'élément FP) sur le pré-mRNA de l'hormone de croissance bovine (Sun et al., 1993). De plus, cette protéine a démontré être essentielle pour la fonction de stimulation de l'élément FP (Sun et al., 1993). En parallèle, des études antérieures dans notre laboratoire avaient révélé une interaction spécifique entre les protéines SR et l'élément stimulateur purinique de l'exon ED1 de fibronectine (Lavigne et al., 1993). En plus des protéines SR, le snRNP U1 a montré une liaison au motif stimulateur riche en purines de l'exon M2 de l'IgM de la souris (Watakabe et al., 1993). Plusieurs observations suggèrent que les stimulateurs exoniques augmentent la liaison d'U2AF⁶⁵ (composante d'U2AF) dans les pré-mRNAs possédant un faible site d'épissage 3'. En effet, il est proposé que le motif riche en purines de IgM stimule l'assemblage du complexe A d'épissage, ce complexe nécessitant la liaison d'U2AF et le snRNP U2 (Zamore et Green, 1989 et 1992; Watakabe et al., 1993). Dans cette optique, notre laboratoire a déterminé que l'élément stimulateur de purines de fibronectine (ED1), favorisait la liaison du snRNP U2 au site de branchement (Lavigne et al., 1993). L'étude récente de Staknis et Reed (1994a) établit des liens avec toutes ces observations précédentes. Cette étude révèle l'assemblage d'un complexe exonique spécifique comprenant les protéines SR et le snRNP U1 sur les éléments exoniques riches en purines. Les éléments stimulateurs fonctionneraient en favorisant l'assemblage de ce type de complexe, conduisant à un réseau d'interactions entre les protéines SR, le snRNP U1 et le snRNP U2 au site 3' des pré-mRNAs possédant des sites d'épissage 5' et 3' sous optimaux. Ainsi, selon ce modèle, l'interaction entre le stimulateur purinique et le site d'épissage 3' substituerait de façon fonctionnelle l'interaction se produisant normalement entre les sites d'épissage 5' et 3', pour la stabilisation des interactions au site 3'. De plus, leurs études démontrent clairement, par des essais de réticulation à l'u.v., que

différents membres de la famille des protéines SR s'associent avec différents stimulateurs riches en purines. Ils ont montré que la protéine SRp40 liait le stimulateur de ASLV tandis que pour l'élément FP de l'hormone de croissance bovine, l'interaction était majoritairement composé de SRp30. Ceci semble corrélér avec les données antérieures montrant des activités distinctes pour les divers types de protéines SR (Fu, 1993; Sun et al., 1993; Tian et Maniatis, 1993; Zahler et al., 1993a).

En conclusion, nos travaux ont montré que dans un contexte donné, il existe un grand spectre dans les forces d'éléments exoniques riches en purines dépendant de leur contenu en séquence. Il est possible que le potentiel et l'activité déterminant la force d'un motif riche en purines dépendent en fait du type de protéine SR se liant préférentiellement à un stimulateur donné. Il sera donc intéressant dans nos travaux ultérieurs de déterminer spécifiquement le lien entre la séquence d'un motif stimulateur riche en purines et le type de protéine SR impliqué dans sa liaison. Ce dernier pouvant constituer un autre paramètre influencant l'efficacité et le potentiel des éléments stimulateurs exoniques riches en purines et ainsi contribuer à une définition plus exacte des aspects fonctionnels de ces éléments.

REMERCIEMENTS (Acknowledgements)

First and foremost, I would like to thank my theses director Prof. Benoit Chabot who is not only an exemplary scientist but at the same time very humane and of high integrity.

Next I'd like to thank HÉLÈNE LABRANCHE who constantly brought her good humour and warm smile to the lab. And just gave me a glimpse of her inherent potential as a teacher.

Alain Lavigne and Jocelyn Côté my two colleagues, were there not only to advise and help me in my work but became good friends thus creating a pleasant and familiar atmosphere (filled with good music!).

Last but not least, my family and close friends provided me with constant support, encouragement and understanding, making my goals that much easier to accomplish.

Lavanya Narasiah.

VI. ANNEXES

)

2

ANNEXE A

pAdED (#167)

Ce plasmid a été construit par l'insertion d'un fragment de DNA génomique humaine DraI 666pb (de psp64FN #65) incluant l'exon ED1 et des portions des deux introns adjacents, dans pSPAd coupé par StuI et HincII (Chabot et al., 1992).

Le plasmid pAdED fut utilisé pour générer les transcrits AF/S (témoin positif alterne) et AF/B (témoin négatif alterne), par linéarisation aux sites StuI et BstEII respectivement et transcription *in vitro* à partir du promoteur SP6.

Ce même plasmide a servi pour la construction des clones pAdEDA-7Bex et pAdEDA-Pu de cette étude.

pAdED+9nt (F10SE)

Ce plasmide fut construit par l'insertion de la séquence riche en purines de l'exon ED1 de 9 nt (oligonucléotides hybridés EDPU-1/EDPU-2), au site BstEII du plasmide pAdED (#167) délété pour le segment BstEII jusqu'à NcoI.

