

Université de Sherbrooke

Identification et caractérisation d'une deuxième protéine codée par le gène *ATXN1*

Par
Danny Bergeron
Département de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1E 4K8

Sherbrooke, Québec, Canada
Mars 2013

Membre du jury d'évaluation
Xavier Roucou et Guylain Boissonneault, département de biochimie
François Boudreau, département de biologie cellulaire

Danny Bergeron, 2013



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-96253-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-96253-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Identification et caractérisation d'une deuxième protéine codée par le gène *ATXN1*

Par
Danny Bergeron
Département de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1N 5N4

La traduction d'une séquence nucléotidique d'ARNm dans plus d'un cadre de lecture est un phénomène découvert chez les virus vers la fin des années 1970. Depuis, quelques exemples de ce phénomène de traduction alternative ont été découverts chez l'humain dans les gènes *INK4a*, *GNAS1*, *XBPI*, et *PRNP*. La protéine alternative du gène *GNAS1*, nommée ALEX, interagit et régule la protéine de référence et une mutation dans la protéine alternative peut engendrer certains phénotypes pathologiques. Plusieurs groupes de recherche ont effectué des analyses bio-informatiques sur le génome humain et ont suggéré que la traduction alternative de gènes pourrait être beaucoup plus importante que les quelques exemples connus à ce jour.

Nous avons créé une base de données dans le but de prédire ces protéines alternatives à partir du transcriptome humain. Le gène *ATXN1* semblait un candidat très intéressant à valider puisque la protéine de référence du gène, l'ATXN1, est impliquée dans une maladie neurodégénérative importante : l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 (SCA1). Cette pathologie est causée par l'expansion d'une région CAG dans l'ADN qui est traduite en région polyglutamique. La protéine pathologique tend à agréger dans des inclusions nucléaires, ce qui induit l'altération de nombreux interacteurs de l'ATXN1 et pourrait interférer avec la fonction normale de ATXN1.

Nous avons observé la présence de deux sites d'initiation alternatifs dans la séquence codante du gène *ATXN1*, situés dans le cadre de lecture +3. Expérimentalement, nous avons montré l'existence de deux isoformes de la protéine alternative nommée Alt-ATXN1, l'isoforme long étant fortement majoritaire. Alt-ATXN1, qui se localise dans le noyau, interagit de façon directe avec l'ATXN1 et coagrège avec celle-ci dans les inclusions nucléaires caractéristiques de la SCA1. Cette caractéristique intéressante suggère que la fonction biologique d'Alt-ATXN1 pourrait être altérée dans les cas de pathologie due à l'agrégation de l'ATXN1. Nous démontrons qu'Alt-ATXN1 lie les ARNm et possède une localisation nucléaire dépendante de la transcription, ce qui est caractéristique des protéines impliquées dans le processing de l'ARNm. L'existence d'Alt-ATXN1 a été confirmée *in vivo* dans une lignée neuronale humaine et dans des extraits de cervelets humains. Suite à ces découvertes, la fonction approfondie ainsi que la détermination du rôle d'Alt-ATXN1 dans la SCA1 demeurent sous investigation.

Mots-clé : ATXN1, Ataxie spinocérébelleuse de type 1, gènes chevauchants, cadre de lecture alternatif.

Table des matières

Liste des tableaux	IV
Liste des figures.....	V
Liste des abréviations	VI
1. Introduction.....	1
1.1. Les protéines alternatives.....	1
1.2. Les ataxies et maladies polyglutamines	7
1.3. Les maladies de type SCA1 et l'ATXN1	15
1.4. Localisation nucléaire	24
1.5. La présence d'un ORF alternatif possible dans la séquence codante du gène ATXN1	27
2. Article	29
Résumé de l'article	29
Abstract.....	33
Introduction.....	34
Materials and Methods.....	36
Results.....	42
Discussion.....	59
Acknowledgements.....	61
References.....	62
3. Discussion.....	67
3.1. Certaines fonctions attribuées à l'ATXN1 pourraient être associées à Alt-ATXN1	67
3.2. Rôle possible d'Alt-ATXN1 dans les maladies de type SCA1.....	68
3.3. Alt-ATXN1, une protéine alternative	73
3.4. Conclusion et perspectives.....	74
5. Remerciements	83
6. Références.....	84

Liste des tableaux

TABLEAU 1 MALADIES POLYGLUTAMINES CONNUES À CE JOUR.....	10
TABLEAU 2 FAMILLES DES KARYOPHERINES β	26
TABLE S1 PRIMERS SEQUENCES.....	56
TABLEAU 3 PROTÉINES INTERAGISSANT AVEC L'ATXN1.....	70

Liste des figures

FIGURE 1 : GENOME CIRCULAIRE DU VIRUS DE L'HEPATITE B DONT 50 % EST CONSTITUÉ DE GÈNES CHEVAUCHANTS	3
FIGURE 2 : REPRÉSENTATION DES ORFS CHEVAUCHANTS CONNUS CHEZ L'HUMAIN	4
FIGURE 3 : REPRÉSENTATION DE L'AUGMENTATION DE L'AMPC INTRACELLULAIRE CAUSÉE, EN PARTIE, PAR LA PERTE D'INTERACTION ENTRE XL α S ET ALEX	6
FIGURE 4 : REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS MÉCANISMES CONNUS INDUISANT LES MALADIES POLYGLUTAMINES	12
FIGURE 5 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA PROTÉINE ATXN1	16
FIGURE 6 : POURCENTAGE DES DIFFÉRENTS MARQUAGES CELLULAIRES DE L'ATXN1	20
FIGURE 7 : DÉBALANCEMENT DES COMPLEXES PROTÉIQUES CONTENANT L'ATXN1 DANS LA SCA1	23
FIGURES D'ARTICLE:	
FIGURE 1: AN ALTERNATIVE ORF OVERLAPS ATXN1 CODING SEQUENCE IN THE +3 READING FRAME.....	43
FIGURE 2: EXPRESSION OF ALT-ATXN1	45
FIGURE 3: ALT-ATXN1 AND ATXN1 COLOCALIZE IN NUCLEAR INCLUSIONS AND INTERACT.....	47
FIGURE 4: ATXN1 RECRUITS ALT-ATXN1 INSIDE INCLUSIONS.....	49
FIGURE 5: ALT-ATXN1 IS IMPORTED INTO THE NUCLEUS BY KAPB2 BY A TRANSCRIPTION-DEPENDENT MECHANISM AND BINDS RNA.....	51
FIGURE 6: ALT-ATXN1 IS ENDOGENOUSLY EXPRESSED.....	53
FIGURE S1: ATXN1(82Q) RECRUITS ALT-ATXN1 IN NUCLEAR INCLUSIONS.....	56
FIGURE S2: CAG REPEATS DO NOT MODIFY ALT-ATXN1 EXPRESSION, AND ALT-ATXN1 EXPRESSION DOES NOT MODIFY ATXN1 SOLUBILITY.....	57
FIGURE S3: VALIDATION OF POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST ALT-ATXN1.....	58
FIGURE 8 : TECHNIQUE DE PAR-CLIP	76
FIGURE 9 : TECHNIQUE DE CRIBLAGE DOUBLE HYBRIDE	78
FIGURE 10 : REPRÉSENTATION DU GÈNE CHEVAUCHANT POTENTIEL DANS <i>ATXN1L</i>	81

Liste des abréviations

AD : Maladie d'Alzheimer
ALS : Sclérose amyotrophique latérale
APP : Protéine précurseur amyloïde
AR : Récepteur androgène
ARNm : ARN messenger
ATN1 : Atrophin 1
ATXN1 : Ataxin 1
ATXN1L: ATXN1-like (aussi connue sous le nom de BOAT)
BOAT : Brother of ATXN1 (aussi connue sous le nom de ATXN1L)
CBP : CREB-binding protein
CIC : Capicua
cNLS : NLS classique
DRPLA : Atrophie de Dentatorubral-Pallidoluysian
EA : Ataxie épisodique
HD : Maladie de Huntington
Htt : Huntingtin
Kap β : Karyophérine β
MBP-M9M : Inhibiteur spécifique de la Kap β 2
NES : Signal d'export nucléaire
NLS : Séquence de localisation nucléaire
ORF : Cadre de lecture ouvert ou « Open Reading Frame »
PD : Parkinson
PrP^c : Protéine prion cytoplasmic
PY-NLS : NLS de type proline-tyrosine
RBM17 : RNA binding motif protein 17
RBS : Site de liaison des ribosomes
SCA : Ataxie spinocérébelleuse
SMBA : Amyotrophie bulbo-spinale liée à l'X
UPS : Système ubiquitine-protéasome

1. Introduction

1.1. Les protéines alternatives

La traduction d'un ARNm en protéine est un processus cellulaire extrêmement important nécessitant la reconnaissance d'un site d'initiation de la traduction. Autant chez les organismes procaryotes qu'eucaryotes, le codon AUG forme le site initiateur le plus utilisé (Kozak, 1999). Par la suite, le site exact utilisé pour amorcer la traduction à partir d'une séquence en ARNm dépendra grandement de l'environnement autour du site initiateur AUG. Par exemple chez les procaryotes, il existe dans l'ARNm une séquence appelée *ribosome binding site* (RBS), qui dirige le ribosome vers le site d'initiation de la traduction (Shine et Dalgarno, 1974; Shine et Dalgarno, 1975). Le RBS correspond à un ensemble de paires de bases qui permettent l'initiation de la traduction à proximité de cette séquence (Gold *et al.*, 1981; Nakamoto, 2009). Chez les eucaryotes, il existe une séquence signal qui effectue un rôle similaire au RBS, c'est-à-dire de diriger le ribosome à un site spécifique d'initiation de la traduction. Cette séquence se retrouve de part et d'autre de l'AUG initiateur. La séquence nucléotidique consensus, déterminée par mutations dirigées de la séquence entourant les trinuécléotides initiateurs, est la suivante : GCCA/GCCAUGG (Kozak, 1997), la purine en position -3 et la guanosine et position +4 étant les nucléotides les plus importants (Kozak, 1986).

Chez les procaryotes, un ARNm peut coder pour plus d'une protéine à la fois. En effet, un opéron procaryote constitue un arrangement de gènes situés à proximité, qui sont impliqués dans la même voie métabolique, et dont la régulation de l'unique transcrit impacte en même temps tous les cadres de lecture ouverts (Lodish *et al.*, 2005). Pour des raisons de simplicité, le terme ORF pour « Open Reading Frame », sera utilisé dans ce mémoire à la place de cadre de lecture ouvert. L'ARNm contenant plusieurs ORFs est traduit et génère plusieurs protéines différentes. Chez la plupart des virus, le génome, qui peut être sous forme d'ADN ou d'ARN, produit des ARNm polycistroniques qui coderont pour plusieurs protéines différentes (Powell, 2010). Bien qu'il existe de très rares

exceptions expérimentalement démontrées, les gènes des eucaryotes sont plutôt considérés monocistroniques, ce qui veut dire qu'un ARNm eucaryote ne pourrait coder que pour une seule protéine (Blumenthal, 2004).

En plus d'être polycistroniques, certaines séquences d'ARN viral peuvent être traduites dans plus d'un cadre de lecture, donnant ainsi deux ou plusieurs protéines issues d'ORFs chevauchants. En effet, cette caractéristique intéressante a été découverte à la fin des années 1970 chez les bactériophages ϕ X174 (Barrell *et al.*, 1976) et G4 (Shaw *et al.*, 1978), ainsi que chez le virus animal SV40 (Contreras *et al.*, 1977), une partie de la séquence ribonucléique du bactériophage G4 étant même traduite dans les trois cadres de lecture possibles. Depuis ce temps, plusieurs autres virus ayant la même particularité ont été découverts, notamment le virus de l'hépatite B dont environ 50 % de son génome comporte des ORFs chevauchants (Figure 1) (Rancurel *et al.*, 2009; Zaaijer *et al.*, 2007). Il a été proposé que ce phénomène plutôt commun chez les virus permettrait à ces petits agents infectieux de garder une diversité protéique dans un génome restreint (Keese et Gibbs, 1992). Quoique beaucoup plus rares, plusieurs exemples d'ORF chevauchants ont aussi été observés chez les procaryotes (Carter *et al.*, 1993; Palleja *et al.*, 2008; Rogozin *et al.*, 2002; Sabath *et al.*, 2008). Jusqu'à présent, chez l'humain, ce phénomène est très peu connu et comporte seulement quelques exemples. Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes *INK4a* (Quelle *et al.*, 1995), *GNAS1* (Klemke *et al.*, 2001), *XBPI* (Yoshida *et al.*, 2001) et *PRNP* (Vanderperre *et al.*, 2011) (Figure 2).

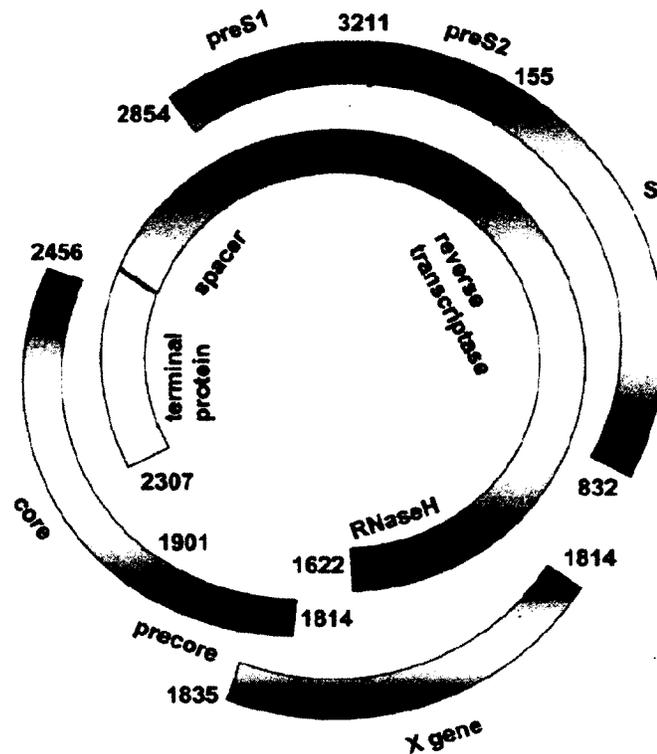


Figure 1 : Génome circulaire du virus de l'hépatite B dont 50 % est constitué de gènes chevauchants. Les gènes preS1, preS2 et S codent pour les protéines de l'enveloppe, et la séquence codant pour ces protéines chevauche la séquence codant pour la polymérase (reverse transcriptase) du virus (Torresi, 2002).

Le gène *INK4a* produit deux variants d'épissage possédant un même exon qui est traduit dans un cadre de lecture différent (figure 2A). Les protéines résultantes, p16^{INK4a} et p19^{ARF}, ont une séquence en acides aminés complètement différente. Pour ce qui est du gène *XBPI*, le transcrit peut subir une délétion ou non d'une petite séquence de 26 nucléotides présente dans la séquence codante de l'ARNm, ce qui aura pour effet de changer le cadre de lecture de la traduction (figure 2B). Lorsque cette délétion a lieu, la protéine résultante possède une partie C-terminale complètement différente. Les gènes *GNAS1* et *PRNP* possèdent une particularité fascinante, c'est-à-dire que la protéine de référence du gène (XL α S et PrP, respectivement) ainsi que la protéine alternative (Alex et AltPrP, respectivement) peuvent être produites simultanément à partir du même ARNm (figure 2CD). Par définition, la protéine de référence est codée dans le cadre de lecture

canonique +1, alors que la protéine alternative est celle codée dans les cadres de lecture non canoniques +2 ou +3.

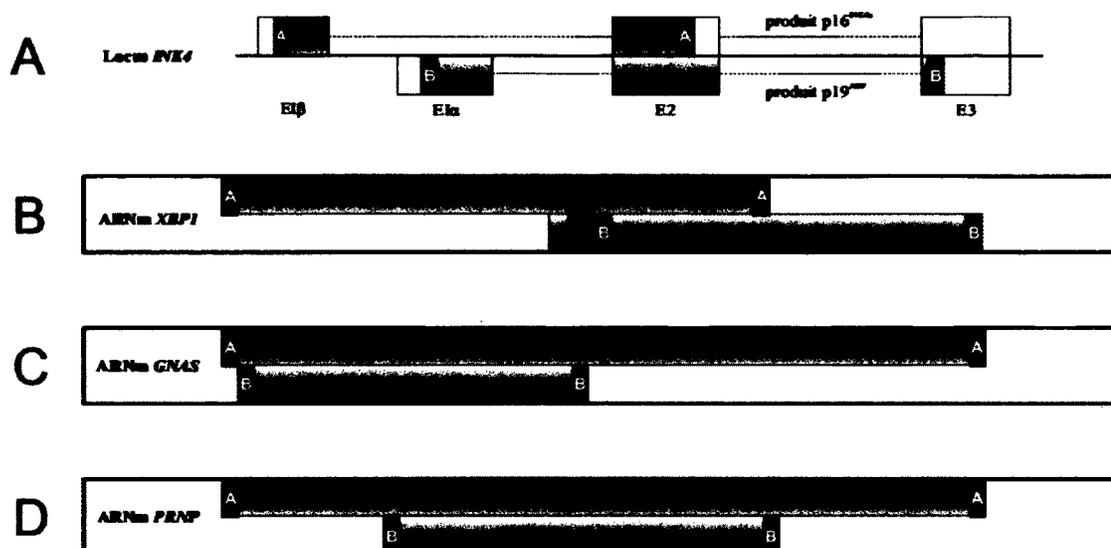


Figure 2 : Représentation des ORFs chevauchants connus chez l'humain. (A) Variants d'épissage du gène *INK4a* dont un transcrit produit la protéine p16^{INK4a} alors que l'autre produit la protéine p19^{ARF} tous deux possédant un même exon, traduit dans deux cadres de lecture. (B) Transcrit du gène *XBP1* produisant la protéine XBP1U dont la séquence de 26 nucléotides, représentés par le rectangle gris foncé, peut être enlevé par une endonucléase pour former la protéine XBP1S, différant de XBP1U par son C-terminal issu d'un cadre de lecture alternatif. (C) Transcrit du gène *GNAS1* codant pour deux protéines issues de cadres de lectures différents, XLoS (cadre de lecture +1) et ALEX (cadre de lecture +2), produite à partir de sites initiateurs différents. (D) Représentation de la séquence codante du gène *PRNP* dont l'ARNm code pour la protéine prion (PrP) et AltPrP, cette dernière issue d'un cadre de lecture alternatif (cadre de lecture +3). Adapté de (Chung *et al.*, 2007) et (Vanderperre *et al.*, 2011)

Le gène *GNAS1* possède plusieurs caractéristiques qui rendent son cas particulièrement intéressant. Premièrement, comme mentionné plus haut, l'ARNm du gène code pour deux protéines. La régulation positive ou négative de la quantité d'ARNm du gène dans la cellule a donc une influence directe sur le niveau de production des deux protéines, à moins bien sûr qu'une régulation traductionnelle ou posttraductionnelle soit impliquée, ce qui n'est, à ce jour, pas connu. Deuxièmement, la séquence ribonucléique chevauchante du gène *GNAS1* est la plus longue connue chez l'humain, s'étendant sur plus de 1800 paires de

bases. Troisièmement, la protéine ALEX interagit directement avec la protéine de référence XLoS (Klemke *et al.*, 2001). La protéine XLoS est une protéine de 92 kDa particulièrement présente dans les tissus neuroendocriniens qui, lorsque stimulée par certains récepteurs couplés aux protéines G, active l'adénylyl cyclase, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration d'AMPc dans la cellule. (Bastepe *et al.*, 2002; Kehlenbach *et al.*, 1994; Klemke *et al.*, 2000). La protéine basique de 38 kDa ALEX, quant à elle, se lie à la protéine de référence, XLoS, et semblerait diminuer son efficacité à activer l'adénylyl cyclase. Un polymorphisme présent dans la séquence désoxyribonucléique codant pour les protéines XLoS et ALEX induirait une hyperactivation de l'activité adénylyl cyclase, et par le fait même une augmentation drastique de la concentration d'AMPc intracellulaire, ceci engendré en partie par la diminution d'interaction entre la protéine XLoS et ALEX (Figure 3). Cette hyperactivation de la voie de l'adénylyl cyclase induit un temps de saignement prolongé lors de blessure et différents degrés de retard mental (Freson *et al.*, 2003). Quatrièmement, l'implication pathologique probable de la protéine ALEX, issue d'un cadre de lecture alternatif du gène *GNAS1*, apporte une preuve de l'importance biologique des protéines alternatives.