Ce clone fut employé pour générer le transcrit témoin positif AF+9nt, par linéarisation avec EcoRI et transcription à partir du promoteur SP6

Contrôle interne pKA1-77BA (#222)

Un fragment de ~150pb obtenu par digestion du plasmide pKA1-7B par HindIII et XbaI, fut inséré aux sites SmaI et XbaI du plasmide pKA1-7 (X. Yang).

pΦX7 (#233)

Ce plasmide a été construit par l'insertion d'un fragment de 281 nt de séquences procaryotiques de ΦX174, comportant un pseudo-site d'épissage 3', dans pAdED coupé par BstEII (voir papier Lavigueur et al., 1993).

Ce plasmide fut employé pour générer les transcrits A-ΦX7-F/S (témoin positif) et A-ΦX7-F/Bu (témoin négatif), par linéarisation aux sites StuI et Bsu36I respectivement et transcription *in vitro* à partir du promoteur SP6. Il a également servi pour la construction des mutants pAd-ΦX7-ED-Pu.

Transcrits d'ARNs SE et SEA

Les ARNs SE et SEA ont été générés à partir du plasmide pKFNB (#75) contenant un fragment BstEII de 1.5kb de fibronectine rempli à la Klenow et inséré au site EcoRV de pBluescript KS(+) de Stratagene.

Le site de restriction StuI pour l'ARN SE et l'oligonucléotide FN1394 pour SEA, ont été utilisés pour linéariser le vecteur pKFNB et effectuer la transcription *in vitro* des RNAs SE et SEA à partir du promoteur T7.

Annexe B

QUANTIFICATION PAR PHOSPHORIMAGER

Exemple de calculs pour les valeurs calculées avec correction à l'aide d'un contrôle interne (stratégie première):

1. L'efficacité d'épissage des substrats d'essais ont été estimés par le rapport:

$$\text{produit lasso/pré-mRNA substrat} = \frac{a - r}{b}$$

2. L'efficacité d'épissage du contrôle interne (CI) dans chaque échantillon a été estimé par le rapport:

$$\text{produit/pré-mRNA} = \frac{d}{c}$$

3. Pour chaque expérience, la valeur optimale d/c^* (habituellement la plus élevée) parmi tous les valeurs d'efficacité d'épissage des contrôles internes, a été choisi.

Ensuite, toutes les valeurs d'efficacité d'épissage des substrats d'essais et des témoins de l'expérience ($a-r/b$) ont été corrigés pour les différences observées entre l'efficacité d'épissage de leurs CI et celui de la valeur optimale choisi d/c^* .

Ex. : valeur "optimale" d'efficacité d'épissage du CI choisi dans l'expérience: $d/c^* = 0,24$

efficacité d'épissage du CI dans l'échantillon X:

$$d/c = 0,19$$

efficacité d'épissage du substrat X

$$\frac{a-r}{b} = 0,008$$

b

Différence d'efficacité d'épissage entre

$$\text{CI optimal et CI de l'échantillon X} : \frac{0,24}{0,19} = 1,26X$$

Correction de la valeur d'efficacité d'épissage du substrat
d'essai de l'échantillon X pour cette différence:

$$1,26 \times 0,008 = 0,01$$

4. En attribuant une valeur arbitraire de 10 pour l'efficacité d'épissage du témoin positif AF+9 nt ou A-φX7-F/S employé, des valeurs relatives à ce témoin ont été calculées pour les substrats d'essais corrigés.

Ex.: valeur **corrigée** d'efficacité d'épissage du témoin positif:

$$\frac{a-r}{b} = 0,021$$

b

valeur **corrigée** d'efficacité d'épissage du substrat d'essai X:

$$\frac{a-r}{b} = 0,01$$

b

En supposant pour le témoin positif que $0,021 = 10$

Alors l'**efficacité d'épissage relatif corrigé** du substrat d'essai sera : $\frac{10 \times 0,01}{0,021} = 4,8$

VII. BIBLIOGRAPHIE

Aebi, M., H. Hornig, R. A. Padgett, J. Reiser, and C. Weissmann. 1986. Sequence requirements for splicing of higher eukaryotic nuclear pre- mRNA. *Cell* 47:555-565.

Aebi, M., H. Hornig, and C. Weissmann. 1987. 5' cleavage site in eukaryotic pre-mRNA splicing is determined by the overall 5' splice region, not by the conserved 5' GU. *Cell* 50:237-246.

Amrein, H., M. L. Hedley and T. Maniatis. 1994. The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by transformer-2. *Cell*. 76:735-746.

Baker, B. S. 1989. Sex in flies: the splice of life. *Nature* 340:521-524.

Ben-David, Y., M. R. Bani, B. Chabot, A. De Koven, and A. Berstein. 1992. Retroviral insertions downstream of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 gene in erythroleukemia cells : Evidence that A1 is not essential for cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 12:4449-4455.

Beyer, A. L. and Y. N. Osheim. 1988. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes. Dev.* 2:754-765.

Bindereif, A., T. Wolff, and M. R. Green. 1990. Discrete domains of human U6 snRNA required for the assembly of U4/U6 snRNP and splicing complexes. *EMBO J.* 9:251-255.

Bingham, P. M., T. B. Chou, I. Mims, and Z. Zachar. 1988. On/off regulation of gene expression at the level of splicing. *Trends. Genet.* 4:134-138.

Black, D. L. 1991. Does steric interference between splice sites block the splicing of a short c-src neuron-specific exon in non-neuronal cells? *Genes. Dev.* 5:389-402.

Black, D. L. 1992. Activation of c-src neuron-specific splicing by an unusual RNA element in vivo and in vitro. *Cell* 69:795-807.

Black, D. L., B. Chabot, and J. A. Steitz. 1985. U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in pre-messenger RNA splicing. *Cell* 42:737-750.

Brody, E. and J. Abelson. 1985. The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* 228:963-967.

Brunak, S. and J. Engelbrecht. 1991. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J. Mol. Biol.* 220:49-65.

Caputi, M., G. Casari, S. Guenzi, R. Tagliabue, A. Sidoli, C. A. Melo and F. E. Baralle. 1994. A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon. *Nucleic Acids Res.* 22:1018-1022.

Cavaloc, Y., m. Popielarz, J. P. Fuschs, R. Gattoni, J. Stevenin. 1994. Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: A novel 35kDa factor of the serine/arginine protein family. *EMBO.* 13:2639-2649.

Chabot, B. 1994. Synthesis and purification of RNA substrates. In: RNA processing: A practical approach. IRL Press, Oxford. pp. 1-30.

Chabot, B., D. L. Black, D. M. LeMaster, and J. A. Steitz. 1985. The 3' splice site of pre-messenger RNA is recognized by a small nuclear ribonucleoprotein. *Science* 230:1344-1349.

Chabot, B., D. Frappier, and H. La Branche. 1992. Differential ASF/SF2 activity in extracts from normal WI38 and transformed WI38VA13 cells. *Nucleic Acids Res.* 20:5197-5204.

Chabot, B. and J. A. Steitz. 1987. Multiple interactions between the splicing substrate and small nuclear ribonucleoproteins in spliceosomes. *Mol. Cell Biol.* 7:281-293.

Chain, A. C., S. Zollman, J. C. Tseng, and F. A. Laski. 1991. Identification of a cis-acting sequence required for germ line-specific splicing of the P element ORF2-ORF3 intron. *Mol. Cell Biol.* 11:1538-1546.

Clouet, O., Y. d'Aubenton Carafa, P. Sirand-Pugnet, M. Gallego, E. Brody, and J. Marie. 1991. RNA secondary structure repression of a muscle-specific exon in HeLa cell nuclear extracts. *Science* 252:1823-1828.

Cooke, N. E., J. Ray, M. A. Watson, P. A. Estes, B. A. Kuo, and S. A. Liebhaber. 1988. Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J. Clin. Invest.* 82:270-275.

Cooper, T. A. 1992. In vitro splicing of cardiac troponin T precursors. Exon mutations disrupt splicing of the upstream intron. J. Biol. Chem. 267:5330-5338.

Cooper, T. A. and C. P. Ordahl. 1989. Nucleotide substitutions within the cardiac troponin T alternative exon disrupt pre-mRNA alternative splicing. Nucleic Acids Res. 17:7905-7921.

Cote, G. J., D. T. Stolow, S. Peleg, S. M. Berget, and R. F. Gagel. 1992. Identification of exon sequences and an exon binding protein involved in alternative RNA splicing of calcitonin/CGRP. Nucleic Acids Res. 20:2361-2366.

Côté, J., J. Beaudoin, R. Tacke and B. Chabot. 1995. The U1 small nuclear ribonucleoprotein/5' splice site interaction affects U2AF⁶⁵ binding to the downstream 3' splice site. J. Biol. Chem. 270:4031-4036.

Crispino, J. D., B. J. Blencowe, P. A. Sharp. 1994. Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP. Science. 265: 1866-1868.

Dignam, J. D., R. M. Lebovitz and R. G. Roeder. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res. 11:1475-1489.

Dirksen, W. P., R. K. Hampson, Q. Sun, and F. M. Rottman. 1994. A purin-rich exon sequence influences alternate splicing of bovine growth hormone pre-mRNA. J. Biol. Chem. 269:6431-6436.

Domdey, H., B. Apostol, R. J. Lin, A. Newman, E. Brody, and J. Abelson. 1984. Lariat structures are in vivo intermediates in yeast pre-mRNA splicing. Cell 39:611-621.