Le cas du gène *PRNP* semble diverger par rapport au gène *GNAS1*. La fonction de PrP^c, la protéine de référence du gène *PRNP*, n'est pas encore complètement élucidée : elle serait impliquée, entre autres, dans la survie et la mort cellulaire, le stress oxydatif, l'immunomodulation, la différenciation cellulaire, le trafic des ions métalliques, l'adhésion cellulaire et la signalisation transmembranaire (Aguzzi *et al.*, 2008; Linden *et al.*, 2008). La fonction de la protéine AltPrP, dont la séquence codant pour la protéine se retrouve enchâssée dans le gène *PRNP*, est jusqu'à maintenant inconnue. Par contre, dans ce cas, il ne semble pas y avoir de lien entre la protéine PrP^c et la protéine AltPrP. En effet, la protéine PrP^c se localise majoritairement du côté externe de la membrane plasmique, tandis que AltPrP se localise majoritairement insérée dans la membrane externe de la mitochondrie (Vanderperre *et al.*, 2011).

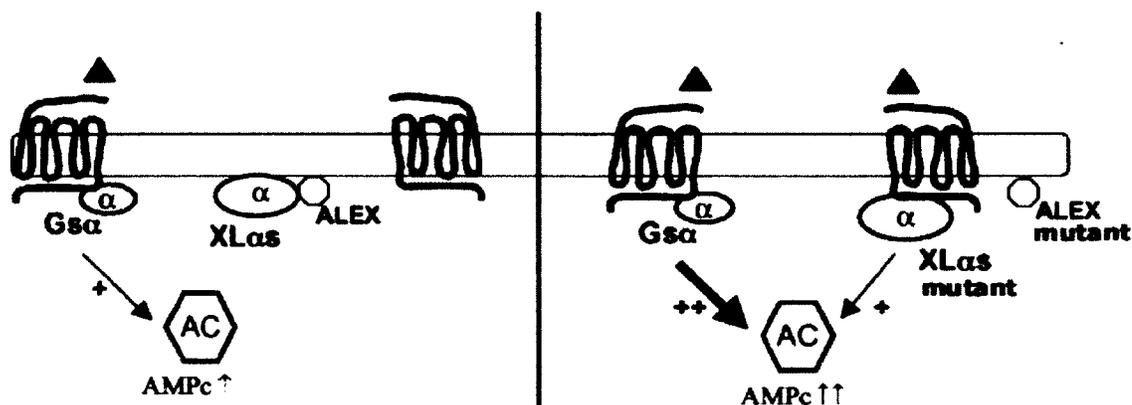


Figure 3 : Représentation de l'augmentation de l'AMPc intracellulaire causée, en partie, par la perte d'interaction entre XL α S et ALEX. XL α S est séquestré par la protéine ALEX en état normal, tel que représenté à gauche. Un polymorphisme du gène *GNAS1* induit une diminution de l'interaction entre XL α S et ALEX, ce qui a pour effet d'augmenter la proportion de XL α S activant l'adénylyl cyclase, ce qui fait augmenter la concentration d'AMPc intracellulaire, tel que représenté à droite. Le terme *mutant* représente la version mutée (polymorphique) des protéines. Adapté de (Freson *et al.*, 2003).

Depuis les dernières années, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés aux ORFs chevauchants et ont effectué des analyses bio-informatiques permettant de prédire la présence de ces protéines alternatives dans le génome humain. Certains se sont d'abord intéressés à des variants d'épissage d'un même gène qui peuvent mener à la lecture d'une même séquence d'ARN dans plus d'un cadre de lecture (voir exemple figure 2A) (Kovács *et al.*, 2010; Liang et Landweber, 2006). D'autres se sont ensuite intéressés à un seul ARNm pouvant coder pour plus d'une protéine en plus des variants transcriptionnels (Chung *et al.*, 2007; Ribrioux *et al.*, 2008; Vanderperre *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010b). Différents critères de stringence ont été utilisés selon chaque groupe pour effectuer les analyses. Parmi ces critères, on retrouve notamment la longueur des peptides alternatifs, l'environnement autour des sites d'initiations possibles et le niveau de conservation chez d'autres espèces. Toutes ces études à grande échelle ont mis en évidence l'étendue possible du « protéome alternatif » (dont certains l'appellent l'ARFome (Chung *et al.*, 2007)). Puisque dans certains cas la protéine alternative semble être impliquée dans une pathologie, comme dans le cas du gène *GNAS*, la pertinence de l'étude de ce protéome alternatif devient plus apparente.

Suite à la création d'une base de données permettant de prédire les protéines issues d'un cadre de lecture alternatif présentes dans le génome humain (Vanderperre *et al.*, 2012), nous avons effectué un premier criblage pour déterminer les candidats potentiellement intéressants. Ceux-ci, obligatoirement compris dans l'ORF principal d'un gène, ont été choisis en fonction d'une longueur minimale de 24 acides aminés, d'un contexte d'initiation optimal (A/GNNATGG). Parmi ces candidats, un cas a particulièrement retenu notre attention : le gène *ATXN1*. Celui-ci est impliqué dans une maladie polyglutamine neurodégénérative importante : l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 (SCA1). De ce fait, il apparaît plausible que la protéine alternative, issue du même ARNm servant à produire une protéine impliquée dans la pathologie, puisse aussi avoir une implication dans la SCA1.

1.2. Les ataxies et maladies polyglutamines

Le terme ataxie est associé à un syndrome clinique caractérisé par une incoordination des mouvements musculaires volontaires causée par une dysfonction au niveau du cervelet et de ses connexions neuronales (Diener et Dichgans, 1992; Morton et Bastian, 2004). Le terme ataxie est aussi utilisé pour désigner certaines pathologies spécifiques impliquant le système nerveux central dont le principal signe clinique est une incoordination progressive des mouvements musculaires moteurs. Les maladies ataxiques sont divisées en trois groupes : les ataxies héréditaires (autosomiques récessives, autosomiques dominantes, liées au chromosome X ou causées par une dysfonction mitochondriale), sporadiques (d'origine inconnue) et acquises (causées, entre autres, par l'alcool, des déficiences vitaminiques, des infections du système nerveux central et des accidents cérébraux vasculaires) (Klockgether et Paulson, 2011). Parmi les ataxies héréditaires autosomiques dominantes se retrouvent les SCAs, dans lesquelles on observe une progression continue de la pathologie avec le temps, et les ataxies épisodiques (EA) caractérisées par des symptômes ataxiques épisodiques récurrents (Jen, 2008).

À ce jour, 31 types de SCA sont connus. La prévalence en Europe est estimée à 3 :100 000, et la SCA1, SCA2, SCA3 et SCA6 sont les plus fréquentes au niveau mondial (Durr, 2010; Schols *et al.*, 2004). Les ataxies spinocérébelleuses peuvent être causées par

différentes mutations au niveau du gène responsable de la pathologie, telles que des mutations ponctuelles (SCA13, SCA27), des mutations qui changent le cadre de lecture (SCA11), des délétions (SCA15) et des duplications (SCA20). Pour 12 autres SCAs, le gène responsable de la pathologie ou la mutation impliquée n'ont pas encore été identifiés (SCA4, 10, 18, 19, 21, 22, 25, 26, 29, 30, 32, 34). Finalement, les pathologies associées au dernier groupe de SCA sont causées par une expansion de nucléotides. Ces répétitions sont soit triplet, quintuplet ou hexaplet dans la séquence non-codante du gène impliqué dans la pathologie (SCA8, 10, 12, 31, 36) ou une répétition des trinuécléotides CAG dans la séquence codante du gène (SCA1, 2, 3, 6, 7 et 17) (Seidel *et al.*, 2012). Ces dernières font partie de la famille des maladies polyglutamines.

Les maladies polyglutamines sont un groupe de désordres neurodégénératifs héréditaires causés par l'expansion d'une région répétée dans l'ADN composée du trinuécléotide CAG, traduit en l'acide aminé glutamine dans la protéine d'intérêt. L'amyotrophie bulbo-spinale liée à l'X (SBMA) fut la première maladie de ce type à être découverte en 1991 (La Spada *et al.*, 1991). À ce jour, neuf maladies polyglutamines ont été rapportées : la maladie de Huntington (HD), l'Atrophie de Dentatorubral-Pallidoluisian (DRPLA), la SMBA, et les ataxies spinocérébelleuses de type 1, 2, 3, 6, 7 et 17 (Tableau 1) (Shao et Diamond, 2007). Tous ces désordres, à l'exception de la SMBA, sont héréditaires dominants. Un seul allèle mutant suffit donc pour induire un phénotype pathologique chez le patient atteint. De plus, les régions répétées de l'ADN sont instables et tendent à s'étendre de plus en plus au fil des générations. Ces maladies sont progressives et les premiers symptômes apparaissent généralement en milieu de vie. Il s'ensuit une dégénérescence neuronale rapide qui mène à la mort entre 10 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes. Plus les répétitions CAG dans l'ADN sont longues, plus les symptômes sont sévères et apparaissent rapidement au cours de la vie d'un patient.

Les maladies polyglutamines sont associées à une dégénérescence neuronale caractéristique pour chaque maladie et les symptômes sont plutôt variés. Dans le cas de la HD, on observe des mouvements involontaires rapides et saccadés (aussi appelé chorée), des déficits au niveau de la mémoire, des troubles affectifs, des changements de personnalité et d'autres types de dysfonctions motrices. Pour la SMBA, on observe surtout

une faiblesse corporelle, un amaigrissement et la fasciculation (légères contractions musculaires involontaires) impliquant le visage et les membres distaux. La DRPLA est quant à elle caractérisée par la choréo-athétose (contractions musculaires désordonnées du corps et mouvement désordonnés du visage et des membres distaux) ainsi qu'une épilepsie myoclonique (contraction soudaine et brève des muscles) et la démence. Chez les différentes ataxies spinocérébelleuses, plusieurs symptômes sont propres à chaque type selon la région du cerveau affectée, mais l'ataxie (manque de coordination fine des mouvements volontaires) et la dysarthrie (trouble de l'élocution) sont communes à toutes les SCA (Zoghbi et Orr, 2000).

Pathologie	Protéine	Répétition	Longueur normal des répétitions	Longueur pathologique des répétitions	Localisation des inclusions	Parties du cerveaux les plus affectées lors de la pathologie
HD	Huntingtin	CAG	6-34	36-121	Noyau et cytoplasme	Striatum, cortex cérébral
SMBA	Récepteur androgène	CAG	9-36	38-62	Noyau et cytoplasme	Corne antérieure et les neurones bulbaires, ganglions de la racine dorsale
DRPLA	Atrophin 1	CAG	7-34	49-88	Noyau	Cervelet, cortex cérébral, ganglions basaux, Luys body
SCA1	Ataxin 1	CAG	6-39	40-82	Noyau	Cellules de Purkinje du cervelet, noyau dentelé, tronc cérébral
SCA2	Ataxin 2	CAG	15-24	32-200	Noyau	Cellules de Purkinje du cervelet, tronc cérébral, lobe frontotemporal
SCA3	Ataxin 3	CAG	13-36	61-84	Noyau	Neurones dentelés du cervelet, ganglions basaux, tronc cérébral, moelle épinière
SCA7	Ataxin 7	CAG	4-35	37-306	Noyau	Cervelet, tronc cérébral, macula, cortex visuel
SCA17	TATA box binding protein	CAG	25-42	47-63	Noyau	Cellules de Purkinje du cervelet, olive inférieure
SCA6	Sous-unité alpha1a du canal calcique voltage-dépendant	CAG	4-20	20-29	Cytoplasme	Cellules de Purkinje du cervelet, noyau dentelé, olive inférieure

Tableau 1 : Maladies polyglutamines connues à ce jour. À gauche, les neuf maladies polyglutamines sont présentées. La protéine impliquée dans la pathologie est indiquée suivie du nombre de répétitions normal ou pathologique présent dans le gène. Les localisations des inclusions caractéristiques sont mentionnées suivie de la région du cerveau affectée dans les différentes maladies. Adapté de (Shao et Diamond, 2007).

Les répétitions CAG de l'ADN seront transcrites et par la suite traduites en polyglutamines dans la protéine. Toutes les protéines avec expansions de polyglutamines connues pour être impliquées dans les maladies énumérées précédemment agrègent et forment des inclusions nucléaires, à l'exception de la sous-unité $\alpha 1a$ du canal calcique voltage dépendant impliqué dans la SCA6 où la protéine forme des inclusions au cytoplasme (Cummins et Zoghbi, 2000). Cette agrégation est le résultat d'un changement conformationnel de la protéine vers un état toxique pro-agrégatif. Le niveau d'expression de la protéine normale versus la protéine pathologique est le même dans les tissus, suggérant *à priori* que la surexpression n'est pas la cause du développement du phénomène pathologique. Il n'y a pas de polymorphisme de délétion ou de mutations ponctuelles connues pour HD, SMBA, DRPLA et les SCA1, 3 et 7, ce qui suggère un gain de fonction des protéines mutées (Bauer et Nukina, 2009). Ces protéines avec une région de polyglutamine étendue peuvent affecter une grande quantité de processus cellulaires, incluant entre autres l'apoptose, le transport axonal, l'activation/répression transcriptionnelle, l'altération du métabolisme des ARN, le métabolisme mitochondrial et le système ubiquitine-protéasome (Figure 4). Aussi, puisque seulement certains types neuronaux sont affectés dans chacune des différentes maladies polyglutamines malgré leur expression étendue dans le système nerveux central et ailleurs, chacune des protéines mutantes semble avoir des fonctions toxiques spécifiques pour certains tissus (voir tableau 1) (Zoghbi et Orr, 2000).

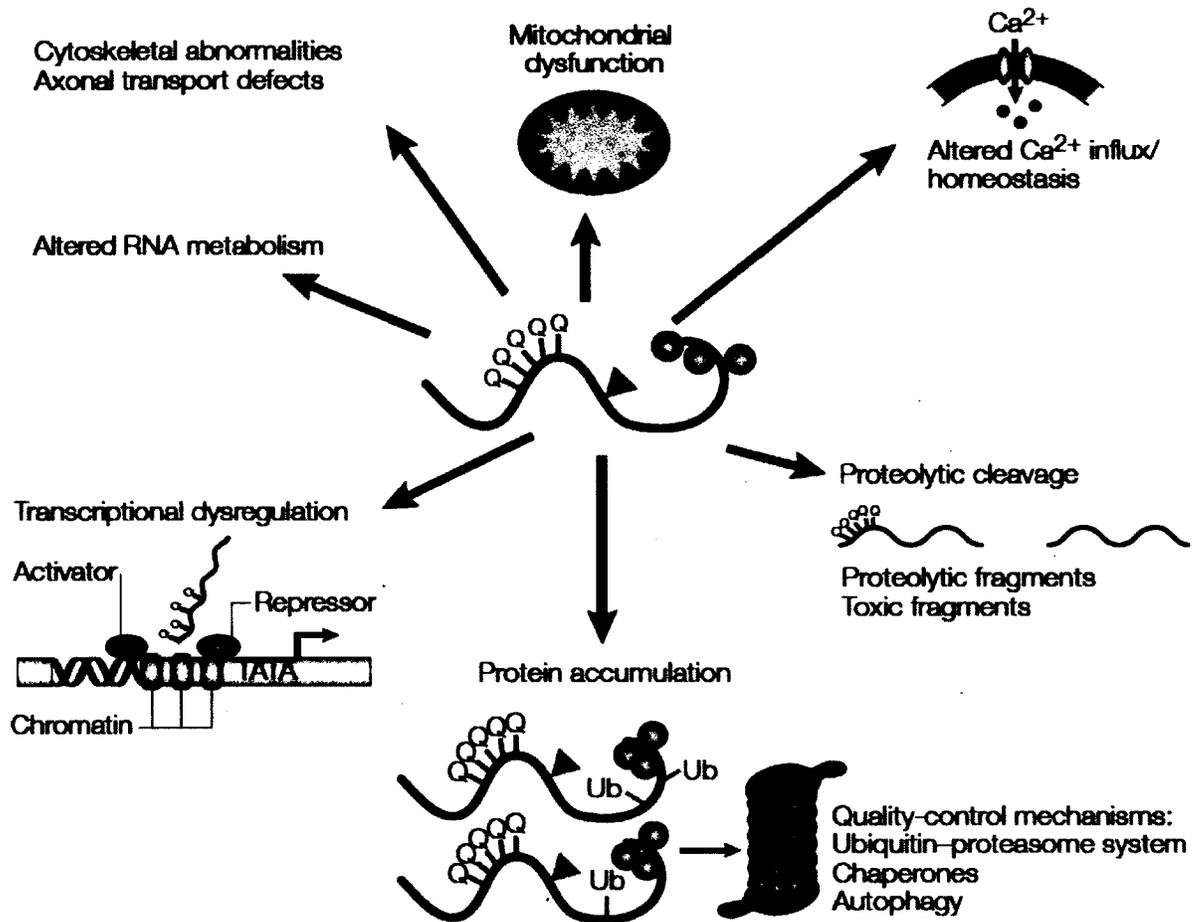


Figure 4 : Représentation des différents mécanismes connus induisant les maladies polyglutamines. La protéine polyglutamine, au centre, affecte plusieurs processus cellulaires importants, et toutes ces altérations mènent à une dégénérescence neuronale. Adapté de (Gatchel et Zoghbi, 2005).

Le clivage protéolytique de certaines protéines polyglutamines est un phénomène important dans le processus pathologique. La protéine huntingtine (Htt) est connue pour pouvoir être clivée par les caspases 2, 3 et 6 ce qui a pour effet de former des fragments N-terminaux qui contiennent les régions répétées de glutamines, et ces fragments accélèrent la conversion vers des structures toxiques en plus de transloquer plus facilement vers le noyau. La protéine ATXN3, quant à elle, peut être clivée par la caspase 1 pour former un fragment de 28 kDa qui est associé à la mort neuronale. Le récepteur androgène mutant peut aussi être clivé, par la caspase 3, ce qui a pour incidence de diminuer la formation d'inclusion précédant directement les symptômes de SMBA (Takahashi *et al.*, 2010). Comme mentionné plus haut, chaque maladie polyglutamine est caractérisée par la

neurodégénérescence de certains types de cellules neuronales. Les acides aminés à l'extérieur de la région polyglutamine pourraient être en partie responsables de cette spécificité (Gatchel et Zoghbi, 2005). Chacune des protéines énumérées dans le tableau 1 possède une fonction normale et des interacteurs normaux. Dans certains cas, ces interacteurs peuvent voir leur affinité pour la protéine mutée diminuée ou augmentée, ce dernier cas favorisant la coagrégation des interacteurs de la protéine mutante. Le niveau d'expression de diverses protéines est augmenté ou diminué dans certains types cellulaires. Les différents types de cellules neuronales ne font pas exception à la règle et donc chaque type possède un niveau d'expression particulier pour chacun des interacteurs des protéines polyglutamines. Ces différents niveaux d'expression pourraient expliquer en partie l'affectation de certains types cellulaires par rapport à d'autres dans les différents désordres polyglutamines.

Il n'est pas encore clair si la toxicité des protéines polyglutamines est créée par des agrégats ou par des formes intermédiaires formées au cours du processus d'agrégation. Dans certains cas, les agrégats semblent être la résultante d'un événement toxique précédent. Dans le cas de la protéine Htt, certains proposent même un effet neuroprotecteur des agrégats (Arrasate *et al.*, 2004; Saudou *et al.*, 1998). Saudou *et al.* (1998) ont montré que la formation d'inclusions nucléaires contenant la protéine mutante Htt n'est pas un pré-requis à la mort cellulaire et que l'entrée de l'Htt mutante au noyau était suffisante pour induire l'apoptose. Aussi, Arrasate *et al.* (2004) ont montré que la présence d'inclusions favorise la survie cellulaire. De plus, les polypeptides contenant les domaines polyglutamiques des protéines Htt et AR causent une inhibition du transport et de l'élongation axonal dans les cellules neuronales, ce qui a pour effet de déstabiliser la cellule, contribuant en partie à la dégénérescence neuronale (Morfini *et al.*, 2005; Szebenyi *et al.*, 2003). Par contre, les inclusions d'agrégats protéiques sont majoritairement présentes dans les régions affectées du cerveau chez les patients atteints des différents désordres liés aux expansions glutamines, et la particularité progressive de ces pathologies semble bien correspondre au processus lent d'agrégation (Bauer et Nukina, 2009).