)
Domenjoud, L., H. Gallinaro, L. Kister, S. Meyer, and M. Jacob. 1991. Identification of a specific exon sequence that is a major determinant in the selection between a natural and a cryptic 5' splice site. *Mol. Cell Biol.* 11:4581-4590.

Dominski, Z. and R. Kole. 1991. Selection of splice sites in pre-mRNAs with short internal exons. *Mol. Cell Biol.* 11:6075-6083.

Dominski, Z. and R. Kole. 1992. Cooperation of pre-mRNA sequence elements in splice site selection. *Mol. Cell Biol.* 12:2108-2114.

Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, and J. S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008.

)
Eperon, L. P., I. R. Graham, A. D. Griffiths, and I. C. Eperon. 1988. Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase? *Cell* 54:393-401.

Eperon, I. C., D. C. Ireland, R. A. Smith, A. Mayeda, and A. R. Krainer. 1993. Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *EMBO J.* 12:3607-3617.

Estes, P. A., N. E. Cooke, and S. A. Liebhaber. 1992. A native RNA secondary structure controls alternative splice-site selection and generates two human growth hormone isoforms. *J. Biol. Chem.* 267:14902-14908.

Friendewey, D. and W. Keller. 1985. Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences. Cell 42:355-367.

Freyer, G. A., J. P. O'Brien, and J. Hurwitz. 1989. Alterations in the polypyrimidine sequence affect the in vitro splicing reactions catalyzed by HeLa cell-free preparations. J. Biol. Chem. 264:14631-14637.

Fu, X. D. 1993. Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins. Nature 365:82-85.

Fu, X. -D., A. Mayeda, T. Maniatis, and A. R. Krainer. 1992. General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities *in vitro*, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11224-11228.

Fu, X. D., R. A. Katz, A. M. Skalka, and T. Maniatis. 1991. The role of branchpoint and 3'-exon sequences in the control of balanced splicing of avian retrovirus RNA. Genes. Dev. 5:211-220.

Fu, X. D. and T. Maniatis. 1992. The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:1725-1729.

Fu, X. Y., H. Ge, and J. L. Manley. 1988. The role of the polypyrimidine stretch at the SV40 early pre-mRNA 3' splice site in alternative splicing. EMBO J. 7:809-817.

Fu, X. Y. and J. L. Manley. 1987. Factors influencing alternative splice site utilization in vivo. Mol. Cell Biol. 7:738-748.

Furdon, P. J. and R. Kole. 1988. The length of the downstream exon and the substitution of specific sequences affect pre-mRNA splicing in vitro. *Mol. Cell Biol.* 8:860-866.

Gallego, M. E., L. Balvay, and E. Brody. 1992. *cis*-acting sequences involved on exon selection in the chicken b-tropomyosin gene. *Mol. Cell Biol.* 12:5415-5425.

Garcia-Blanco, M. A., S. F. Jamison, and P. A. Sharp. 1989. Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes. Dev.* 3:1874-1886.

Ge, H. and J. L. Manley. 1990. A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62:25-34.

Ge, H., J. Noble, J. Colgan, and J. L. Manley. 1990. Polyoma virus small tumor antigen pre-mRNA splicing requires cooperation between two 3' splice sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:3338-3342.

Ge, H., P. Zuo, and J. L. Manley. 1991. Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators. *Cell* 66:373-382.

Gerke, V. and J. A. Steitz. 1986. A protein associated with small nuclear ribonucleoprotein particles recognizes the 3' splice site of premessenger RNA. *Cell* 47:973-984.

Gil, A., P. A. Sharp, S. F. Jamison and M. A. Garcia-Blanco. 1991. Characterisation of cDNAs encoding the polypyrimidine tract protein. *Genes. Dev.* 5:1224-1236.

Goux-Pelletan, M., D. Libri, Y. d'Aubenton-Carafa, M. Fiszman, E. Brody, and J. Marie. 1990. In vitro splicing

of mutually exclusive exons from the chicken beta-tropomyosin gene: role of the branch point location and very long pyrimidine stretch. *EMBO J.* 9:241-249.

Grabowski, P. J., S. R. Seiler, and P. A. Sharp. 1985. A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 42:345-353.

Graham, I. R., M. Hamshere, and I. C. Eperon. 1992. Alternative splicing of a human α -tropomyosin muscle-specific exon: Identification of determining sequences. *Mol. Cell. Biol.* 12:3872-3882.

Green, M. R. 1991. Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:559-599.

Guo, W., G. J. Mulligan, S. Wormsley, and D. M. Helfman. 1991. Alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA: cis-acting elements and cellular factors that block the use of a skeletal muscle exon in nonmuscle cells. *Genes. Dev.* 5:2096-2107.

Hampson, R. K., L. La Follette, and F. M. Rottman. 1989. Alternative processing of bovine growth hormone mRNA is influenced by downstream exon sequences. *Mol. Cell Biol.* 9:1604-1610.

Hampson, R. K. and F. M. Rottman. 1987. Alternative processing of bovine growth hormone mRNA: nonsplicing of the final intron predicts a high molecular weight variant of bovine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:2673-2677.