La localisation nucléaire des protéines mutantes est cruciale pour le développement de la plupart des désordres polyglutaminiques (Gatchel et Zoghbi, 2005). Dans ces

pathologies, les protéines polyglutamines interagissent, directement ou via les agrégats, avec des facteurs de transcription et des cofacteurs transcriptionnels, perturbant ainsi l'expression de certains gènes, ce qui pourrait initier la neurodégénérescence. Par exemple, le co-facteur transcriptionnel « CREB-Binding protein » (CBP) a été retrouvé dans les inclusions nucléaires formées par Htt, AR, ataxin 1 (ATXN1) et atrophin 1 (ATN1) dans des cerveaux de patients ou des cerveaux d'animaux modèles (Shao et Diamond, 2007). Une panoplie d'interactions aberrantes ont été décrites entre les protéines ayant une expansion de polyglutamine avec d'autres facteurs et cofacteurs de transcription, notamment avec p300/CBP-associated factor, p53, Sp1, TAFII130 et PQBP-1 (Okazawa, 2003). La fonction normale de plusieurs protéines polyglutamines semble être en partie liée à la transcription, ce qui explique l'implication des facteurs de transcription dans le développement de la pathologie. Le gain de fonction des protéines mutantes pourrait débalancer la régulation de la transcription et mener à certains phénotypes pathologiques.

Les patients atteints de la HD montrent aussi des dysfonctions au niveau mitochondrial, ce qui engendre des problèmes de métabolisme énergétique (Lin et Yen, 2006). De plus, les mitochondries des patients et des animaux modèles pour la HD montrent un plus faible potentiel membranaire mitochondrial et nécessitent une plus petite concentration de calcium pour être dépolarisées (Panov *et al.*, 2002). Cette caractéristique qui apparaît tôt dans le développement de la pathologie pourrait être un mécanisme important dans la dégénérescence causé par la protéine Htt mutante. De plus, Tang *et al* (2005) ont montré que le niveau de calcium relargué du réticulum endoplasmique de certains types neuronaux est augmenté, ce qui peut avoir comme conséquence l'augmentation de l'apoptose due à la dérégulation des mitochondries (Tang *et al.*, 2005). Ces découvertes suggèrent que la dysfonction mitochondriale est importante dans les maladies polyglutamines.

Comme mentionné précédemment, les protéines mutantes qui agrègent sont séquestrées dans des inclusions. Celles-ci contiennent des chaperones moléculaires et des éléments du système ubiquitine-protéasome (UPS) responsables de la dégradation protéique. Il a été proposé que l'accumulation de protéines pathologiques agrégées séquestre et induit une défaillance du système UPS (Ciechanover et Brundin, 2003). L'altération du système UPS peut grandement influencer le phénotype pathologique puisqu'il régule normalement une

grande variété de processus cellulaires de base. L'accumulation d'inclusions contenant l'ubiquitine, le protéasome et d'autres protéines pathologiques a été rapportée dans une grande variété de désordres neurodégénératifs incluant l'Alzheimer (AD), le Parkinson (PD), la sclérose amyotrophique latérale (ALS) et les différentes maladies polyglutamines (Ciechanover et Brundin, 2003). Dans ces cas, les protéines pathologiques mal repliées ne peuvent plus être éliminées et s'accumulent progressivement, ce qui explique en partie la progression lente de ces maladies neurodégénératives. Jana *et al* (2001) ont montré dans une lignée de neuroblastomes de souris qu'un fragment N-terminal de la protéine mutante Htt clivée peut inhiber le protéasome et altérer la dégradation de la protéine p53, menant à une diminution du potentiel membranaire mitochondrial et une augmentation de l'apoptose (Jana *et al.*, 2001). L'altération du système UPS semble donc être une composante très importante des maladies polyglutamines.

Les désordres polyglutamines sont des pathologies incurables et extrêmement complexes. Chacune des neuf maladies possède ses mécanismes et caractéristiques propres, ce qui fait que chacune d'entre elles mérite une attention particulière. Le premier gène responsable d'une SCA découvert fut *ATXN1*, relié à la maladie SCA1, en 1994 (Banfi *et al.*, 1994; Orr *et al.*, 1993), et depuis ce temps, le mécanisme moléculaire impliqué n'a pas été résolu. La fonction normale de la protéine demeure à ce jour nébuleuse. L'approfondissement des connaissances sur *ATXN1* pourra mener à une meilleure compréhension de SCA1 et éventuellement au développement d'une thérapie efficace pour l'enrayer.

1.3. Les maladies de type SCA1 et l'ATXN1

La SCA1 est caractérisée par une atrophie du cervelet causée en partie par une dégénérescence des cellules de Purkinje et une affectation majeure du noyau dentelé et du tronc cérébral (Zoghbi et Orr, 2000). Les signes cliniques sont l'ataxie, la dysarthrie et des difficultés à déglutir et à respirer. Ces symptômes s'accroissent avec le temps et mènent inévitablement à la mort, en général 10 à 15 ans après l'apparition des premiers symptômes (Kang et Hong, 2009). La protéine *ATXN1* codée par le gène *ATXN1* comporte plusieurs domaines importants, notamment un domaine polyglutamine, un domaine AXH et une

séquence de localisation nucléaire dans laquelle on retrouve aussi un site de phosphorylation (Figure 5).

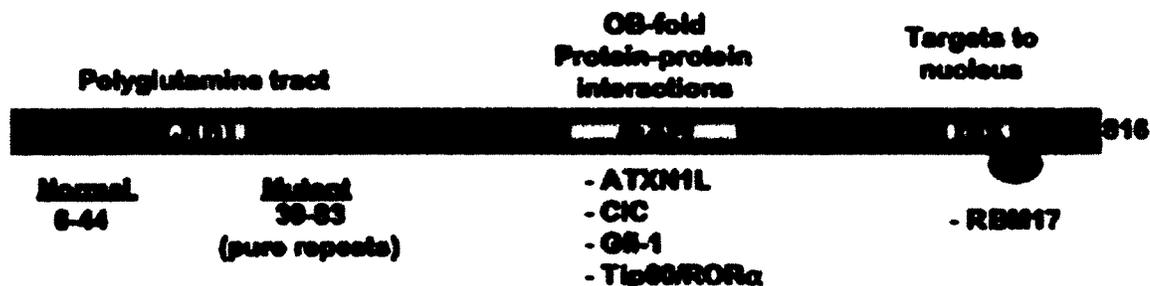


Figure 5 : Représentation schématique de la protéine ATXN1. Le domaine polyglutamine (Q(n)) situé en N-terminal comporte normalement entre 6 et 44 répétitions CAG interrompues par entre 1 et 4 répétition CAT, tandis que les individus atteints de SCA1 possèdent généralement entre 39 et 83 répétitions ininterrompues. Le domaine AXH est responsable de plusieurs interactions avec des protéines ainsi qu'avec les ARNm. Finalement, une séquence de localisation nucléaire (NLS) et un site de phosphorylation important pour la pathologie se retrouvent en C-terminal (Zoghbi et Orr, 2009).

Tout d'abord, le domaine polyglutamine en N-terminal de la protéine contient une région de polyglutamines dont l'expansion est fortement liée au phénotype pathologique de la SCA1. Le nombre de répétitions CAG dans la séquence codante du gène chez les individus sains se situe entre 6 et 44, et les cas de plus de 20 répétitions sont interrompues par 1 à 4 répétitions CAT, codant pour une histidine, possiblement responsable de maintenir la stabilité du nombre de répétition CAG (Chung *et al.*, 1993; Zoghbi et Orr, 2000). L'allèle pathologique quant à elle comporte entre 39 et 83 répétitions CAG qui sont alors ininterrompues (Chong *et al.*, 1995; Goldfarb *et al.*, 1996; Jodice *et al.*, 1994; Ranum *et al.*, 1994).

Ensuite, un motif important, le domaine AXH, a été identifié en 1997 dans la protéine ATXN1 (Mushegian *et al.*, 1997). Une forte similarité a été observée entre la séquence du domaine AXH de l'ATXN1 et le domaine AXH de la protéine HBP1, un facteur de transcription impliqué, entre autres, dans la progression du cycle cellulaire et la suppression tumorale (Yee *et al.*, 2004). Ce motif se replie de façon indépendante dans la protéine et est responsable de sa dimérisation ainsi que de son interaction avec l'ARN et avec plusieurs protéines (de Chiara *et al.*, 2003). Le domaine AXH est aussi impliqué dans la répression

transcriptionnelle et favorise l'agrégation d'ATXN1, deux caractéristiques importantes de la SCA1 (de Chiara *et al.*, 2005). En plus du domaine polyglutamine de la protéine, le domaine AXH contribue de façon significative au développement de la SCA1.

Finalement, la séquence de localisation nucléaire (NLS) de l'ATXN1, située en C-terminal (voir figure 5), a été découverte par analyse bio-informatique et validée expérimentalement *in cellulo* (Klement *et al.*, 1998). Klement *et al.* (1998) ont montré que cette NLS joue un rôle dans la pathologie puisque des souris transgéniques exprimant l'ATXN1 humaine dont une lysine importante pour la fonction du NLS a été mutée ne développent pas le phénotype pathologique, comparativement aux souris transgéniques dont la séquence de l'ATXN1 est de type sauvage. Emamian *et al.* (2003) ont montré que la phosphorylation de la sérine 776, contenue dans la NLS, diminue la solubilité et augmente l'agrégation de l'ATXN1 (Emamian *et al.*, 2003). Aussi, des souris transgéniques exprimant l'ATXN1 humaine avec la sérine 776 mutée pour une alanine (S776A) montrent un phénotype pathologique radicalement diminué, comparativement aux souris exprimant la protéine de type sauvage. Ces résultats indiquent que la sérine 776 a une influence très importante dans le développement de la pathologie SCA1.

La fonction normale de l'ATXN1 demeure à ce jour peu connue. Néanmoins, Matilla *et al.* (1998) ont généré des souris déficientes pour le gène *ATXN1* et ont montré que celles-ci sont viables, fertiles et ne présentent pas de phénotypes ataxiques, ce qui suggère que l'ATXN1 n'est pas indispensable pour le développement normal des tissus périphériques et que la SCA1 est causée majoritairement par un gain de fonction de l'ATXN1 mutée (Matilla *et al.*, 1998). Par contre, les souris déficientes présentent des déficits d'apprentissage spatial et moteur, ce qui suggère un rôle de la protéine dans l'apprentissage et la mémoire. Lee *et al.* (2011) ont ensuite montré avec des souris déficientes pour le gène *ATXN1* que l'ATXN1 joue un rôle important dans le développement des poumons via le remodelage de la matrice extracellulaire (Lee *et al.*, 2011). Aussi, il est connu que l'ATXN1 peut réprimer la voie de signalisation Notch (Tong *et al.*, 2011). Cette protéine est extrêmement importante dans une grande variété de processus liés au développement, incluant le développement du système nerveux (Bray, 2006; Kopan et Ilagan, 2009; Lai, 2004). L'ATXN1 régule également de façon négative l'activité de la protéine β -sécrétase

(Zhang *et al.*, 2010), une protéase responsable d'un clivage de la protéine précurseure amyloïde (APP) impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Kandalepas et Vassar, 2012; Thinakaran et Koo, 2008).

La plupart des évidences sur le rôle possible de la protéine résultent des connaissances sur les différents partenaires d'interaction de l'ATXN1. Plusieurs partenaires d'interaction connus de l'ATXN1 sont des régulateurs transcriptionnels tels que le corépresseur SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors) (Mizutani *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2004), le facteur de transcription Gfi1 (growth factor independence-1) (Tsuda *et al.*, 2005), le répresseur CIC (Capicua) (Lam *et al.*, 2006), le complexe ROR α -TIP60 (Serra *et al.*, 2006), le modulateur transcriptionnel LANP (leucine-rich acidic nuclear protein) (Cvetanovic *et al.*, 2007; Matilla *et al.*, 1997) et le facteur MEF2 (myocyte enhancer factor-2) (Bolger *et al.*, 2007). De plus, la protéine ATXN1 peut être SUMOylée sur au moins cinq résidus (Riley *et al.*, 2005), ce qui suggère une fonction dans la régulation transcriptionnelle puisque la SUMOylation est une modification posttraductionnelle commune pour les protéines nucléaires impliquées dans la transcription (Muller *et al.*, 2004). L'ATXN1 semble aussi avoir un rôle dans la maturation des ARNm : elle peut lier l'ARN (Yue *et al.*, 2001) en plus d'interagir avec au moins 9 protéines impliquées dans la liaison et le métabolisme des ARNm (Matilla-Duenas *et al.*, 2008). Parmi ces interacteurs, on retrouve les protéines RBM17 (RNA-binding motif protein 17) (Lim *et al.*, 2008), impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif, et TAP/NXF1 (Irwin *et al.*, 2005), un facteur d'export nucléaire des ARNm. Irwin *et al.* (2005) ont aussi démontré que l'ATXN1 est capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme et que la présence d'ARNm influence sa distribution au noyau est, ce qui renforce l'hypothèse d'une fonction de maturation des ARNm par l'ATXN1.

Parmi les nombreuses protéines connues pour interagir avec l'ATXN1 se trouve la protéine Brother of ATXN1 (BOAT), aussi connue sous le nom d'ATXN1-like (ATXN1L). BOAT est un paralogue de l'ATXN1 et contient aussi un domaine AXH capable de dimériser avec lui-même et avec l'ATXN1 (Mizutani *et al.*, 2005). La protéine BOAT semble être impliquée dans les mêmes processus de régulation transcriptionnels que l'ATXN1 et les deux protéines possèdent beaucoup d'interacteurs communs. Mise à part

l'absence de domaine polyglutamine dans BOAT, les deux protéines partagent beaucoup de similarité de séquence. De plus, le patron d'expression d'ATXN1 et de BOAT dans des tissus de cerveaux humains est semblable, ce qui renforce l'idée selon laquelle les deux protéines auraient une fonction redondante. Comme mentionné précédemment, les souris déficientes pour le gène *ATXN1* sont viables, mais montrent certains déficits au niveau de l'apprentissage et de la mémoire. Par contre, les souris déficientes pour le gène *ATXN1L* (responsable de l'expression de la protéine BOAT) montrent des retards de croissance, une hydrocéphalie et une certaine proportion de mortalité périnatale (Lee *et al.*, 2011). La double délétion pour les gènes *ATXN1* et *ATXN1L* augmente considérablement la proportion de mortalité périnatale, passant de moins de 20% pour les simples délétions à environ 70 % pour la double délétion. Ces deux résultats suggèrent premièrement que le gène *ATXN1L* est plus crucial pour la viabilité que le gène *ATXN1*, et deuxièmement que les deux gènes auraient une fonction redondante. L'augmentation de l'expression du gène *ATXN1L* dans des souris modèles pour la SCA1 a même pour effet de diminuer la neuropathologie (Bowman *et al.*, 2007), ce qui pointe encore une fois vers une redondance de la fonction des deux protéines.

La formation d'inclusions nucléaires dans des modèles cellulaires et dans des cellules neuronales de souris modèles pour la SCA1 est une caractéristique pathologique importante. Ces inclusions nucléaires ont été observées pour la première fois en 1997 chez différents modèles cellulaires, chez des neurones de souris transgéniques pour le gène *ATXN1* contenant 30 ou 82 répétitions CAG et chez des neurones de patients atteints de SCA1 (Skinner *et al.*, 1997). Dans les modèles cellulaires, Skinner *et al.* (1997) ont observé des inclusions nucléaires dont la quantité et la taille varient selon l'expression de l'allèle normal (30 répétitions CAG, 30Q) ou pathologique (82 répétitions CAG, 82Q). Dans leur modèle cellulaire, l'allèle normal cause une grande proportion de petites inclusions (<1 µm, 75%), une faible proportion de marquage diffus (22%) et une très faible proportion d'inclusions larges (>1 µm, 3%), tandis que l'allèle pathologique engendrait majoritairement de grosses inclusions (60 %), une minorité de petites inclusions (33 %) et un marquage diffus léger (7 %) (Figure 6). Les analyses d'immunobuvardage subséquentes n'ont montré aucune différence au niveau de l'expression de la protéine pathologique

versus la protéine normale, ce qui suggère un lien direct entre la différence phénotypique et l'expansion du domaine polyglutamique.

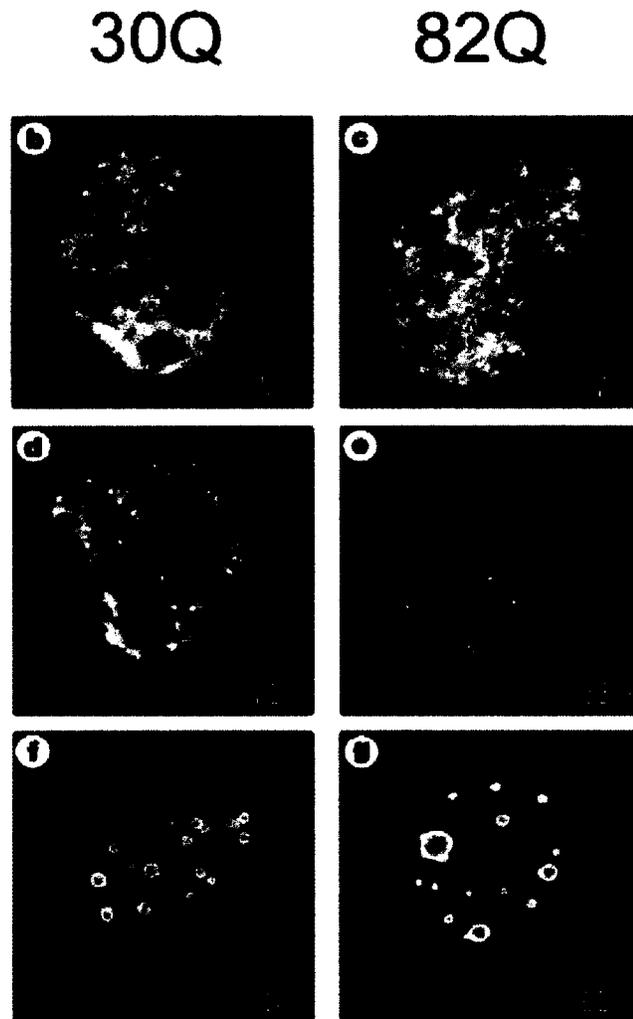


Figure 6 : Pourcentage des différents marquages cellulaires de l'ATXN1. Immunofluorescence effectuée sur des cellules COS-1 transfectées avec la séquence codante de l'ATXN1 normale (30Q) ou pathologique (82Q). Les panneaux représentent un marquage diffus, de petites inclusions ou de grosses inclusions, de haut en bas, respectivement. Adapté de (Skinner *et al.*, 1997).

Les inclusions caractéristiques de la SCA1 contiennent notamment de l'ubiquitine ainsi que des composantes du système de dégradation par le protéasome et plusieurs chaperonnes moléculaires (Cummings *et al.*, 1998). Ce résultat suggère que la cellule cible l'ATXN1 agrégée vers des inclusions nucléaires dans le but d'éliminer la protéine mal repliée afin de

soit lui redonner sa conformation native avec l'aide de chaperonnes, soit la dégrader par le système protéasomal. De plus, la surexpression de chaperonnes moléculaires diminue la présence d'inclusions alors que l'inhibition du protéasome induit l'accumulation de ces inclusions dans des modèles cellulaires (Cummings *et al.*, 1998; Cummings *et al.*, 1999), ce qui vient supporter l'hypothèse de la fonction des agrégats d'ATXN1.