Hedley, M. L. and T. Maniatis. 1991. Sex-specific splicing and polyadenylation of dsx pre-mRNA requires a

sequence that binds specifically to tra-2 protein in vitro. Cell 65:579-586.

Helfman, D. M., W. M. Ricci, and L. A. Finn. 1988. Alternative splicing of tropomyosin pre-mRNAs in vitro and in vivo. Genes. Dev. 2:1627-1638.

Helfman, D. M. and W. M. Ricci. 1989. Branch point selection in alternative splicing of tropomyosin pre-mRNAs. Nucleic Acids Res. 17:5633-5650.

Hoshijima, K., K. Inoue, I. Higushi, H. Sakamoto, and Y. Shimura. 1991. Control of double sex alternative splicing by transformer and transformer-2 in *Drosophila*. Science. 252:833-836.

Hynes, R. 1985. Molecular biology of fibronectin. Annu. Rev. Cell Biol. 1:67-90.

Inoue, K., K. Hoshijima, I. Higuchi, H. Sakamoto, and Y. Shimura. 1992. Binding of the *Drosophila* transformer and transformer-2 proteins to the regulatory elements of doublesex primary transcript for sex-specific RNA processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8092-8096.

Jackson, I. J. 1991. A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites. Nucleic Acids Res. 19:3795-3798.

Kakizuka, A., T. Ingi, T. Murai, and S. Nakanishi. 1990. A set of U1 snRNA-complementary sequences involved in governing alternative RNA splicing of the kininogen genes. J. Biol. Chem. 265:10102-10108.

Katz, R. A. and A. M. Skalka. 1990. Control of retroviral RNA splicing through maintenance of suboptimal processing signals. Mol. Cell Biol. 10:696-704.

Kohtz, J. D., S. F. Jamison, C. L. Will, P. Zuo, R. Lührmann, M. A. Garcia-Blanco, and J. L. Manley. 1994. Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* 368:119-124.

Kornblihtt, A. R., K. Umezawa, K. Vibe-Pedersen, and F. E. Baralle. 1985. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.* 4:1755-1759.

Krainer, A. R. 1988. Pre-mRNA splicing by complementation with purified human U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs. *Nucleic Acids Res.* 16:9415-9429.

Krainer, A., and T. Maniatis. 1988. In: *Frontiers in molecular biology: Transcription and splicing.* (eds. Hames and Glover) IRL, Oxford. pp. 131-296.

Krainer, A. R., G. C. Conway, and D. Kozak. 1990a. Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes. Dev.* 4:1158-1171.

Krainer, A. R., G. C. Conway, and D. Kozak. 1990b. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell* 62:35-42.

Krainer, A. R. and T. Maniatis. 1985. Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 42:725-736.

Krainer, A. R., A. Mayeda, D. Kozak, and G. Binns. 1991. Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and *Drosophila* splicing regulators. *Cell* 66:383-394.

Kuo, H. C., F. H. Nasim, and P. J. Grabowski. 1991. Control of alternative splicing by the differential binding of U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Science* 251:1045-1050.

Lamond, A. I. 1991. Nuclear RNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:493-501.

Lavigueur, A., H. La Branche, A. R. Kornblihtt, and B. Chabot. 1993. A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev.* 7:2405-2417.

Lear, A. L., L. P. Eperon, I. M. Wheatley, and I. C. Eperon. 1990. Hierarchy for 5' splice site preference determined *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 211:103-115.

Li, H. and P. M. Bingham. 1991. Arginine/serine-rich domains of the su(wa) and tra RNA processing regulators target proteins to a subnuclear compartment implicated in splicing. *Cell* 67:335-342.

Libri, D., M. Goux-Pelletan, E. Brody, and M. Y. Fiszman. 1990. Exon as well as intron sequences are cis-regulating elements for the mutually exclusive alternative splicing of the beta tropomyosin gene. *Mol. Cell Biol.* 10:5036-5046.

Libri, D., A. Piseri, and M. Y. Fiszman. 1991. Tissue-specific splicing *in vivo* of the beta-tropomyosin gene: dependence on an RNA secondary structure. *Science* 252:1842-1845.

Ligtenberg, M. J., H. L. Vos, A. M. Gennissen, and J. Hilkens. 1990. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is

generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J. Biol. Chem.* 265:5573-5578.

Luo, Y. and G. G. Carmichael. 1991. Splice site choice in a complex transcription unit containing multiple inefficient polyadenylation signals. *Mol. Cell Biol.* 11:5291-5300.

Maniatis, T. 1991. Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Science* 251:33-34.

Maniatis, T. and R. Reed. 1987. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* 325:673-678.

Mardon, H. J., G. Sebastio, and F. E. Baralle. 1987. A role for exon sequences in alternative splicing of the human fibronectin gene. *Nucleic Acids Res.* 15:7725-7733.