Les inclusions ont longtemps été perçues comme pathologiques, ce qui a par la suite été réfuté par plusieurs évidences. Par exemple, des souris transgéniques qui expriment le variant cytoplasmique K772T de l'ATXN1 présentent des inclusions cytoplasmiques sans phénotype pathologique significatif, alors que des souris transgéniques surexprimant un mutant de l'ATXN1 tronqué de son domaine de dimérisation ne produisent pas d'inclusions visibles dans les cellules neuronales mais souffrent du phénotype pathologique caractéristique de la SCA1. Ceci montre que la localisation nucléaire de l'ATXN1 est nécessaire pour la pathologie et que les inclusions ne sont pas directement responsables de la toxicité. Ensuite, des souris transgéniques surexprimant l'ATXN1 pathologique croisées avec des souris déficientes pour la protéine UBE3A, une ubiquitine-ligase importante dans la voie ubiquitine-protéasome, montrent une très faible présence d'inclusions nucléaires au niveau des neurones accompagnée d'un phénotype pathologique beaucoup plus sévère que les souris transgéniques pour l'ATXN1 pathologique exprimant un niveau normal de UBE3A (Cummings *et al.*, 1999). Pour finir, la distribution d'inclusions nucléaires de souris dont la séquence répétée CAG (154 répétitions) a été insérée dans la séquence *ATXN1* endogène a été étudiée. Des inclusions nucléaires sont produits dans plusieurs types neuronaux différents et des signes caractéristiques de la SCA1 sont observables (Watase *et al.*, 2002). Par contre, les cellules de Purkinje de ces souris sont les dernières à former des inclusions nucléaires visibles, alors qu'il s'agit du type cellulaire le plus affecté dans les modèles de SCA1. Tous ces résultats montrent que les inclusions nucléaires ne sont pas indispensables pour la pathologie. Ces résultats suggèrent aussi que la protéine ATXN1 mutante est beaucoup plus toxique lorsqu'elle n'est pas séquestrée dans des inclusions.

La SCA1 est une maladie extrêmement complexe impliquant une multitude de protéines. La pathologie semble être majoritairement causée par un gain de fonction de la protéine ATXN1 mutante, mais de récentes évidences semblent montrer qu'une partie du

phénotype serait expliquée par une perte de fonction de la protéine. Dans les cellules, l'ATXN1 se retrouve dans au moins deux types différents de complexes protéiques : le premier contient la protéine CIC (Lam *et al.*, 2006), impliquée dans la répression transcriptionnelle, et le deuxième contient la protéine RBM17 impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif (Lim *et al.*, 2008). L'expansion polyglutamine module la proportion d'ATXN1 qui forme l'un ou l'autre de ces complexes. L'ATXN1 mutante tend à défavoriser la formation de complexes contenant la protéine CIC, par opposition à la protéine ATXN1 non mutante (Lim *et al.*, 2008). La liaison de l'ATXN1 à RBM17 est favorisée par une augmentation de la région polyglutamine et par la phosphorylation de la sérine 776, deux caractéristiques impliquées dans la SCA1, tandis que la fonction de répression de CIC est partiellement réprimée par l'ATXN1 mutante comparativement à l'ATXN1 normale (Lam *et al.*, 2006) (figure 7). L'augmentation de la quantité de complexes RBM17 crée un gain de fonction tandis que la diminution de la quantité de complexes CIC crée une perte de fonction. De plus, la forte expression de la protéine RBM17 dans les cellules de Purkinje coïncide avec l'affectation principalement de ces cellules dans la SCA1.

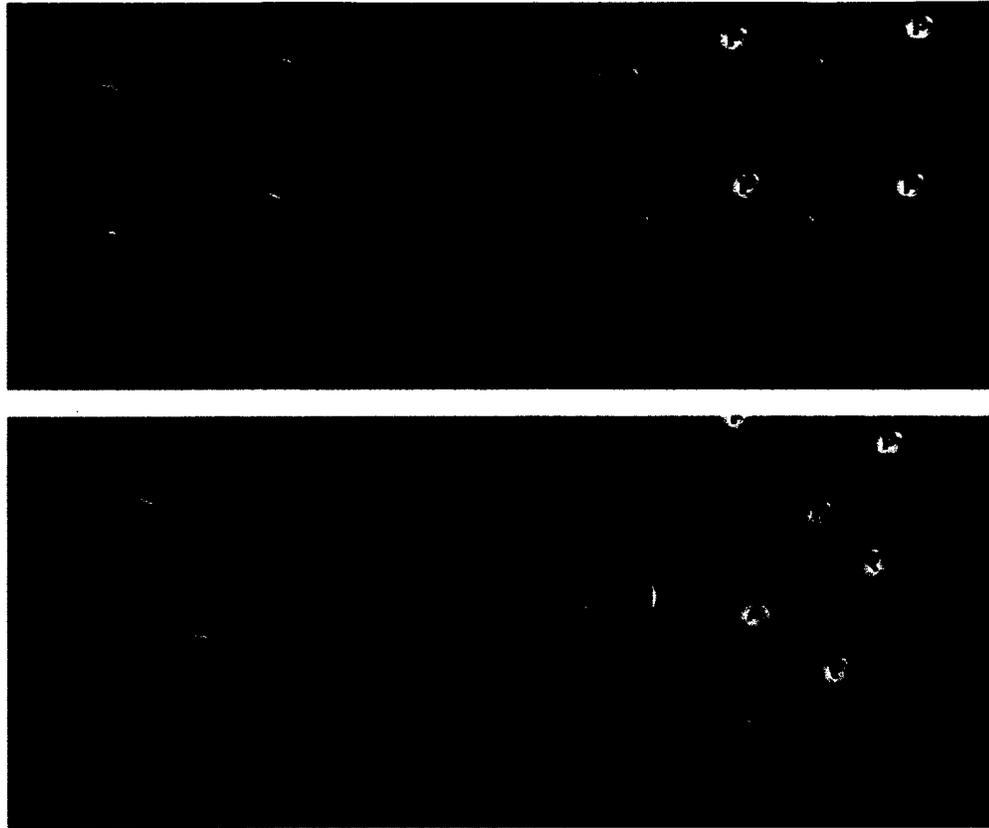


Figure 7 : Débalancement des complexes protéiques contenant l'ATXN1 dans la SCA1. A) Formation de complexe en condition normale : un certain équilibre biologique est atteint. B) En condition pathologique, l'ATXN1 mutante contenant une expansion polyglutamine voit son affinité pour RBM17 augmentée, ce qui crée un déséquilibre et favorise la formation de complexes avec RBM17 aux dépens des complexes avec la protéine CIC (Zoghbi et Orr, 2009). *Les petits cercles rouges représentent les résidus glutamines. Les ovales bleus représentent le domaine AXH de l'ATXN1.*

Dans le même ordre d'idée, la surexpression de la protéine ATXN1 normale (30Q) dans des souris ou des drosophiles engendre des phénotypes similaires à l'expression faible de la protéine ATXN1 mutante (82Q) (Fernandez-Funez *et al.*, 2000), ce qui appuie l'hypothèse d'un gain de fonction pathologique. Pour ce qui est de la perte de fonction, des souris possédant seulement un allèle de l'ATXN1 avec une expansion de 154 glutamines montrent un phénotype beaucoup plus sévère que les souris exprimant le même allèle mutant ainsi qu'un deuxième allèle codant pour l'ATXN1 endogène de souris (Lim *et al.*, 2008). De plus, la surexpression du paralogue de l'ATXN1, BOAT, dans des modèles de souris développant la SCA1 supprime partiellement le phénotype pathologique indiquant que

BOAT viendrait rétablir une partie de la fonction normale de l'ATXN1, ce qui renforce le concept de la perte de fonction (Bowman *et al.*, 2007). Les souris déficientes pour le gène ATXN1 et des souris modèles pour la SCA1 montrent certaines anomalies cérébrales communes, ce qui propose aussi une perte de fonction de l'ATXN1 dans la SCA1. Tous ces résultats montrent sans aucun doute la complexité de la SCA1 et pointent vers un débalancement des fonctions de l'ATXN1 tant au niveau perte que gain de fonction vis-à-vis les différents interacteurs de la protéine (tel qu'exemplifié à la figure 7).

1.4. Localisation nucléaire

Dans les cellules eucaryotes, le matériel génétique est séparé du contenu cytoplasmique par une membrane nucléaire, qui par ses pores nucléaires empêche la diffusion passive des molécules de plus de 40 kDa, ce qui facilite une régulation stricte et précise de l'expression génique par différents facteurs et molécules de signalisation (Cyert, 2001; Davis, 1995; Stewart *et al.*, 2001). La cellule a donc besoin d'un système permettant l'identification de protéines spécifiques dans le cytoplasme pour permettre leur passage à travers les pores nucléaires et leur relâche au noyau. Les deux composantes indispensables à ce phénomène sont une séquence de localisation nucléaire (NLS) sur les protéines à importer au noyau et des protéines de transport qui reconnaissent ce signal pour permettre leur passage à travers les pores nucléaires.

Une séquence NLS présente dans une protéine est définie par quatre caractéristiques importantes : la nécessité de la séquence pour l'import d'une protéine au noyau, sa suffisance pour permettre l'import d'une protéine non reliée, sa liaison directe à une protéine de transport (karyophérine, Kap) et finalement l'arrêt de l'import de la protéine cargo lors de l'inhibition de la Kap β responsable (Lange *et al.*, 2007). À ce jour, il existe deux grands types de signaux de localisation nucléaire bien caractérisés : la séquence de localisation nucléaire classique (cNLS) et les séquences de localisation de type PY-NLS. Les cNLS sont divisées en deux sous-groupes selon la présence d'une (monopartite) ou deux (bipartite) séquences d'acides aminés basiques. Le premier cNLS monopartite à être découvert fut celui de l'antigène grand T du virus animal SV40 en 1984 (¹²⁶PKKKRRV¹³²) (Kalderon *et al.*, 1984) et le premier cNLS bipartite fut découvert en 1991 dans la

chaperone nucléaire nucléoplasmin (¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰) (Robbins *et al.*, 1991). La séquence consensus pour les cNLS monopartites est K(K/R)X(K/R) (Lange *et al.*, 2007) tandis que la séquence consensus pour les cNLS bipartites est KRX₍₁₀₋₁₂₎KRRK (Tran *et al.*, 2007). Les séquences de type PY-NLS sont beaucoup plus grandes et plus complexes que celles des cNLS, puisque leurs séquences plus variées nécessitent une certaine structure, ce qui rend leur prédiction via une séquence consensus plus difficile (Chook et Suel, 2011). Néanmoins, les PY-NLS sont caractérisés par une séquence N-terminale basique (bPY-NLS) ou hydrophobe (hPY-NLS) et un motif C-terminal RX₂₋₅PY ainsi qu'une structure plutôt désordonnée et un caractère général basique (Lee *et al.*, 2006). Les bPY-NLS comportent une séquence de 4 à 20 acides aminés enrichie en résidus basiques tandis que les hPY-NLS contiennent 4 résidus hydrophobes consécutifs.

Même si les protéines de moins de 40 kDa peuvent diffuser passivement au noyau, la plupart des protéines ayant un rôle biologique au noyau sont importées via un transport actif par une protéine de transport. Ces protéines de transport, appelées Kap β , reconnaissent et lient les séquences de localisation nucléaires et facilitent par la suite le passage des protéines ou d'ARN à travers les pores nucléaires. Il existe plus de 20 Kap β chez l'humain et chacune possède des caractéristiques intrinsèques leur permettant de lier spécifiquement certains cargos (Tableau 2). Certaines protéines de transport facilitent l'import au noyau, d'autres induisent l'export de protéines nucléaires possédant un signal d'export nucléaire (NES) vers le cytoplasme, et d'autres effectuent le transport dans les deux sens (Xu *et al.*, 2010a). Chaque Kap β reconnaît un groupe spécifique de protéine. La Kap α , par exemple, lie simultanément les cNLS ainsi que la Kap β 1, ce qui permet l'import du complexe au noyau (Gorlich *et al.*, 1995). Presque tous les autres types de signaux de localisation nucléaire caractérisés sont directement liés par un membre de la famille des Kap β (voir tableau 2). Les PY-NLS quant à eux sont reconnues et liées directement par la Kap β 2 (aussi connue sous le nom de transportin) et une grande quantité des cargos connus de cette karyophérine sont des protéines liant l'ARN ou des facteurs de transcription (Xu *et al.*, 2010a). Tous les PY-NLS sont reconnus par le même site de liaison de la Kap β 2. Néanmoins, d'autres sites de liaison de la Kap β 2 sont aussi responsables de l'importation de cargos sans PY-NLS (Chook et Suel, 2011).

Sous-familles des Kap β	Kap β humaines	Cargos connus	NLS/NES
IMB1	Imp β (Kap β 1)	Protéines	NLS classiques via Imp α
IMB2	Kap β 2 (Transportin)	Protéines	PY-NLS
IMB3	Importin-5 (Kap β 3 ou RanBP5)	Protéines	ND
IMB4	Importin-4 (RanBP4)	Protéines	ND
IMB5	Importin-9	Protéines	ND
IPO8	Importin-7 (RanBP7), Importin-8 (RanBP8)	Protéines	ND
KA120	Importin-11	Protéines	ND
TNPO3	Transportin-SR, Transportin-SR2 (Transportin-3 ou TPNO3)	Protéines	Domaines RS
	Importin-13	Protéines	Conformations
XPO1	CRM1(Exportin-1)	Protéines et ARNs	NES Leucine-riches ou NES classiques
XPO2	CAS	Imp α	Conformation entière d'Imp α
XPO4	Exportin-4	Protéines	ND
XPO5	Exportin-5	ARNs et protéines	Conformation; Pré-miARN entier
XPO6	Exportin-6	Protéines	ND
XPO7	Exportin-7 (RanBP16)	Protéines	ND
XPOT	Exportin-t (Xpo-t)	ARNt	Conformation; ARNt entier

Tableau 2 Familles des karyophérines β . À gauche la sous famille de Kap β , suivie du nom de la protéine humaine. Les cargos connus de ces karyophérines sont ensuite indiqués, suivie des types de séquences liés sur les cargos qui permettent l'import ou l'export de ceux-ci. Adapté de (Xu *et al.*, 2010a).

La Kap β 2 a été découverte et caractérisée en 1996 suite à la recherche de la protéine de transport responsable de l'import de la protéine hnRNP A1, impliquée dans la maturation et le transport des ARNm (Pollard *et al.*, 1996). Depuis ce temps, de nombreux cargos importés par cette Kap ont été validés (Chook et Suel, 2011). Parmi ces protéines se retrouve hnRNP M, impliquée entre autres dans le métabolisme, la maturation et le transport des ARNm (Guttinger *et al.*, 2004). Le groupe de la Dre Yuh Min Chook a résolu la structure tridimensionnelle de la Kap β 2 liée à la protéine hnRNP A1 (Lee *et al.*, 2006) ou à la protéine hnRNP M (Cansizoglu *et al.*, 2007), ce qui a permis de mieux comprendre le mode de liaison des hPY-NLS (hnRNP A1) et des bPY-NLS (hnRNP M) et les meilleurs points de contact entre ces molécules. Suite à cette caractérisation, le groupe a créé un peptide chimérique (MBP-M9M) possédant une affinité nettement supérieure à celle des substrats naturels pour le site de liaison de la Kap β 2 aux PY-NLS, ce qui permet de

l'utiliser comme inhibiteur de transport spécifique. Le peptide MBP-M9M a par la suite permis de valider *in cellulo* plusieurs cargos de la Kap β 2.

Tel que mentionné précédemment, beaucoup de protéines importées par la Kap β 2 sont impliquées dans la maturation ou le transport des ARNm (Xu *et al.*, 2010a). Parmi ces protéines se retrouvent notamment les protéines hnRNP A1 et HuR, deux protéines possédant la caractéristique commune de localisation nucléaire dépendante de la transcription (Fan et Steitz, 1998; Pinol-Roma et Dreyfuss, 1991; Pinol-Roma et Dreyfuss, 1992). Il a été montré pour ces deux protéines que l'inhibition de l'ARN polymérase II, impliquée principalement dans la transcription d'ARNm (Sims *et al.*, 2004), augmente fortement la proportion de ces deux protéines au cytoplasme. Il a aussi été montré que hnRNP A1 ainsi que HuR font la navette entre le noyau et le cytoplasme (Fan et Steitz, 1998; Michael *et al.*, 1995; Siomi et Dreyfuss, 1995). L'implication de ces deux protéines dans la stabilisation et le transport des ARNm combinées aux observations décrites ci-haut suggère que l'arrêt de transcription empêche le recrutement d'hnRNP A1 et HuR au noyau par l'entremise des ARNm naissants et favorise leur rétention au cytoplasme où se trouvent les ARNm matures. Plusieurs autres protéines impliquées dans le métabolisme des ARNm dont l'importation au noyau est indépendante de la Kap β 2, telles DAZAP1 (Lin et Yen, 2006), RHAU (Iwamoto *et al.*, 2008) et hnRNP K (Michael *et al.*, 1997), possèdent aussi une localisation nucléaire dépendante de la transcription. Cette caractéristique semble toutefois exclusive à certaines protéines impliquées dans le métabolisme des ARNm.

1.5. La présence d'un ORF alternatif possible dans la séquence codante du gène ATXN1

Comme mentionné dans les chapitres précédents, l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 est une maladie polyglutamine grave, extrêmement complexe qui implique une multitude de protéines. La fonction normale de l'ATXN1 est encore à ce jour mal comprise et les mécanismes moléculaires impliqués dans la SCA1 le sont tout autant. Le développement des connaissances sur les différents partenaires de l'ATXN1 et la façon dont ces interacteurs sont influencés par l'ATXN1 pathologique versus l'ATXN1 normale est une

étape majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires menant à la SCA1. De nombreux animaux modèles existent (souris et drosophiles) pour étudier différents aspects de cette pathologie et une bonne compréhension sera nécessaire pour développer une thérapie efficace contre cette maladie, jusqu'à ce jour, incurable.

Curieusement, la banque de données élaborées au sein de notre équipe permettant l'identification *in silico* de protéines alternatives potentielles a révélé la présence d'un cadre de lecture ouvert (ORF) alternatif dans la séquence codante du gène *ATXN1*. L'initiation peut se faire à deux endroits produisant ainsi une isoforme longue et une isoforme courte. Nous avons observé que la forme longue est fortement majoritaire, malgré son contexte d'initiation sous-optimale. Les protéines traduites dans ce cadre de lecture alternatif ont un caractère fortement basique et un poids moléculaire approximatif de 20 kDa. Cette étude a pour but de montrer la présence et de caractériser la protéine alternative issue du gène *ATXN1*, nommée Alt-ATXN1, ainsi que d'investiguer son lien avec la protéine de référence ATXN1 et avec la pathologie SCA1.

2. Article

An out-of-frame overlapping reading frame in the *ATXN1* coding sequence encodes a novel ATAXIN-1 interacting protein

Auteurs de l'article : Danny Bergeron, Catherine Lapointe, Guillaume Tremblay, Julie Motard, et Xavier Roucou

Statut de l'article: soumis à "The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB Journal)"

Avant-propos : Je considère avoir à une contribution significative vis-à-vis ce projet de recherche. J'ai participé à l'élaboration de la majorité des expériences avec mon directeur de recherche ainsi que les deux assistants de recherche. J'ai effectué plus de 50 % des expériences de mon projet et contribué à plus de 50 % des figures finales dans l'article. J'ai aussi produit plus de 75 % des figures finales de l'article et j'ai contribué à environ 30 % de l'écriture du manuscrit.

Résumé de l'article

L'Ataxie spinocérébelleuse de type 1 (SCA1) est une ataxie autosomale dominante associée à l'expansion d'un domaine polyglutamine situé dans la protéine ataxin 1 (ATXN1). De récentes études suggèrent que la compréhension de la fonction cellulaire normale de l'ATXN1 est essentielle pour élucider les mécanismes pathologiques associés à la SCA1. Nous avons découvert dans le gène *ATXN1* un site d'initiation alternatif de la traduction, débutant par un codon ATG dans le cadre de lecture +3, situé au nucléotide 30 à partir du codon initiateur de l'ATXN1 et se terminant au codon 587. Ce nouveau cadre de lecture ouvert (ORF) chevauchant code pour une protéine de 21 kDa appelée Alt-ATXN1 (Alternative ATXN1) dont la séquence en acide aminée est complètement différente de celle de l'ATXN1. Nous avons introduit une étiquette hémagglutinine (HA) dans le cadre de lecture d'Alt-ATXN1 dans le cDNA de l'ATXN1 et avons montré dans des cellules en culture la co-expression de l'ATXN1 et de l'Alt-ATXN1. Les résultats ont montré la colocalisation d'Alt-ATXN1 dans les inclusions nucléaires causées par l'ATXN1 ainsi

qu'une interaction directe entre les deux protéines. En absence d'ATXN1, Alt-ATXN1 montre une localisation nucléaire homogène. Alt-ATXN1 interagit avec les ARN polyadénylés et sa localisation nucléaire dépend de la transcription d'ARN dans la cellule. Des anticorps polyclonaux générés contre l'Alt-ATXN1 ont confirmé l'expression d'Alt-ATXN1 dans des cervelets humains exprimant l'ATXN1. Ces résultats démontrent que le gène *ATXN1* humain code pour deux protéines différentes et que l'ATXN1 interagit avec et contrôle la distribution subcellulaire de l'Alt-ATXN1.