Mariman, E. C., P. T. Sillekens, R. J. van Beek-Reinders, and W. J. van Venrooij. 1984. A model for the excision of introns 1 and 2 from adenoviral major late pre-messenger RNAs. *J. Mol. Biol.* 178:47-62.

Mayeda, A. and A. R. Krainer. 1992a. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68:365-375.

Mayeda, A., A. M. Zahler, A. R. Krainer, and M. B. Roth. 1992b. Two members of a conserved family of nuclear phosphoproteins are involved in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:1301-1304.

McKeown, M. 1992. Alternative mRNA splicing. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8:133-155.

Michaud, S. and R. Reed. 1991. An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes. Dev.* 5:2534-2546.

Michaud, S. and R. Reed. 1993. A functional association between the 5' and 3' splice sites is established in the earliest prespliceosome complex (E) in mammals. *Genes Dev.* 7:1008-1020.

Mullen, M. P., C. W. Smith, J. G. Patton, and B. Nadal-Ginard. 1991. α -tropomyosin mutually exclusive exon selection: competition between branchpoint/polypyrimidine tracts determines default exon choice. *Genes. Dev.* 5:642-655.

Nagoshi, R. N. and B. S. Baker. 1990. Regulation of sex-specific RNA splicing at the *Drosophila* doublesex gene: cis-acting mutations in exon sequences alter sex-specific RNA splicing patterns. *Genes. Dev.* 4:89-97.

Nelson, K. K. and M. R. Green. 1988. Splice site selection and ribonucleoprotein complex assembly during in vitro pre-mRNA splicing. *Genes. Dev.* 2:319-329.

Nelson, K. K. and M. R. Green. 1990. Mechanism for cryptic splice site activation during pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:6253-6257.

Nemeroff, M. E., U. Utans, A. Kramer, and R. M. Krug. 1992. Identification of cis-acting intron and exon regions in influenza virus NS1 mRNA that inhibit splicing and cause the formation of aberrantly sedimenting presplicing complexes. *Mol. Cell Biol.* 12:962-970.

Niwa, M. and S. M. Berget. 1991. Mutation of the AAUAAA polyadenylation signal depresses in vitro splicing of proximal but not distal introns. *Genes. Dev.* 5:2086-2095.

Noble, J. C., C. Prives, and J. L. Manley. 1988. Alternative splicing of SV40 early pre-mRNA is determined by branch site selection. *Genes. Dev.* 2:1460-1475.

Oshima, Y. and y. Gotoh. 1987. Signals for the selection of a splice site in pre-mRNA. *J. Mol. Biol.* 195:247-259.

Owens, R. J., A. R. Kornblihtt, and F. E. Baralle. 1986. Fibronectin, the generation of multiple polypeptides from a single gene. *Oxf. Surv. Eukaryot. Genes.* 3:141-160.

Oyama, F., S. Hirohashi, Y. Shimosato, K. Titani, and K. Sekiguchi. 1989. Dereglulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors. *J. Biol. Chem.* 264:10331-10334.

Oyama, F., S. Hirohashi, Y. Shimosato, K. Titani, and K. Sekiguchi. 1990. Oncodevelopmental regulation of the alternative splicing of fibronectin pre-messenger RNA in human lung tissues. *Cancer Res.* 50:1075-1078.

Padgett, R. A., P. J. Grabowski, M. M. Konarska, S. Seiler, and P. A. Sharp. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1119-1150.

Padgett, R. A., M. M. Konarska, P. J. Grabowski, S. F. Hardy, and P. A. Sharp. 1984. Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 225:898-903.

Patton, J. G., S. A. Mayer, P. Tempst, and B. Nadal-Ginard. 1991. Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes. Dev.* 5:1237-1251.

Peterson, M. L. and R. P. Perry. 1989. The regulated production of mu m and mu s mRNA is dependent on the relative efficiencies of mu s poly(A) site usage and the c mu 4-to-M1 splice. Mol. Cell Biol. 9:726-738.

Pikielny, C. W., J. L. Teem, and M. Rosbash. 1983. Evidence for the biochemical role of an internal sequence in yeast nuclear mRNA introns: implications for U1 RNA and metazoan mRNA splicing. Cell 34:395-403.

Reed, R. 1990. Protein composition of mammalian spliceosomes assembled in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:8031-8035.

Reed, R. and T. Maniatis. 1986. A role for exon sequences and splice-site proximity in splice-site selection. Cell 46:681-690.

Reed, R. and T. Maniatis. 1988. The role of the mammalian branchpoint sequence in pre-mRNA splicing. Genes. Dev. 2:1268-1276.

Ricketts, M. H., M. J. Simons, J. Parma, L. Mercken, Q. Dong, and G. Vassart. 1987. A nonsense mutation causes hereditary goitre in the Afrikaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:3181-3184.

Robberson, B. L., G. J. Cote, and S. M. Berget. 1990. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. Mol. Cell Biol. 10:84-94.