**AN OUT-OF-FRAME OVERLAPPING READING FRAME IN THE *ATXN1*
CODING SEQUENCE ENCODES A NOVEL ATAXIN-1 INTERACTING
PROTEIN**

**Danny Bergeron¹, Catherine Lapointe¹, Guillaume Tremblay¹, Julie Motard¹, and
Xavier Roucou^{1,*}**

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,
Quebec, J1E 4K8, Canada

*Corresponding address: Dr Xavier Roucou, Département de biochimie (Z8-2001), Faculté
de Médecine, Université de Sherbrooke, 3201 Jean Mignault, Sherbrooke, Québec J1E4K8,
Canada, Tel. (819) 821-8000x72240; Fax. (819) 820-6831; E-mail:
xavier.roucou@usherbrooke.ca

***ATNX1*: ONE GENE, TWO DISTINCT PROTEINS**

Abbreviations: ATXN1, Ataxin 1; SCA1, spinocerebellar ataxia type 1; ORF, open reading frame; polyQ, polyglutamine; Alt-ATXN1, alternative Ataxin 1; CDS, coding sequence; Kap β 2, karyopherin β 2; NLS, nuclear localization sequence; DRB, 5,6-dichlorobenzimidazole.

Abstract

Spinocerebellar ataxia type 1 is an autosomal dominant cerebellar ataxia associated with the expansion of a polyQ tract within the ataxin-1 (ATXN1) protein. Recent studies suggest that understanding the normal function of ATXN1 in cellular processes is essential to decipher the pathogenesis mechanisms in Spinocerebellar ataxia type 1. We found an alternative translation initiation ATG codon in the +3 reading frame of human *ATXN1*, starting 30 nucleotides downstream of the initiation codon for ATXN1 and ending at nucleotide 587. This novel overlapping open reading frame (ORF) encodes a 21 kDa polypeptide termed Alt-ATXN1 (Alternative ATXN1) with a completely different amino acid sequence from ATXN1. We introduced a hemagglutinin (HA) tag in-frame with Alt-ATXN1 in *ATXN1* cDNA and showed in cell culture the co-expression of both ATXN1 and Alt-ATXN1. Remarkably, Alt-ATXN1 colocalized and interacted with ATXN1 in nuclear inclusions. In contrast, in the absence of ATXN1 expression, Alt-ATXN1 displays a homogenous nucleoplasmic distribution. Alt-ATXN1 interacts with poly(A)⁺ RNA and its nuclear localization is dependent on RNA transcription. Polyclonal antibodies raised against Alt-ATXN1 confirmed the expression of Alt-ATXN1 in human cerebellum expressing ATXN1. These results demonstrate that human *ATXN1* gene is a dual coding sequence and that ATXN1 interacts with and controls the subcellular distribution of Alt-ATXN1.

Keywords: alternative translation initiation/dual coding gene/overlapping reading frame/Spinocerebellar ataxia type 1

Introduction

Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) is a lethal autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of motor coordination resulting from dysfunction and degeneration of the cerebellum. At the cellular level, atrophy of Purkinje cells from the cerebellar cortex is a pathological hallmark of SCA1. Isolation of the *ATXN1* gene led to the observation that there is a direct correlation between the size of a (CAG)_n repeat expansion in the gene and the age-of-onset of the disease (1). Normal alleles have a size range of 19-36 repeats, while pathological alleles have 39-82 repeats. Individuals with more than 70 repeats develop a juvenile form of SCA1 (1; 2). The *ATXN1* gene encodes ataxin-1 (ATXN1), a nuclear 98 kDa protein. CAG repeats encode a polyglutamine stretch of variable length and the mutant polyglutamine ATXN1 misfolds and forms inclusions in the nuclei of different types of neurons (3).

The detailed pathogenic mechanism leading to gradual neuronal degeneration in SCA1 has not been determined, but biochemical studies and genetic data from mice models revealed several important facts. First, loss of function of ATXN1 is not the primary cause of toxicity in SCA1 since mice lacking ATXN1 do not show a SCA1-like phenotype (4). Yet, loss of function may partially contribute to neuronal dysfunction through transcriptional dysregulation and abnormal protein interactions (5-7). Second, nuclear localization of the mutant polyglutamine-expanded ATXN1 is essential for the pathology (8). Third, SCA1 can develop in the absence of nuclear inclusions (8; 9). Fourth, the phosphorylation of Ser776 is necessary for the development of the disease (10). These data and others suggest a complex pathogenic mechanism with contribution of both gain-of-toxic function of mutant ATXN1 in the nucleus, and loss-of-function of the normal ATXN1 (6; 7).

The normal function of ATXN1 is still unclear. ATXN1 KO mice display impairments in learning and memory (4). ATXN1 also stimulates β -secretase processing of β -amyloid precursor protein (11). ATXN1 binds RNA and several transcription factors, and there is evidence that ATXN1 is involved in transcriptional regulation (7; 12; 13). ATXN1

genetically and physically interacts with many proteins and further studies are required to use these data to elucidate the biological function of ATXN1 (14).

Given the complexity associated to *ATXN1* in health and disease, we re-examined the *ATXN1* coding sequence (CDS) and noticed a potential overlapping open reading frame (ORF) between bps 30 and 587. We show that the protein encoded in this overlapping ORF, termed Alt-ATXN1 (Alternative ATXN-1) is co-expressed with ATXN1, and that Alt-ATXN1 interacts with ATXN1 in the nucleus. Furthermore, Alt-ATXN1 presence in nuclear inclusions is fully dependant on ATXN1 co-expression. These findings have direct implications regarding the comprehension of the function of ATXN1 in health and disease, and more generally regarding gene usage in mammals.

Materials and Methods

Cloning. All primer sequences are outlined in Table S1. ATXN1(30Q) cDNA with 30 CAG repeats was purchased from Addgene (ID16133, Cambridge, MA, USA). cDNAs were amplified using primers ATXN1 F and ATXN1 R. The PCR products were digested with HindIII and NotI and inserted into the multiple cloning site of pCEP4 β (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). ATXN1^(HA) was produced by inserting an HA tag in the +3 frame of human ATXN1 between bases 584 and 585 of the CDS by PCR overlap extension using the forward primers ATXN1 F and ATXN1^(HA) overlap F and the reverse primers ATXN1^(HA) overlap R and ATXN1 R. ATXN1(ATG132AAG)^(HA), in which the alternative ATG at bp 132 of ATXN1^(HA) was mutated to AAG, was produced by PCR overlap extension using the forward primer ATXN1 F and ATXN1(ATG132)^(HA) overlap F and the reverse primers ATXN1(ATG132)^(HA) overlap R and ATXN1 R. ATXN1(ATG30AAG)^(HA) with the alternative ATG at bp 30 mutated to AAG was produced as described above with forward primers ATXN1 F and ATXN1(ATG30)^(HA) overlap F and reverse primers ATXN1(ATG30)^(HA) overlap R and ATXN1 R. ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA) was produced as described above. Alt-ATXN1^{HA} was amplified using the primers Alt-ATXN1 hindIII F and ATXN1^(HA) overlap R and then inserted in StrataClone PCR Cloning vector pSC-A-amp/kan using the StrataClone PCR Cloning Kits (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The plasmid was then double digested with HindIII and inserted into the multiple cloning site of pCEP4 β . ATXN1(82Q) cDNA was kindly provided by Dr Harry T. Orr (University of Minnesota). Myc-MBP-M9M construct was kindly provided by Dr. Yuh Min Chook (University of Texas Southwestern Medical Center) (15).

ATXN1^{DsRed2} was produced by PCR overlap using the forward primers DsRed HindIII F and DsRed-ATXN1 overlap R and the reverse primers DsRed-ATXN1 overlap F and ATXN1 R. PCR product was thereafter digested with HindIII and NotI and inserted in the multiple cloning site of pCDNA3.1(+) (Invitrogen). ATXN1^{DsRed2} (K772T) 30Q or 82Q were produced using QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)

according to the manufacturer's instructions using primers ATXN1-K772T F and ATXN1-K772T R.

Alt-ATXN1^{EGFPN1} was produced by amplifying Alt-ATXN1 DNA sequence using primers Alt-ATXN1 HindIII F and Alt-ATXN1 EcoRI BamHI R. The PCR product was digested with HindIII and EcoRI was inserted in the multiple cloning site of pEGFP-N1 (Clontech, Mountain view, CA, USA).

GST-Alt-ATXN1 was amplified by PCR using Alt-ATXN1^{HA} as a template and the forward primer Alt-ATXN1-pGEX-4T1-EcoRI F and the reverse primer ARF-HA-pGEX-4T1-NotI R. The PCR product was digested with EcoRI and NotI and inserted into the multiple cloning site of pGEX-4T1 (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). His₆-ATXN1 was produced by amplifying ATXN1 with forward primers Atxn1-pRSETA-XhoI F and the reverse primer Atxn1-pRSETA-HindIII R. The PCR product was inserted into the multiple cloning site of pRSET A (Invitrogen). The different His₆-ATXN1 fragments were amplified from the wild type ATXN1 sequence using forward primers 1-360 F, 250-547 F, 425-689 F, 568-816 F and reverse primers 1-360 R, 250-547 R, 425-689 R, 568-816 R. The constructs were introduced in NheI pre-digested pRSET A using Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Antibodies and reagents. Primary antibodies used were polyclonal anti-ATXN1 (C-20, sc-8766; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), polyclonal anti-ATXN1 (Cat. No. A302-292 A, Bethyl, Montgomery, TX, USA), monoclonal anti-ATXN1 (Cat. No. 73-122, Neuromab, Davis, CA, USA), polyclonal anti-GAPDH (Cat. No. ab9485, Abcam, Toronto, ON, Canada), monoclonal anti-HA (Cat No. MMS-101R, Covance, Montreal, QC, Canada), monoclonal anti-βactin (clone AC-15, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), monoclonal anti-HA (clone C29F4, Cell Signaling Technology, Whitby, ON, Canada), monoclonal anti-Myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology), polyclonal anti-SP1 (PEP 2, Santa Cruz Biotechnology), polyclonal anti-GST (sc-459; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal anti-Penta-His (Cat. No. 34660, Qiagen, Toronto, ON, Canada) and polyclonal anti-hnRNP A1 kindly provided by Dr. Benoit Chabot (Université de Sherbrooke). Rabbit

polyclonal antibodies against human Alt-ATXN1 were raised either against residues 129CQLHPITADPPNRQPRHQ146 and affinity purified (Biomatik, Cambridge, ON, Canada), or against residues 158HSIPALPAGGLFHSAG172 and affinity-purified (Abnova, Walnut, CA, USA). Secondary antibodies used were horseradish peroxidase (HRP)-conjugated sheep anti-mouse IgG (NA931V, GE Healthcare), HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG (NA934V, GE Healthcare), Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (A-11701, Invitrogen), Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG (A-21069, Invitrogen), Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG (A-11019, Invitrogen) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (A-11070, Invitrogen). All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

Cell culture and drug treatments. Human epithelial kidney cells (HEK293), HeLa cells and murine neuroblastoma cells (N2a) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). Non-essential amino acids were also added to N2a cells. Cells were transfected with GeneCellin transfection reagent according to the manufacturer's instructions (BioCellChallenge, La Seyne-sur-Mer, Toulon, France). For drug treatments, cells were incubated for 3 h with 5 μ g/ml Actinomycin D or 25 μ g/ml 5,6-dichlorobenzimidazole riboside (DRB), or for 1 h with 0.5 mM sodium arsenite. Human glioblastoma cells were a generous gift from Dr. David Fortin (Université de Sherbrooke). Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki and research on human cells was approved from the Research ethics board for human subjects "Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke" (CHUS). Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Wisent).

SiRNA treatments. Human glioblastoma cells were plated in a 100 mm plate in fresh medium containing no antibiotics. After 24 hours, ATXN1 siRNA (Cat No. J-004510-07, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) or AllStars Negative Control siRNA (Cat No. 1027281, Qiagen) were transfected into the cells at a final concentration of 100 nM using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. After 72 h, cells were harvested, and lysate were processed for SDS-PAGE and Western blot analysis to assess knockdown efficiency. Experiments were repeated four times.

Sample preparation and immunoblotting. Cells samples were prepared for immunoblotting as previously described (16). Human cerebellum extracts were purchased from Novus Biologicals (Cat. No. NB820-59180, Oakville, ON, Canada). Proteins were detected by western blot using anti-ATXN1 (NeuroMab, 1/2000), anti-Alt-ATXN1 (Biomatik, 2 μ g/ml), and anti-Alt-ATXN1 (Abnova, 30 μ g/ml) antibodies.

Immunoprecipitation. Cells from a 100 mm plate were washed, lysed and cleared as described (17). Briefly cells were lysed in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% NP-40, Complete protease inhibitors (Roche, Laval, QC, Canada) for 15 min at 4°C with rocking, sheared with syringe and cleared at 15,000 x g at 4°C for 15 min. For ATXN1 immunoprecipitation, lysates were diluted in immunoprecipitation buffer (same as the lysis buffer but without glycerol) at a protein concentration of 1 μ g/ μ l in a 750 μ l final volume. Thereafter, Bethyl anti-ATXN1 antibody was incubated at a concentration of 1 ng/ μ l at 4°C with rocking. After 12 h incubation, 20 μ l of Protein A/G plus beads (Santa Cruz) were mixed for 1 to 4 h long with rocking at 4°C. Beads were then harvested with a 5,000 x g centrifugation for 5 min at 4°C and washed once 15 min and twice 5 min at 4°C. The bound proteins were eluted by incubating for 5 min at 95°C in SDS-PAGE sample buffer [0.5% SDS (w/v), 1.25% 2-mercaptoethanol (v/v), 4% glycerol (v/v), 0.01% bromophenol blue (w/v), 15 mM Tris-HCl, pH 6.8]. Proteins were detected by western blot using anti-HA (Covance, 1/500) and anti-ATXN1 (Bethyl, 1/2000) antibodies.

For Alt-ATXN1 immunoprecipitation, minor modifications were introduced in the above protocol: 1 ml lysates were incubated at a protein concentration of 2 mg/ml and 80 μ l of Anti-HA Affinity Matrix (Roche) for 2 h at 4°C with rocking. Bound proteins were eluted with SDS-PAGE sample buffer without 2-mercaptoethanol to prevent the elution of anti-HA antibodies light chains. The eluates were transferred into new tubes and 2-mercaptoethanol was then added to the samples.

Immunofluorescence. Immunofluorescence was carried out as previously described(18). Primary antibodies were diluted as follow: anti-HA (Cell signalling) 1/500, anti-ATXN1 (Santa Cruz) 1/500, anti-hnRNP A1 1/250, anti-SP1 1/50, anti-Myc 1/100. Confocal analysis was carried out as previously described (19).

Subcellular Fractionation. Cytoplasmic and nuclear fractions were isolated as previously described (20).

GST pull down assay. GST and GST-Alt-ATXN1^{HA} were produced and purified as previously described with minor modifications (21). Briefly, pGEX-4T1 and Alt-ATXN1-pGEX-4T1 were transformed into *E. coli* strain BL-21(λDE-3) (EMD bioscience, Mississauga, ON, Canada). One clone from each construct was amplified in 100 mL LB medium and induced for 6 h with 0,5 mM IPTG at 37°C with shaking. Cells were pelleted and resuspended in PBS/Triton 1% pH 7.4 and treated with 1 mg/mL of lysosyme for 30 min at 4°C with shaking. The mixture was then sonicated and centrifuged to obtain a clear lysate. The lysate was incubated with 100 µl of glutathione-agarose beads (Cat. No. 17-0756-01, GE Healthcare) for 1 h at room temperature. Beads were washed three times with PBS/1% Triton and resuspended with 100 µl of the same buffer.

For His₆-ATXN1 and the different His₆-ATXN1 fragments purification, cells were resuspended with 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, and 10 mM Imidazole, pH 8.0. The lysate was incubated with 100 µl of Nickel resin beads (Cat. No. 88221, Thermo scientific) at 4°C. Beads were washed four times with the resuspension buffer containing 20 mM Imidazole. Purified His₆-ATXN1 was eluted with 100 µl of resuspension buffer containing 250 mM Imidazole.

Fifteen µl of recombinant GST or GST-Alt-ATXN1 fixed on glutathione-agarose beads was incubated with 15 µl of purified His₆-tagged ATXN1 12 h at 4°C in 500 µl of PBS/Triton 1%, 1 mM DTT. The beads were washed three times using the same buffer. Bound proteins were eluted with SDS-PAGE sample buffer and analyzed by western blot. For the different ATXN1 fragments constructs, the same amount of GST-Alt-ATXN1 bound to the beads was used (5 µl) for each pull down. Approximately the same amount of each ATXN1 fragment was incubated with the GST-Alt-ATXN1 beads.

Pull down assays of Alt-ATXN1^{HA} with oligo(dT)-cellulose. Assays were performed as previously described with minor modifications (22). Briefly, cells (confluent 100 mm plate)

were lysed with 1 ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT), containing 430 units of RNaseOUT (Invitrogen). The lysate was homogenized using QIAshredder (QIAGEN), and centrifuged two minutes at 18,000 x g. The supernatant was incubated 10 min at room temperature with 20 mg of oligo(dT)-cellulose (GE Healthcare) pre-equilibrated with lysis buffer. The beads were washed four times 5 min with 1 ml of lysis buffer and bound proteins were eluted with SDS-PAGE sample buffer. For the oligonucleotides polymers competition experiment, oligo(dT)-cellulose was pre-incubated with 10 mg polyadenylic acid. In control experiment, there was no KCl in the lysis buffer.

Results

Alt-ATXN1 is expressed from ATXN1 cDNA. We noticed an alternative open reading frame in the +3 reading frame in *ATXN1*, with the ATG codon between bps 30 and 32, and a stop codon between bps 585 and 587, upstream of the (CAG)_n repeats domain (Fig. 1A,B). This ORF encodes a potential polypeptide termed Alt-ATXN1 (Alternative ATXN1). Alt-ATXN1 is a 185 amino acids long protein with a calculated molecular mass of 21 kDa, and is highly basic despite the complete absence of lysine residues (20 Arg and 14 His; pI = 11.5) (Fig. 1C). Another feature of Alt-ATXN1 is the high proline content, with 26 Pro residues distributed throughout the protein. This alternative ORF also encodes a potential shorter isoform (151 amino acids, 17 kDa) from ATG at bps 133-135 termed Alt-ATXN1_S (Fig. 1A-C).

short Alt-ATXN1 isoforms are shown in bold. **(B)** A diagram of ATXN1 CDS shows different features of ATXN1, including the localization of the long (Alt-ATXN1) and short (Alt-ATXN1_S) alternative ATXN1 protein isoforms. Note that Alt-ATXN1 stop codon is located just upstream of the CAG_n repeats domain. **(C)** Amino acid sequence of Alt-ATXN1. The N-terminal methionine residues of Alt-ATXN1 and Alt-ATXN1_S isoforms are labeled in bold. A putative proline-tyrosine NLS (PY-NLS) with the sequence RGE^uGPY is underlined. **(D)** Strategy used to detect Alt-ATXN1 by introducing an HA tag at the C-terminus of Alt-ATXN1. In ATXN1^(HA), ATXN1(ATG132AAG)^(HA), ATXN1(ATG30AAG)^(HA) and ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA), an HA tag (grey box) was inserted at the C-terminus of Alt-ATXN1. The parentheses surrounding the HA in the ATXN1 reading frame represent the fact that the HA epitope sequence is encoded in the Alt-ATXN1 reading frame, and is therefore undetected if expressed from the ATG codon at bp 1 of the ATXN1 CDS. ATXN1(ATG132AAG)^(HA) and ATXN1(ATG30AAG)^(HA) are identical to ATXN1^(HA) except that the ATG codons at bp 132 and 30 have been mutated to AAG, respectively. ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA) is identical to ATXN1^(HA) except that both ATG codons at bp 30 and 132 have been mutated to AAG.