Rodriguez, J. R., C. W. Pikielny, and M. Rosbash. 1984. In vivo characterization of yeast mRNA processing intermediates. Cell 39:603-610.

Rosbash, M. and B. Seraphin. 1991. Who's on first? The U1 snRNP-5' splice site interaction and splicing. *Trends. Biochem. Sci.* 16:187-190.

Roth, M. B., A. M. Zahler, J-A. Stolk. 1991 A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J. Cell. Bio.* 115:587-596.

Ruby, S. W. and J. Abelson. 1991. Pre-mRNA splicing in yeast. *Trends. Genet.* 7:79-85.

Ruskin, B., A. R. Krainer, T. Maniatis, and M. R. Green. 1984. Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre- mRNA splicing in vitro. *Cell* 38:317-331.

Ruskin, B., P. D. Zamore, and M. R. Green. 1988. A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell* 52:207-219.

Ryner, L. C. and B. S. Baker. 1991. Regulation of doublesex pre-mRNA processing occurs by 3'-splice site activation. *Genes. Dev.* 5:2071-2085.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Schwarzbauer, J. E., R. S. Patel, D. Fonda, and R. O. Hynes. 1987. Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J.* 6:2573-2580.

Senapathy, P., M. B. Shapiro, and N. L. Harris. 1990. Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence

statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol.* 183:252-278.

Sharp, P. A. 1987. Splicing of messenger RNA precursors [published erratum appears in *Science* 1987 Aug 28;237(4818):964]. *Science* 235:766-771.

Siebel, C. W., L. D. Fresco, and D. C. Rio. 1992. The mechanism of somatic inhibition of *Drosophila* P-element pre-mRNA splicing: Multiprotein complexes at an exon pseudo-5' splice site control U1 snRNP binding. *Genes Dev.* 6:1386-1401.

Smith, C. W. and B. Nadal-Ginard. 1989. Mutually exclusive splicing of alpha-tropomyosin exons enforced by an unusual lariat branch point location: implications for constitutive splicing. *Cell* 56:749-758.

Smith, C. W., J. G. Patton, and B. Nadal-Ginard. 1989. Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* 23:527-577.

Solnick, D. 1985. Alternative splicing caused by RNA secondary structure. *Cell* 43:667-676.

Solnick, D. and S. I. Lee. 1987. Amount of RNA secondary structure required to induce an alternative splice. *Mol. Cell Biol.* 7:3194-3198.

Somasekhar, M. B. and J. E. Mertz. 1985. Exon mutations that affect the choice of splice sites used in processing the SV40 late transcripts. *Nucleic Acids Res.* 13:5591-5609.

Staknis, D. and R. Reed. 1994a. SR proteins promote the first specific recognition of pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle

in a general splicing enhancer complex. *Mol. Cell Biol.* 7670-7682.

Staknis, D. and R. Reed. 1994b. Direct interactions between pre-mRNA and six U2 small nuclear ribonucleoproteins during spliceosome assembly. *Mol. Cell. Biol.* 14:2994-3005.

Steingrimsdottir, H., G. Rowley, G. Dorado, J. Cole, and A. R. Lehmann. 1992. Mutations which alter splicing in the human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. *Nucleic Acids Res.* 20:1201-1208.

Steitz, J. A., D. L. Black, V. Gerke, K. A. Parker, A. Kramer, D. Frendewey and W. Keller. 1989. Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles. ed. Birnstier, M. L. (Springer, Berlin). 115-154.

Streuli, M. and H. Saito. 1989. Regulation of tissue-specific alternative splicing: exon-specific cis- elements govern the splicing of leukocyte common antigen pre-mRNA. *EMBO J.* 8:787-796.

Sun, Q., R. R. Hampson and F. M. Rottman. 1993. *In vitro* analysis of bovine growth hormone pre-mRNA alternative splicing : Exon sequences and trans-acting factors. *J. Biol. Chem.* 268:15659-15666.

Swanson, M. S. and G. Dreyfuss. 1988. RNA binding specificity of hnRNP proteins: a subset bind to the 3' end of introns. *EMBO J.* 7:3519-3529.

Talerico, M. and S. M. Berget. 1990. Effect of 5' splice site mutations on splicing of the preceding intron. *Mol. Cell Biol.* 10:6299-6305.

Tanaka, K., A. Watakabe and Y. Shimura. 1994. Polypurine sequences within a downstream exon functions as a splicing enhancer. *Mol. Cell Bio.* 14:1347-1354.

Tarn, W-Y., and J. A. Steitz. 1994. SR proteins can compensate for the loss of UlsnRNP functions in vitro. *Genes and Dev.* 8:2704-2717.

Tazi, J., C. Alibert, J. Tamsamani, I. Reveillaud, G. Cathala, C. Brunel, and P. Jeanteur. 1986. A protein that specifically recognizes the 3' splice site of mammalian pre-mRNA introns is associated with a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell.* 47:755-766.

Tian, M. and T. Maniatis. 1992. Positive control of pre-mRNA splicing in vitro. *Science* 256:237-240.