Since Alt-ATXN1 is a novel protein with a sequence completely different from that of ATXN1, we introduced an HA tag within ATXN1 cDNA containing 30 CAG repeats to produce carboxy-tagged Alt-ATXN1^{HA} (Fig. 1D). This construct is termed ATXN1^(HA) where (HA) indicates that the HA tag is silent within the reading frame of ATXN1. We also generated control constructs unable to express Alt-ATXN1, Alt-ATXN1_S, or both isoforms (Fig. 1D). These constructs are ATXN1(ATG132AAG)^(HA) and ATXN1(ATG30AAG)^(HA) in which the alternative initiation codons between bp 132-135 and 30-32 were inactivated, respectively. Both alternative initiation codons were inactivated in the ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA) construct.

Lysates from mock-transfected cells and cells transfected with ATXN1, ATXN1^(HA), ATXN1(ATG132AAG)^(HA), ATXN1(ATG30AAG)^(HA) or ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA) were probed with both anti-ATXN1 and anti-HA antibodies. All constructs were expressed in different cell lines (Fig. 2A). Remarkably, two bands corresponding to the expected molecular weights for Alt-ATXN1^{HA} and Alt-ATXN1_S^{HA} were detected in lysates from cells expressing ATXN1^(HA) (Fig. 2A). The identity of these bands was confirmed in cells expressing various ATXN1^(HA) mutants. Cells transfected with ATXN1(ATG30AAG)^(HA) or ATXN1(ATG132AAG)^(HA) did not express Alt-ATXN1^{HA} or Alt-ATXN1_S^{HA}, respectively. Cells transfected with ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA) did not express either Alt-ATXN1^{HA} or Alt-ATXN1_S^{HA}. These results clearly indicate that initiation of Alt-

ATXN1 and Alt-ATXN1_s occurred at the identified alternative initiations sites. The results also show that Alt-ATXN1_s levels are insignificant compared to Alt-ATXN1 levels in HEK293 cells, and Alt-ATXN1_s was barely detected in N2a and in HeLa cells.

Figure 2

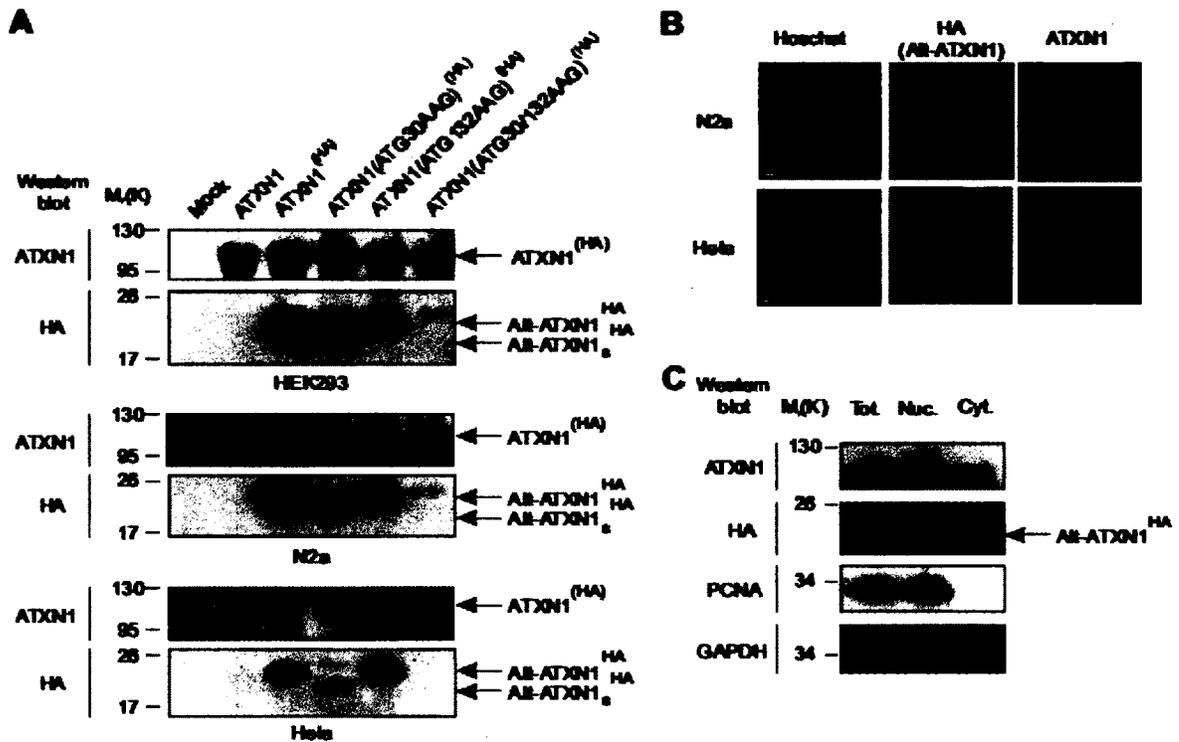


Figure 2: Expression of Alt-ATXN1. (A) Immunoblots against ATXN1 and Alt-ATXN1 (HA epitope) in HEK293, N2a cells, and HeLa cells mock-transfected or transfected with ATXN1, ATXN1^(HA), ATXN1(ATG132AAG)^(HA), ATXN1(ATG30AAG)^(HA) or ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA) constructs. Molecular weight markers in kDa are indicated on the left. This experiment is representative of three independent experiments in each cell line. (B) Confocal microscopy of cells transfected with ATXN1^(HA) and immunostained with anti-HA (red channel) and anti-ATXN1 (green channel) antibodies. Nuclei were stained with Hoechst (blue channel). Scale bar, 5 μ m. (C) Total extracts (Tot.), nucleus (Nuc.) and cytoplasmic (Cyt.) fractions from HEK293 cells expressing ATXN1^(HA) were immunoblotted for Alt-ATXN1^{HA}, the nuclear marker PCNA, and the cytosolic marker GAPDH. Molecular weight markers in kDa are indicated on the left. This experiment is representative of two independent experiments.

We verified the expression of Alt-ATXN1 by immunofluorescence and addressed the subcellular localization of this novel protein in N2a and HeLa cells transfected with ATXN1^(HA) (Fig. 2B). As expected, ATXN1 was mainly detected in small intranuclear

inclusions. Alt-ATXN1 was also predominantly present in similar intranuclear inclusions. The nuclear localization was confirmed by subcellular fractionation (Fig. 2C). Similar to ATXN1, Alt-ATXN1 was mainly detected in the nuclear fraction. Overall, these results show that *ATXN1* encodes two nuclear proteins, ATXN1 and Alt-ATXN1.

ATXN1 and Alt-ATXN1 colocalize in the nucleus and interact. Since both ATXN1 and Alt-ATXN1 are localized in the nucleus, we addressed more precisely the question of their colocalization with ATXN1^{DsRed2} and Alt-ATXN1^{EGFP} constructs. Cells transfected with ATXN1^{DsRed2} and Alt-ATXN1^{EGFP} were analyzed by confocal microscopy (Fig. 3A). As expected, ATXN1^{DsRed2} displayed mainly a typical localization in nuclear inclusions in addition to a minor diffuse nucleoplasmic distribution. Strikingly, Alt-ATXN1^{EGFP} clearly colocalized with ATXN1 in nuclear inclusions and in the nucleoplasm. Since SCA1 is caused by expansion of CAG repeats in the *ATXN1* gene, we determined if CAG expansion modifies the localization of Alt-ATXN1. We observed that colocalization of both proteins in nuclear inclusions was independent of the length of the polyglutamine tract since Alt-ATXN1^{EGFP} colocalized with ATXN1^{DsRed2} (30 repetitions of glutamine residues) and ATXN1(82Q)^{DsRed2} with 82 repetitions (Fig. 3A). In addition, ATXN1 and Alt-ATXN1 colocalized in small and large inclusions.

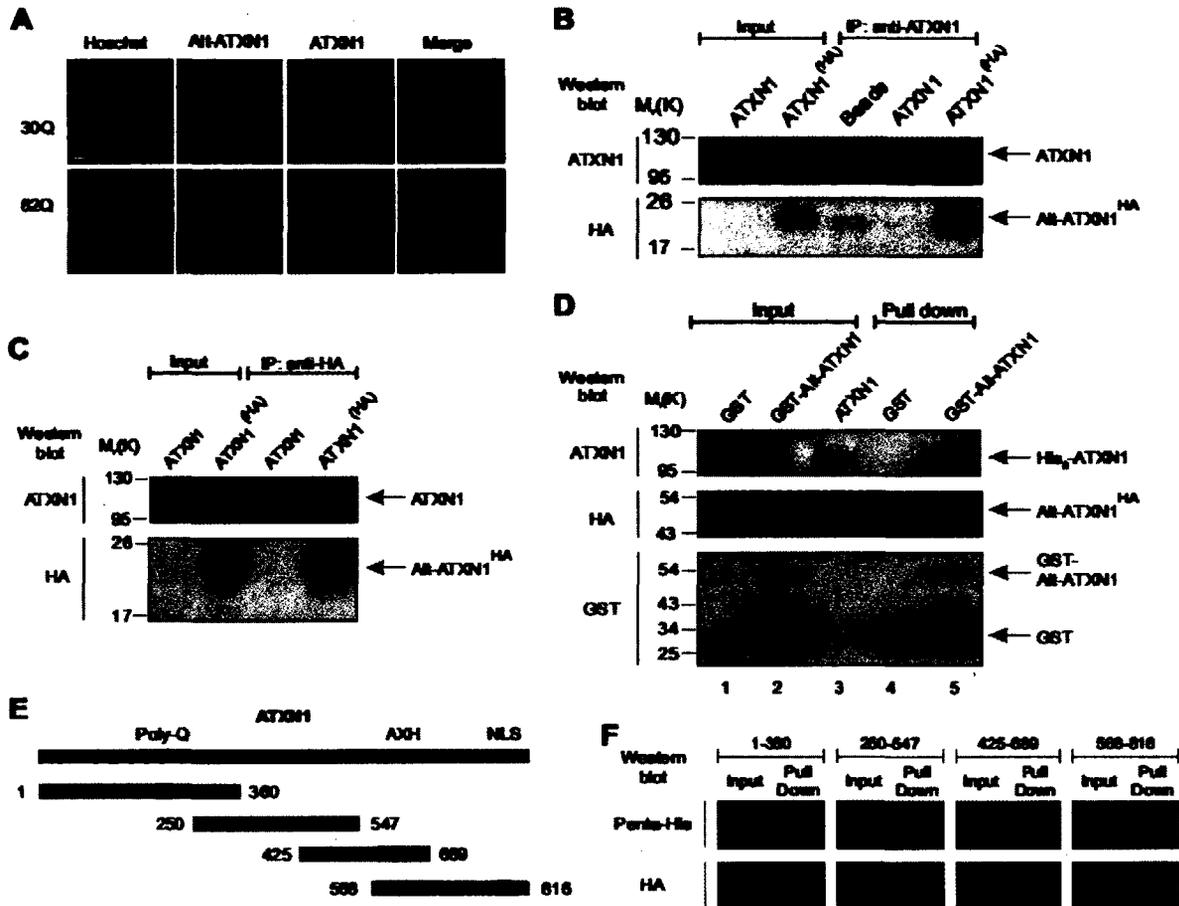
Figure 3

Figure 3: Alt-ATXN1 and ATXN1 colocalize in nuclear inclusions and interact. (A) HeLa cells were co-transfected with Alt-ATXN1^{EGFP} (green channel) and ATXN1^{DsRed2} (red channel). Nuclei were stained with Hoechst (blue channel). ATXN1 contained 30 Q repetitions or 82 Q repetitions as indicated. Scale bar, 2 μ m. (B,C) Co-immunoprecipitation experiments with anti-ATXN1 (B) or anti-HA (C) antibodies were performed using lysates from N2a cells expressing ATXN1 or ATXN1^(HA). This experiment is representative of four independent experiments. (D) Binding assays were carried out with purified glutathione-Sepharose-bound GST (input, lane 1) or GST-Alt-ATXN1^(HA) (input, lane 2) incubated with purified recombinant His₆-ATXN1 (input, lane 3). GST-Alt-ATXN1^(HA) present in the binding reaction was detected using antibodies against HA or GST, and binding of His₆-ATXN1 was detected with antibodies against ATXN1 (lane 5). GST was detected with antibodies against GST. Molecular weight markers in kDa are indicated on the left. (E) Schematic representation of the different ATXN1 fragments used to determine the region responsible for its interaction with Alt-ATXN1 (48). Fragment 1-360 contains the polyglutamine repetitions, 250-547 contains the SAD region, 425-689 contains the SAD and the AXH domain and finally 568-816 contains the AXH domain and the NLS region of ATXN1. (F) Binding assays with purified glutathione-Sepharose-bound GST-Alt-

ATXN1^{HA} incubated with purified recombinant His₆-ATXN1 fragments. GST-Alt-ATXN1^{HA} present in the binding reaction was detected using antibodies against HA and fragments of ATXN1 were detected with antibodies against penta-Histidine.

To test the interaction between ATXN1 and Alt-ATXN1 in neuronal cells, we transfected N2a cells with ATXN1^(HA). Immunoprecipitation with anti-ATXN1 antibodies showed that Alt-ATXN1^{HA} interacts with ATXN1 (Fig. 3B). In a control experiment, cells were transfected with untagged ATXN1. In these cells, Alt-ATXN1 does not bear an HA tag and should not be detected after immunoprecipitation. As expected, Alt-ATXN1 was not detected with anti-HA antibodies after ATXN1 immunoprecipitation. The interaction between ATXN1 and Alt-ATXN1 was confirmed by reverse immunoprecipitation with anti-HA antibodies; these antibodies co-immunoprecipitated Alt-ATXN1^{HA} and ATXN1^(HA) (Fig. 3C).

To further examine if the interaction between ATXN1 and Alt-ATXN1 is direct, we used an in vitro GST pull down assay. We produced and purified recombinant GST, GST-Alt-ATXN1^{HA} and His₆-ATXN1 proteins, and incubated GST or GST-Alt-ATXN1^{HA} with His₆-ATXN1. His₆-ATXN1 showed a strong binding with GST-Alt-ATXN1^{HA} but not with GST, thus confirming the direct and specific interaction between ATXN1 and Alt-ATXN1 (Fig. 3D, compare lanes 4 and 5). All together, these results clearly demonstrate that ATXN1 and Alt-ATXN1 directly interact.

In order to determine more precisely the domain of ATXN1 responsible for its interaction with Alt-ATXN1 we produced and purified different His₆-tagged ATXN1 fragments (Fig. 3E). These fragments were incubated with the same amount of GST-Alt-ATXN1^{HA}. The pull down assays show that only the 1-360 domain of ATXN1 is responsible for the interaction with Alt-ATXN1 (Fig. 3F).

ATXN1 promotes the sequestration of Alt-ATXN1 in inclusions. Based on their colocalization and interaction, we determined if one of these two proteins recruits the other protein into nuclear inclusions. Cells were transfected with Alt-ATXN1^{EGFP}, ATXN1(ATG30/132AAG)^{DsRed2}, or co-transfected with ATXN1^{DsRed2} and Alt-ATXN1^{EGFP}, and observed by confocal microscopy (Fig. 4A-C). Alt-ATXN1 displayed a diffuse nucleoplasmic distribution in the absence of ATXN1 expression (Fig. 4A). In contrast, Alt-

ATXN1 colocalized with Alt-ATXN1 in nuclear inclusions when co-transfected with ATXN1^{DsRed2} (Fig. 4B). In cells transfected with ATXN1(ATG30/132AAG)^{DsRed2}, a mutant construct that does not allow expression of Alt-ATXN1, ATXN1 formed nuclear inclusions independently of the presence of Alt-ATXN1 (Fig. 4C). Identical results were observed with ATXN1(82Q) (Fig. S1 A,B). We conclude that ATXN1 spontaneously forms intranuclear inclusions in the absence of Alt-ATXN1 expression and recruits Alt-ATXN1 into these inclusions. This observation was confirmed using a solubility assay (10). Alt-ATXN1 was detected in the insoluble fraction only in cells expressing ATXN1^(HA) (Figs 4D, S1 C).

Figure 4

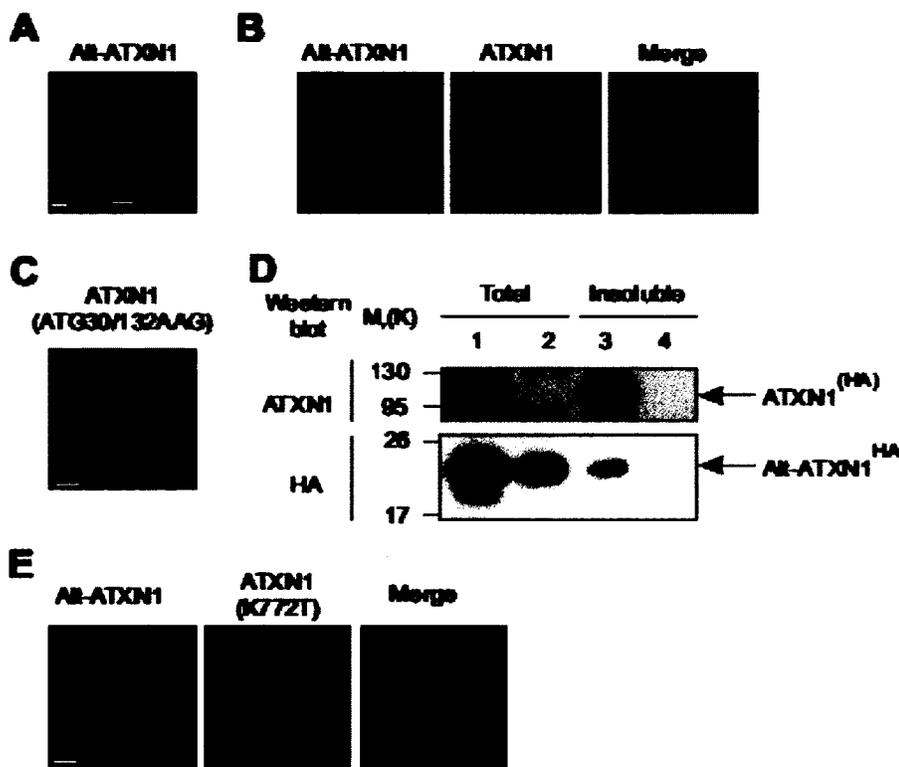


Figure 4: ATXN1 recruits Alt-ATXN1 inside inclusions. (A-C) HeLa cells were transfected with Alt-ATXN1^{EGFP} (A), Alt-ATXN1^{EGFP} and ATXN1^{DsRed2} (B) or ATXN1(ATG30/132AAG)^{DsRed2} (C) and observed by confocal microscopy. (D) Western blot with anti-ATXN1 and anti-HA antibodies showing the proportion of ATXN1^(HA) and Alt-ATXN1^{HA} in a total cell lysate (lanes 1 and 2) and in the insoluble fraction (lanes 3 and 4) from HEK293 cells expressing ATXN1^(HA) (lanes 1 and 3), or Alt-ATXN1 (lanes 2 and 4). Molecular weight markers in kDa are indicated on the left. (E) HeLa cells were co-

transfected with Alt-ATXN1^{EGFP} and ATXN1(K772T)^{DsRed2}, fixed and observed by confocal microscopy. Scale bar, 10 μ m.

In order to validate these observations, we used a nuclear localization signal mutant which forms cytoplasmic inclusions, ATXN1(K772T) (8). If ATXN1 forces Alt-ATXN1 into nuclear inclusions, the distribution of Alt-ATXN1 in cells expressing ATXN1(K772T) should remain diffuse in the nucleoplasm. Indeed, Alt-ATXN1 displayed an homogenous nucleoplasmic distribution in cells co-expressing ATXN1(K772T)^{DsRed2} and Alt-ATXN1^{EGFP} (Figs 4E, S1 D). Surprisingly, Alt-ATXN1 also associated with ATXN1(K772T) in cytoplasmic inclusions. These results demonstrate that ATXN1 is able to recruit Alt-ATXN1 in intracellular inclusions independently of their localization in the nucleus or the cytoplasm. They also suggest that Alt-ATXN1 can shuttle from the nucleus to the cytoplasm, similarly to ATXN1.