Tian, M. and T. Maniatis. 1993. A splicing enhancer complex controls alternative splicing of doublesex pre-mRNA. *Cell.* 74:105-114.

Tsai, A. Y., M. Streuli, and H. Saito. 1989. Integrity of the exon 6 sequence is essential for tissue-specific alternative splicing of human leukocyte common antigen pre-mRNA. *Mol. Cell Biol.* 9:4550-4555.

Tsukahara, T., C. Casciato, D. M. Helfman. 1994. Alternative splicing of b-tropomyosin pre-mRNA: Multiple cis-elements can contribute to the use of the 5'- and 3'-splice sites of the non-muscle/smooth muscle exon 6. *Nucleic Acids Res.* 22:2318-2325.

Utans, U., S. E. Behrens, R. Luhrmann, R. Kole, and A. Kramer. 1992. A splicing factor that is inactivated during in vivo heat shock is functionally equivalent to the

[U4/U6.U5] triple snRNP-specific proteins. *Genes. Dev.* 6:631-641.

Valcárcel, J., R. Singh, P. D. Zamore, and M. R. Green. 1993. The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of *transformer* pre-mRNA. *Nature* 362:171-175.

Vellard, M., A. Sureau, J. Soret, C. Martinerie, and B. Perbal. 1992. A potential splicing factor is encoded by the opposite strand of the trans-spliced c-myb exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:2511-2515.

Wakamatsu, N., H. Kobayashi, T. Miyatake, and S. Tsuji. 1992. A novel exon mutation in the human beta-hexosaminidase beta subunit gene affects 3' splice site selection. *J. Biol. Chem.* 267:2406-2413.

Watakabe, A., K. Inoue, H. Sakamoto, and Y. Shimura. 1989. A secondary structure at the 3' splice site affects the in vitro splicing reaction of mouse immunoglobulin mu chain pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 17:8159-8169.

Watakabe, A., H. Sakamoto, and Y. Shimura. 1991. Repositioning of an alternative exon sequence of mouse IgM pre-mRNA activates splicing of the preceding intron. *Gene Expr.* 1:175-184.

Watakabe, A., K. Tanaka, and Y. Shimura. 1993. The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev.* 7:407-418.

Wu, J. and J. L. Manley. 1989. Mammalian pre-mRNA branch site selection by U2 snRNP involves base pairing. *Genes. Dev.* 3:1553-1561.

Wu, J. Y. and T. Maniatis. 1993. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75:1061-1070.

Xu, R., J. Teng, and T. A. Cooper. 1993. The cardiac troponin T alternative exon contains a novel purine-rich positive splicing element. *Mol. Cell. Biol.* 13:3660-3674.

Yang, X., M. -R. Bani, S. -J. Lu, S. Rowan, Y. Ben-David, and B. Chabot. 1994. The Al and Al^B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoparticles modulate 5' splice site selection *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:6924-6928.

Yeakley, J. M., F. Hedjran, J-P. Morfin, N. Merillat, M. G. Rosenfeld, R. B. Emeson. 1993. Control of Calcitonin/calcitonin gene-related peptide pre-mRNA processing by constitutive intron and exon elements. *Mol. Cell. Biol.* 13:5999-6011.

Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk, and M. B. Roth. 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes. Dev.* 6:837-847.

Zahler, A. M., K. M. Neugebauer, W. S. Lane, and M. B. Roth. 1993a. Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science* 260:219-222.

Zahler, A. M., K. M. Neugebauer, J. A. Stolk, and M. B. Roth. 1993b. Human SR proteins and isolation of a cDNA encoding SRp75. *Mol. Cell. Biol.* 13:4023-4028.

Zamore, P. D., J. G. Patton, and M. R. Green. 1992. Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. *Nature* 355:609-614.

Zamore, P. D., and M. R. Green. 1989. Identification, purification and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:9243-9247.

Zeitlin, S. and A. Efstratiadis. 1984. In vivo splicing products of the rabbit beta-globin pre-mRNA. *Cell* 39:589-602.

Zhuang, Y., H. Leung, and A. M. Weiner. 1987. The natural 5' splice site of simian virus 40 large T antigen can be improved by increasing the base complementarity to U1 RNA. *Mol. Cell Biol.* 7:3018-3020.

Zhuang, Y. and A. M. Weiner. 1986. A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* 46:827-835.

Zhuang, Y. and A. M. Weiner. 1989. A compensatory base change in human U2 snRNA can suppress a branch site mutation. *Genes. Dev.* 3:1545-1552.

Zillmann, M., S. D. Rose, and S. M. Berget. 1987. U1 small nuclear ribonucleoproteins are required early during spliceosome assembly. *Mol. Cell Biol.* 7:2877-2883.

Zillmann, M., M. L. Zapp, and S. M. Berget. 1988. Gel electrophoretic isolation of splicing complexes containing U1 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Mol. Cell Biol.* 8:814-821.