Alt-ATXN1 nuclear localization is dependent on RNA transcription. Alt-ATXN1 does not have a predicted classical NLS (23), but a putative proline-tyrosine NLS (PY-NLS) within the sequence RGE₂GPY is present at the N-terminus (24) (Fig. 1C). Two experiments were performed to test the functionality of this PY-NLS. First, since PY-NLS are specifically imported into the nucleus by Karyopherin β 2/transportin (Kap β 2) (24), we co-transfected the Kap β 2 specific inhibitor myc-MBP-M9M and Alt-ATXN1^{EGFP} in HeLa cells (15). Overexpression of myc-MBP-M9M induced the mislocalization of Alt-ATXN1^{EGFP} to the cytoplasm (Fig. 5Aa-c), indicating that Kap β 2 is the nuclear importer of Alt-ATXN1. In control experiments to confirm the specificity of myc-MBP-M9M for Kap β 2, myc-MBP-M9M mislocalized the Kap β 2 cargo hnRNP A1 (15) (Fig. 5Ad-f). In contrast, SP1, a transcription factor that is transported into the nucleus in an importin-dependent manner (25), accumulated in the nucleus, irrespective of the presence of myc-MBP-M9M. In a second approach to determine the functionality of the putative PY-NLS, a mutant Alt-ATXN1(PY/AA)^{EGFP} construct with the PY residues changed to AA by site-directed mutagenesis was generated. Surprisingly, this mutation did not alter Alt-ATXN1(PY/AA)^{EGFP} nuclear localization (Fig. 5B). Furthermore, overexpression of myc-MBP-M9M induced the mislocalization of Alt-ATXN1(PY/AA)^{EGFP} to the cytoplasm (Fig. 5C). These results indicate that Alt-ATXN1 is a Kap β 2 cargo with an atypical NLS.

The localization of several nuclear proteins with no classical NLS is dependent on transcription (26-28). Thus, we determined if transcription inhibitors altered Alt-ATXN1 nuclear localization. Cells expressing Alt-ATXN1^{EGFP} were treated with two inhibitors of RNA polymerase II, actinomycin D and 5,6-dichlorobenzimidazole riboside (DRB) (Fig. 5D). After treatment with the drugs, Alt-ATXN1 clearly appeared in the cytoplasm. This effect was not a consequence of an unspecific stress since treatment with a sublethal dose of sodium arsenite to induce an oxidative stress (29) did not change the nuclear localization of Alt-ATXN1 (Fig. 5D).

Alt-ATXN1 forms poly(A)⁺ RNA complexes. Proteins with transcription-dependent nuclear localization generally bind to mRNAs and are involved in posttranscriptional regulation (26-28). To test if Alt-ATXN1 also bind to mRNA, we examined the binding of Alt-ATXN1^{HA}-poly(A)⁺ RNA complexes to an oligo(dT)-cellulose resin. Cell lysates from cells expressing Alt-ATXN1^{HA} or mock-transfected cells were incubated with oligo(dT)-cellulose. Alt-ATXN1^{HA} was clearly recovered in the oligo(dT)-cellulose eluate fraction (Fig. 5E, lane 4). Two types of control experiments were performed to verify that Alt-ATXN1^{HA} had bound to the oligo(dT)-cellulose via its association with poly(A)⁺ RNA. First, soluble poly(A) efficiently competed for the binding of Alt-ATXN1^{HA} to the resin (Fig. 5E, compare lanes 4 and 5). Second, in the absence of KCl which is required for poly(A)⁺ RNA binding to oligo(dT)-cellulose, Alt-ATXN1^{HA} binding to the resin was largely inhibited (Fig. 5E, compare lanes 4 and 6). As a positive and negative control of an mRNA binding protein, we tested in the eluate fraction the presence of hnRNP A1 and actin, respectively. Similar to Alt-ATXN1, hnRNP A1 bound to the the oligo(dT)-cellulose in the presence of KCl. In contrast, actin was not recovered in the oligo(dT)-cellulose eluate fraction. All together, these results indicate that Alt-ATXN1 bind to and can be purified in association with mRNA on the oligo(dT) cellulose column.

CAG repeats number does not modify Alt-ATXN1 expression, and Alt-ATXN1 expression does not modify ATXN1 solubility. Since SCA1 is caused by expansion of CAG repeats in the *ATXN1* gene, we determined if CAG expansion modifies Alt-ATXN1 levels. Although Alt-ATXN1 ORF is located upstream the CAG repeats, the regulation of alternative translation is unknown and mutations located 3' to Alt-ATXN1 ORF might

influence its expression. We compared Alt-ATXN1^{HA} levels in cells transfected with ATXN1^(HA) (30 repetitions) and ATXN1(82Q)^(HA) (Fig. S2 A). Levels of Alt-ATXN1^{HA} expressed from ATXN1^(HA) and ATXN1(82Q)^(HA) did not significantly differ in two different cell lines.

Next, we determined if Alt-ATXN1 influences the biochemistry of ATXN1 by testing the impact of Alt-ATXN1 on the solubility of ATXN1 and ATXN1(82Q) in cultured cells. Cells were transfected with ATXN1^(HA), ATXN1(82Q)^(HA), ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA), and ATXN1(82Q)(ATG30/132AAG)^(HA) for 24 h, and lysed. Soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation and ATXN1 and Alt-ATXN1 proteins detected by immunoblot (Fig. S2 B). Similar to ATXN1, Alt-ATXN1 was present in both soluble and insoluble fractions. This distribution was expected since ATXN1 and Alt-ATXN1 have the same localization in nuclear inclusions and the nucleoplasm. The absence of Alt-ATXN1 expression in cells expressing ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA) and ATXN1(82Q)(ATG30/132AAG)^(HA) did not change the solubility of ATXN1 and ATXN1(82Q), respectively. We conclude that although ATXN1 and Alt-ATXN1 colocalize in the nucleus and interact, both proteins do not have a direct impact on their expression levels and solubility.

Alt-ATXN1 is endogenously expressed from ATXN1. Next, we raised polyclonal antibodies against residues 129-146 or 158-172 from human Alt-ATXN1 to detect wild-type Alt-ATXN1 encoded by the endogenous *ATXN1* gene. To validate the antibody, immunoblot experiments were performed using lysates from untransfected N2a cells (Mock) and N2a cells transfected with ATXN1^(HA), ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA), Alt-ATXN1^{HA} or ATXN1 (Fig. S3 A,B). A band was detected with the expected molecular weight in lysates from ATXN1^(HA), Alt-ATXN1^{HA}, and ATXN1-expressing cells, but not from cells expressing ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA). Addition of the immunogenic peptides to neutralize the antibodies directed against residues 129-146 or 158-172 completely prevented the detection of Alt-ATXN1. Pre-immune serum did not detect Alt-ATXN1. Therefore, both Alt-ATXN1 polyclonal antibodies specifically detect Alt-ATXN1.

To test the expression of Alt-ATXN1 in a human tissue expressing ATXN1, we performed a western blot on human cerebellum extracts (Fig. 6). We found that both endogenous ATXN1 and Alt-ATXN1 are expressed, judging by the prominent band at the same molecular weight as the band present in a control cell lysate transfected with ATXN1. This result supports the evidence of Alt-ATXN1 expression in a tissue expressing ATXN1.

We next assessed the expression of Alt-ATXN1 in primary cells from a glioblastoma of a patient, which express high levels of ATXN1. A band was detected at the expected molecular weight suggesting endogenous expression of Alt-ATXN1 in these cells (Fig. 6B). The identity of the band was confirmed after transfecting the cells with a siRNA against *ATXN1*. Western blot analysis proves that Alt-ATXN1 is endogenously expressed in these cells, since *ATXN1* knock-down resulted in a 65% decrease of the intensity of the band corresponding to ATXN1 and a 45% decrease of the intensity of the band corresponding to Alt-ATXN1 compared to cells treated with control siRNA (Fig. 6B,C). These results clearly demonstrated endogenous co-expression of ATXN1 and Alt-ATXN1 in primary neuronal cells.

Figure 6

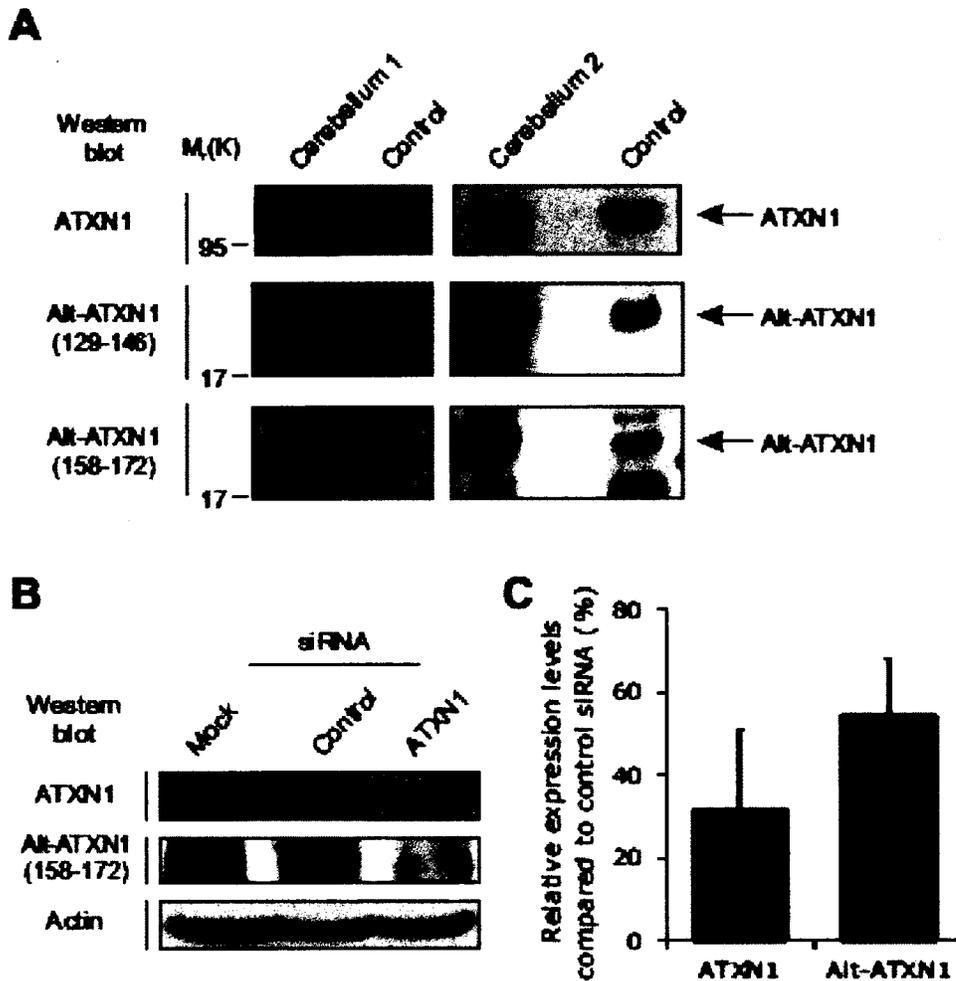


Figure 6: Alt-ATXN1 is endogenously expressed. (A) Two human cerebellum homogenates, cerebellum 1 (200 μ g) and cerebellum 2 (100 μ g) were probed for Alt-ATXN1 using two polyclonal antibodies raised against residues 129CQLHPITADPPNRQPRHQ146 or 158HSIPALPAGGLFHSAG172. A band at the same molecular weight as the one seen in 7.5 μ g lysates from cells transfected with human ATXN1 (control) was detected. Molecular weight markers in kDa are indicated on the left. (B) Endogenous Alt-ATXN1 was detected in glioblastoma cells which express a high level of ATXN1. A siRNA against the 3' of the coding sequence of ATXN1 reduced greatly the expression of ATXN1 and Alt-ATXN1 whereas the control siRNA had no effect on the expression of both proteins. (C) Densitometric analysis of siRNA treatment showed a decrease (45-70%) in expression of both ATXN1 and Alt-ATXN1 following siRNA treatment in glioblastoma cells. Value is expressed as the mean value (\pm s.d.) from three independent experiments.

Table S1 : Primers sequences

Primers	Primer sequence 5'-3'
ATXN1 F	CCCAAGCTTGCCGCATGGCTCCCGGGCAACC
ATXN1 R	CCCGCGGCCGCTCAA GCSTAATCTGGTACGTCCG
ATXN1 ^(82Q) overlap F	CGACGTACCAGATTACGCTTGAGGGACACAAGGCTGAGC
ATXN1 ^(82Q) overlap R	TCAAGGTAATCTGGTACGTGCTATGGGTACTCGCCTGTGTCCCGGCTCTGGC
ATXN1(AT6132) ^(82Q) overlap F	GGTGGAGGGCACAGCAAGGCTCCCGGGCAACC
ATXN1(AT6132) ^(82Q) overlap R	GGTTGCCCGGGAGCCTTGCTGTGCCCTCCAAC
ATXN1(AT630) ^(82Q) overlap F	CCAACCAAGAGCGGGAGCAAGAAAGCCTGCTCCCAAGAAGCGCG
ATXN1(AT630) ^(82Q) overlap R	CGCGCTTCTTGGGAGGCGAGGCTTTCGTTGCTCCGCTCTTG6TTGG
Alt-ATXN1 <i>hind</i> III F	CGCAAGCTTCGSCCATGCTGCTCCCAAGAAGCG
Alt-ATXN1 <i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI R	CGGGGATCCTCAGGGAAATCGGCTTGTGTCCCGGCGTC
DsRed <i>Hind</i> III F	CGAAGCTTGCCATGGCTCCTCCGAGAAAGTCATC
DsRed-ATXN1 overlap R	GCTCCGCTCTTG6TTGATTTCATCAGGAACA GGTG6TG6CGG
DsRed-ATXN1 overlap F	CGGCAACCACTGTTCTCTGATGAAATCCAACCAAGAGCGGAGC
ATXN1-K772T F	CCGCGGCAACGAGGACGAGGAGGTG6TCCGC
ATXN1-K772T R	GCCGACCACTCCTCCTCCTCCTGTTGCCGCGG
Alt-ATXN1-pGEX-4T1- <i>Eco</i> RI F	GCCGAATTCATGCTGCTCCCAAGAAGC
ARF-HA-pGEX-4T1- <i>Not</i> I R	GGCGCGGCCGCTCAAAGGTAATCTGGTACGTGCTATGGG
Abxn1-pRSETA- <i>Xho</i> I F	GCCCTGAGATGAAATCCAACCAAGAGCGGAGCAACG
Abxn1-pRSETA- <i>Hind</i> III R	CGGAAGCTTCTACTTGCCTACATTAGACCGCCTTCAATGC
1-360 F	GGGTTCTCATCATCATCATCATG6TATG6TACGATGAAATCCAACCAAGAGCGGAGC
1-360 R	GCTGTCCACCAATCATGCTAGAAAGCTTCTAGTGCCTGGACTG6TACGGG
250-547 F	GGGTTCTCATCATCATCATCATG6TATG6TACGCTCCAGTTCTCCGAGAACAAC
250-547 R	GCTGTCCACCAATCATGCTAGAAAGCTTCTACATG6TGGGTAGGCGG
425-689 F	CGATGACGATAAAGGATCGATGGGGATCCTACGCGCTCTCACCCACAGC
425-689 R	GCTGCAGATCTCGAGCTCGGATCAA GCTTTCAGTTCTTGAGGGTAAGCGAGATGCAGACATCC
568-816 F	GGGTTCTCATCATCATCATCATG6TATG6TACGCTTTCAGTTTCG6TGTCCAAACTCTCAG
568-816 R	GCTGTCCACCAATCATGCTAGAAAGCTTACTTGCCTACATTAGAACCGGCTTC

F, forward; R, reverse

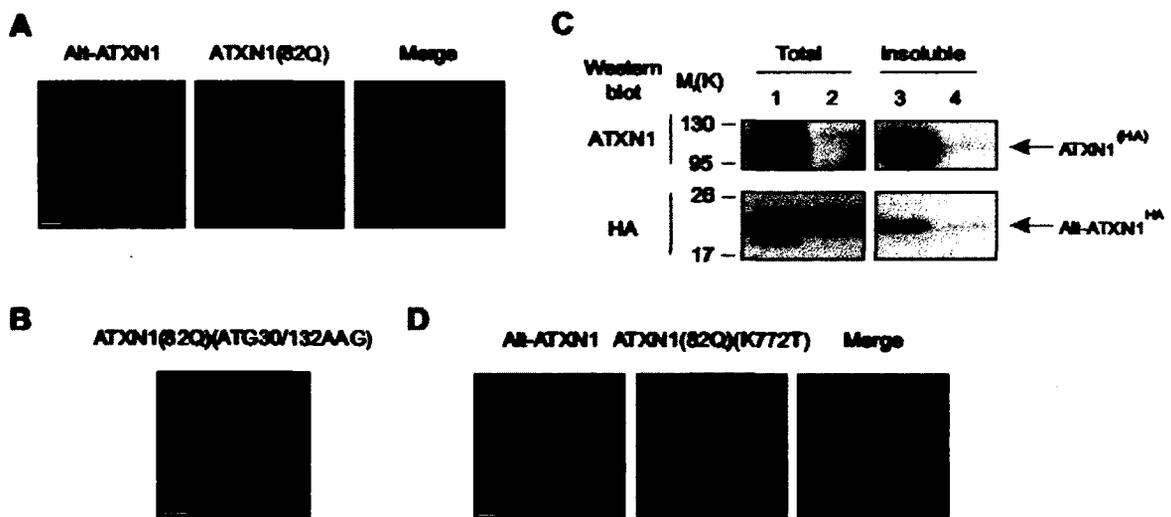


Figure S1: ATXN1(82Q) recruits Alt-ATXN1 in nuclear inclusions. (A-C) HeLa cells were transfected with Alt-ATXN1^{EGFP} and ATXN1(82Q)^{DsRed2} (A) or

ATXN1(82Q)(ATG30/132AAG)^{DsRed2} (B) and observed by confocal microscopy. (C) Western blot with anti-ATXN1 and anti-HA antibodies showing the proportion of ATXN1(82Q)^(HA) and Alt-ATXN1^{HA} in a total cell lysate (lanes 1 and 2) and in the insoluble fraction (lanes 3 and 4) from HEK293 cells expressing ATXN1(82Q)^(HA) (lanes 1 and 3) or Alt-ATXN1 (lanes 2 and 4). (D) Hela cells were co-transfected with Alt-ATXN1^{EGFP} and ATXN1(82Q)(K772T)^{DsRed2}, and observed by confocal microscopy. Scale bar, 10 μ m.

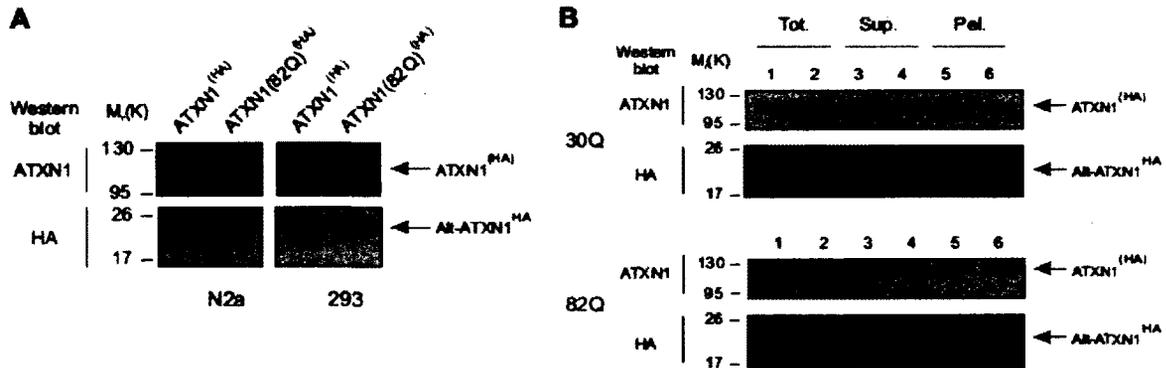


Figure S2: CAG repeats do not modify Alt-ATXN1 expression, and Alt-ATXN1 expression does not modify ATXN1 solubility. (A) Western blot against ATXN1 and Alt-ATXN1 in lysates from N2a or HEK 293 cells transfected with ATXN1^(HA) (30Q) or ATXN1(82Q)^(HA) constructs. Molecular weight markers in kDa are indicated on the left. (B) Western blot with anti-ATXN1 and anti-HA antibodies showing the distribution of ATXN1^(HA) and Alt-ATXN1^{HA} in a total cell lysate (Tot., lanes 1 and 2), in the soluble fraction (Sup., lanes 3 and 4) and in the insoluble fraction (Pel., lanes 5 and 6) from HEK293 cells expressing ATXN1^(HA) (upper panels; lanes 1,3 and 5), ATXN1(ATG30/132AAG)^(HA) (upper panels; lanes 2,4 and 6), ATXN1(82Q)^(HA) (lower panels; lanes 1,3 and 5) or ATXN1(82Q)(ATG30/132AAG)^(HA) (lower panels; lanes 2,4 and 6).

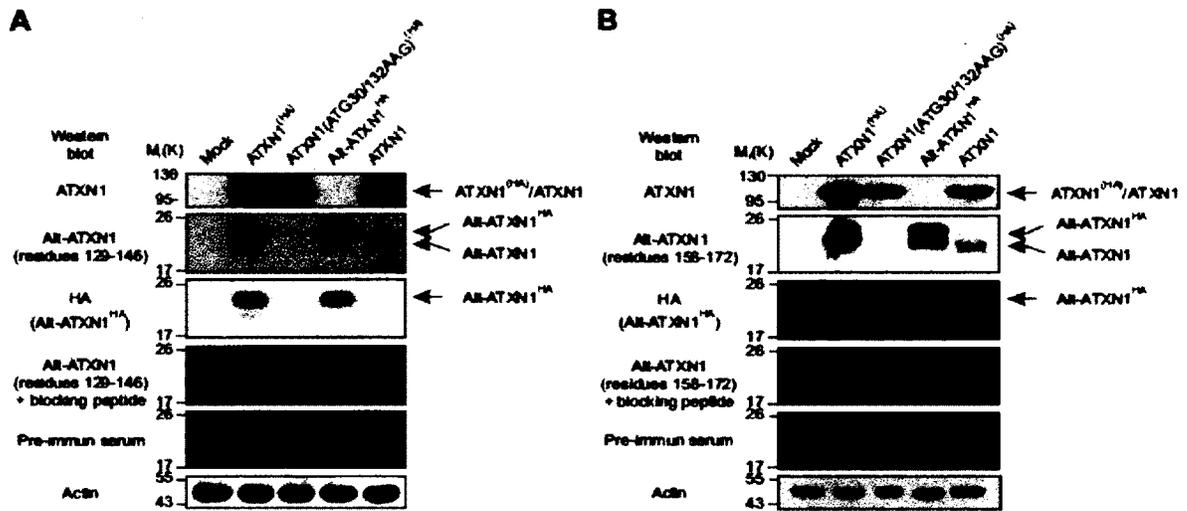


Figure S3: Validation of polyclonal antibodies against Alt-ATXN1. N2a cells were either untransfected (Mock), or transfected with ATXN1^{HA}, ATXN1(ATG30/132AAG)^{HA}, Alt-ATXN1^{HA} or ATXN1. Lysates were probed for Alt-ATXN1 and Alt-ATXN1^{HA} using polyclonal antibodies raised against residues 129CQLHPITADPPNRQPRHQ146 (A) or 158HSIPALPAGGLFHSAG172 (B) of Alt-ATXN1, or anti-HA antibodies. The same lysates were also probed with the anti-Alt-ATXN1 antibodies blocked with the immunogenic peptides, or with the animal's pre-immune serum in order to demonstrate the specificity of the antibodies. Equal loading was assessed with an anti- β -actin antibody.

Discussion

In this study, we describe a novel protein encoded by *ATXN1* and interacting with ATXN1, Alt-ATXN1. Alt-ATXN1 is constitutively expressed from an out-of-frame CDS overlapping the *ATXN1* CDS and is detected in cells transfected with ATXN1 and endogenously in the human cerebellum.

In the absence of complete understanding about the physiological function of ATXN1, several studies sought to identify molecular pathways involving ATXN1 by discovering protein interactors. From such studies, it is clear that ATXN1 associates with large protein complexes and interacts with a vast network of proteins (12; 14; 30). Current knowledge indicates that ATXN1 may be involved in transcriptional repression and regulate Notch- and Capicua-controlled developmental processes (12; 31-33). Here we add Alt-ATXN1 as a novel ATXN1 protein interactor in the nucleus. Alt-ATXN1 interacts with both normal and pathological ATXN1, suggesting that it does not directly contribute to SCA1 by a simple interaction/loss of interaction mechanism. On the other hand, this result, together with the observation that ATXN1 sequesters Alt-ATXN1 into nuclear inclusions and causes Alt-ATXN1 to become partially insoluble, favours the hypothesis that Alt-ATXN1 is a mediator in the function of ATXN1 in normal and/or pathological conditions.

The sequestration of Alt-ATXN1 by ATXN1 in intranuclear inclusions is reminiscent of the interaction between ATXN1 and Leucine-rich Acidic Nuclear Protein (LANP, ANP32A, pp32) (4). Indeed, similar to Alt-ATXN1, transfected LANP displays a homogenous distribution in the nucleus whilst co-transfection with ATXN1 induces its redistribution within ATXN1 inclusions (4). LANP is a cofactor in transcriptional repression with a probable role in neuritic pathology in SCA1 (34; 35). In this context, the role of Alt-ATXN1 in transcriptional repression in cooperation with ATXN1 deserves further investigations.

Another connection between Alt-ATXN1 and RNA derives from the observation that Alt-ATXN1 nuclear import pathway is dependent on RNA polymerase II transcription. This particular feature is shared with several proteins involved in RNA metabolism and

regulating gene expression, including hnRNP proteins, human antigen R (HuR), deleted in azoospermia associated protein 1 (DAZAP), Quaking I-5, TIAR and TIA-1 (36-41). Finally, our observation that Alt-ATXN1 associates with poly(A)⁺ RNA definitively reinforces the hypothesis that this novel protein has a function in mRNA metabolism.

Whether coding multiple proteins with overlapping open reading frames, similar to *ATXN1*, is a usual feature in mammals is not known. The only known examples include *INK4a*, *GNAS1*, *XBPI*, *PRNP* (16; 42-44). *PRNP* and *ATXN1* are particular in that the overlapping ORFs are entirely comprised in the CDS of the reference proteins PrP and ATXN1, respectively. Overlapping ORFs are also involved in the generation of cryptic epitopes translated from self-proteins (45-47). It is tempting to speculate that alternative translation in eukaryotes has been overlooked and may significantly contribute to the proteome. One way to address this issue would be to predict and test the expression of alternative ORFs in large scale experiments.

In summary, we discovered that in addition to ATXN1, the *ATXN1* gene encodes a second protein in the non-canonical reading frame +3. This novel protein, termed Alt-ATXN1, is constitutively co-expressed and directly interacts with ATXN1, and displays RNA-binding activity. Future studies will have to address whether Alt-ATXN1 may have a role in SCA1 pathology.

Acknowledgements

We thank Dr Harry T. Orr for the gift of the ATXN1(82Q) cDNA clone and Dr. Yuh Min Chook for the gift of the M9M construct. We also thank Dr. Benoit Chabot for providing us with the hnRNP A1 antibody and Dr. David Fortin for providing us with the human glioblastoma cells. This research was funded by the Canadian Institutes for Health Research (MOP -89881 to XR). DB is a recipient of a postgraduate scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from the Fonds de la Recherche en santé du Québec .

References

1. Orr, H. T., Chung, M. Y., Banfi, S., Kwiatkowski, T. J., Jr, Servadio, A., Beaudet, A. L., McCall, A. E., Duvick, L. A., Ranum, L. P., and Zoghbi, H. Y. (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet.* **4**, 221-226
2. Chung, M. Y., Ranum, L. P., Duvick, L. A., Servadio, A., Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (1993) Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nat Genet.* **5**, 254-258
3. Cummings, C. J., Mancini, M. A., Antalffy, B., DeFranco, D. B., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet.* **19**, 148-154
4. Matilla, A., Roberson, E. D., Banfi, S., Morales, J., Armstrong, D. L., Burrig, E. N., Orr, H. T., Sweatt, J. D., Zoghbi, H. Y., and Matzuk, M. M. (1998) Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation. *J Neurosci.* **18**, 5508-5516
5. Crespo-Barreto, J., Fryer, J. D., Shaw, C. A., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (2010) Partial loss of ataxin-1 function contributes to transcriptional dysregulation in spinocerebellar ataxia type 1 pathogenesis. *PLoS Genet.* **6**, e1001021
6. Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (2009) Pathogenic mechanisms of a polyglutamine-mediated neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia type 1. *J Biol Chem.* **284**, 7425-7429
7. Kang, S., and Hong, S. (2009) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 1 disease. *Mol Cells.* **27**, 621-627
8. Klement, I. A., Skinner, P. J., Kaytor, M. D., Yi, H., Hersch, S. M., Clark, H. B., Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (1998) Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: Role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell.* **95**, 41-53
9. Cummings, C. J., Reinstein, E., Sun, Y., Antalffy, B., Jiang, Y., Ciechanover, A., Orr, H. T., Beaudet, A. L., and Zoghbi, H. Y. (1999) Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron.* **24**, 879-892
10. Emamian, E. S., Kaytor, M. D., Duvick, L. A., Zu, T., Tousey, S. K., Zoghbi, H. Y., Clark, H. B., and Orr, H. T. (2003) Serine 776 of ataxin-1 is critical for polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Neuron.* **38**, 375-387

11. Zhang, C., Browne, A., Child, D., Divito, J. R., Stevenson, J. A., and Tanzi, R. E. (2010) Loss of function of ATXN1 increases amyloid beta-protein levels by potentiating beta-secretase processing of beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **285**, 8515-8526
12. Tong, X., Gui, H., Jin, F., Heck, B. W., Lin, P., Ma, J., Fondell, J. D., and Tsai, C. C. (2011) Ataxin-1 and brother of ataxin-1 are components of the notch signalling pathway. *EMBO Rep.* **12**, 428-435
13. Lam, Y. C., Bowman, A. B., Jafar-Nejad, P., Lim, J., Richman, R., Fryer, J. D., Hyun, E. D., Duvick, L. A., Orr, H. T., Botas, J., and Zoghbi, H. Y. (2006) ATAXIN-1 interacts with the repressor capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology. *Cell.* **127**, 1335-1347
14. Lim, J., Hao, T., Shaw, C., Patel, A. J., Szabo, G., Rual, J. F., Fisk, C. J., Li, N., Smolyar, A., Hill, D. E., Barabasi, A. L., Vidal, M., and Zoghbi, H. Y. (2006) A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of purkinje cell degeneration. *Cell.* **125**, 801-814
15. Cansizoglu, A. E., Lee, B. J., Zhang, Z. C., Fontoura, B. M., and Chook, Y. M. (2007) Structure-based design of a pathway-specific nuclear import inhibitor. *Nat Struct Mol Biol.* **14**, 452-454
16. Vanderperre, B., Staskevicius, A. B., Tremblay, G., McCoy, M., O'Neill, M. A., Cashman, N. R., and Roucou, X. (2011) An overlapping reading frame in the PRNP gene encodes a novel polypeptide distinct from the prion protein. *FASEB J.* **25**, 2373-2386
17. Mizutani, A., Wang, L., Rajan, H., Vig, P. J., Alaynick, W. A., Thaler, J. P., and Tsai, C. C. (2005) Boat, an AXH domain protein, suppresses the cytotoxicity of mutant ataxin-1. *The EMBO J.* **24**, 3339-3351
18. Grenier, C., Bissonnette, C., Volkov, L., and Roucou, X. (2006) Molecular morphology and toxicity of cytoplasmic prion protein aggregates in neuronal and non-neuronal cells. *J Neurochem.* **97**, 1456-1466
19. Beaudoin, S., Vanderperre, B., Grenier, C., Tremblay, I., Leduc, F., and Roucou, X. (2009) A large ribonucleoprotein particle induced by cytoplasmic PrP shares striking similarities with the chromatoid body, an RNA granule predicted to function in posttranscriptional gene regulation. *Biochim Biophys Acta.* **1793**, 335-345
20. Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., and Martinou, J. C. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem.* **276**, 11615-11623
21. Smith, D. B., and Corcoran, L. M. (2001) Expression and purification of glutathione-S-transferase fusion proteins. *Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. Ausubel ... [Et Al.]* Chapter 16, Unit 16.7

22. Goggin, K., Beaudoin, S., Grenier, C., Brown, A. A., and Roucou, X. (2008) Prion protein aggregates are poly(A)⁺ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response. *Biochim Biophys Acta*. **1783**, 479-491
23. Marfori, M., Mynott, A., Ellis, J. J., Mehdi, A. M., Saunders, N. F., Curmi, P. M., Forwood, J. K., Boden, M., and Kobe, B. (2011) Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*. **1813**, 1562-1577
24. Lee, B. J., Cansizoglu, A. E., Suel, K. E., Louis, T. H., Zhang, Z., and Chook, Y. M. (2006) Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell*. **126**, 543-558
25. Ito, T., Kitamura, H., Uwatoko, C., Azumano, M., Itoh, K., and Kuwahara, J. (2010) Interaction of Sp1 zinc finger with transport factor in the nuclear localization of transcription factor Sp1. *Biochim Biophys Acta*. **403**, 161-166
26. Michael, W. M., Siomi, H., Choi, M., Pinol-Roma, S., Nakielny, S., Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1995) Signal sequences that target nuclear import and nuclear export of pre-mRNA-binding proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **60**, 663-668
27. Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F., and Dreyfuss, G. (1996) A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell*. **86**, 985-994
28. Lee, S., Neumann, M., Stearman, R., Stauber, R., Pause, A., Pavlakis, G. N., and Klausner, R. D. (1999) Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*. **19**, 1486-1497
29. Duncan, R. F., and Hershey, J. W. (1987) Translational repression by chemical inducers of the stress response occurs by different pathways. *Arch Biochem Biophys*. **256**, 651-661
30. Lim, J., Crespo-Barreto, J., Jafar-Nejad, P., Bowman, A. B., Richman, R., Hill, D. E., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (2008) Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1. *Nature*. **452**, 713-718
31. Lee, Y., Fryer, J. D., Kang, H., Crespo-Barreto, J., Bowman, A. B., Gao, Y., Kahle, J. J., Hong, J. S., Kheradmand, F., Orr, H. T., Finegold, M. J., and Zoghbi, H. Y. (2011) ATXN1 protein family and CIC regulate extracellular matrix remodeling and lung alveolarization. *Dev Cell*. **21**, 746-757
32. Tsai, C. C., Kao, H. Y., Mizutani, A., Banayo, E., Rajan, H., McKeown, M., and Evans, R. M. (2004) Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 4047-4052

33. Riley, B. E., and Orr, H. T. (2006) Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: Assembling the puzzle. *Genes Dev.* **20**, 2183-2192
34. Cvetanovic, M., Rooney, R. J., Garcia, J. J., Toporovskaya, N., Zoghbi, H. Y., and Opal, P. (2007) The role of LANP and ataxin 1 in E4F-mediated transcriptional repression. *EMBO Rep.* **8**, 671-677
35. Cvetanovic, M., Kular, R. K., and Opal, P. (2012) LANP mediates neuritic pathology in spinocerebellar ataxia type 1. *Neurobiol Dis.* **48**, 526-532.
36. Pinol-Roma, S., and Dreyfuss, G. (1991) Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science.* **253**, 312-314
37. Fan, X. C., and Steitz, J. A. (1998) HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 15293-15298
38. Lin, Y. T., and Yen, P. H. (2006) A novel nucleocytoplasmic shuttling sequence of DAZAP1, a testis-abundant RNA-binding protein. *RNA.* **12**, 1486-1493
39. Wu, J., Zhou, L., Tonissen, K., Tee, R., and Artzt, K. (1999) The quaking I-5 protein (QKI-5) has a novel nuclear localization signal and shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem.* **274**, 29202-29210
40. Ayala, Y. M., Zago, P., D'Ambrogio, A., Xu, Y. F., Petrucelli, L., Buratti, E., and Baralle, F. E. (2008) Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci.* **121**, 3778-3785
41. Zhang, T., Delestienne, N., Huez, G., Krays, V., and Gueydan, C. (2005) Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins. *J Cell Sci.* **118**, 5453-5463
42. Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* **83**, 993-1000
43. Klemke, M., Kehlenbach, R. H., and Huttner, W. B. (2001) Two overlapping reading frames in a single exon encode interacting proteins--a novel way of gene usage. *EMBO J.* **20**, 3849-3860
44. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* **107**, 881-891
45. Wang, R. F., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Robbins, P. F., and Rosenberg, S. A. (1996) Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J Exp Med.* **183**, 1131-1140

46. Rosenberg, S. A., Tong-On, P., Li, Y., Riley, J. P., El-Gamil, M., Parkhurst, M. R., and Robbins, P. F. (2002) Identification of BING-4 cancer antigen translated from an alternative open reading frame of a gene in the extended MHC class II region using lymphocytes from a patient with a durable complete regression following immunotherapy. *J Immunol.* **168**, 2402-2407
47. Ho, O., and Green, W. R. (2006) Alternative translational products and cryptic T cell epitopes: Expecting the unexpected. *J Immunol.* **177**, 8283-8289
48. Serra, H. G., Duvick, L., Zu, T., Carlson, K., Stevens, S., Jorgensen, N., Lysholm, A., Burright, E., Zoghbi, H. Y., Clark, H. B., Andresen, J. M., and Orr, H. T. (2006) RORalpha-mediated purkinje cell development determines disease severity in adult SCA1 mice. *Cell.* **127**, 697-708

3. Discussion

3.1. Certaines fonctions attribuées à l'ATXN1 pourraient être associées à Alt-ATXN1

Tel que mentionné dans les chapitres antérieurs, le rôle biologique de l'ATXN1 demeure encore à ce jour assez mal compris. Par contre, quelques fonctions ont été attribuées directement à la protéine ATXN. Par exemple, Zhang *et al* (2010) ont montré que l'abolition de l'expression de l'ATXN1 dans des cellules neuronales humaines induisait une augmentation de la quantité d'A β 40 et A β 42, ces deux peptides étant directement liés à la maladie d'Alzheimer (Kandalepas et Vassar, 2012; Thinakaran et Koo, 2008; Zhang *et al.*, 2010). L'étude a montré globalement que l'abolition de la production de l'ATXN1 endogène (par ARN interférents) ou bien la surexpression de l'ATXN1, en transfectant la séquence codante du gène *ATXN1*, modulait le niveau des peptides A β 40 et A β 42. Or, l'abolition de l'expression de l'ATXN1 par ARN interférent induit aussi l'abolition de l'expression de la protéine Alt-ATXN1, tel que montré au chapitre précédent. De plus, la surexpression de l'ATXN1 en utilisant la séquence codante du gène *ATXN1* induit aussi une surexpression de la protéine Alt-ATXN1. Il devient donc très difficile de discriminer le rôle de chacune des deux protéines produites simultanément. Dans ce cas, il est possible qu'Alt-ATXN1 soit en partie ou complètement responsable de la modulation de la quantité des peptides A β 40 et A β 42 dans les cellules. Dans le même ordre d'idée, Cvetanovic *et al.* (2011) ont montré que l'ATXN1 était responsable de la régulation négative de l'ARNm produit à partir du gène *Vegfa* (Cvetanovic *et al.*, 2011). Pour montrer ce phénomène, la séquence codante du gène *ATXN1* a été utilisée. Puisqu'à partir de cette séquence Alt-ATXN1 est aussi produite, il est probable qu'elle ait une influence sur la régulation observée de l'ARNm du gène *Vegfa*. Ainsi, certaines fonctions attribuées à la protéine ATXN1 dans la littérature pourraient être plutôt attribuables à la protéine Alt-ATXN1 simultanément produite avec l'ATXN1.

Deux modèles murins sont couramment utilisés pour étudier la SCA1, soit les souris A02 et B05 qui sont des souris transgéniques exprimant l'ATXN1 humaine avec une répétition de 30 ou 82 glutamines, respectivement (Burright *et al.*, 1995). Les transgènes présents dans ces souris sont uniquement exprimés dans les cellules de Purkinje, principales cellules affectées lors de SCA1, et le niveau d'expression des transgènes est environ 100 fois plus élevé que le niveau d'ATXN1 endogène. Dans ces deux lignées murines, le transgène permet la coproduction de la protéine Alt-ATXN1 et ATXN1. La présence de l'Alt-ATXN1 peut donc avoir un effet chez ces souris. Rodriguez *et al.* (2013) ont montré que les souris B05 possèdent un patron d'expression de microARN différent de celui des souris de type sauvage (Rodriguez-Lebron *et al.*, 2013). Dans cette étude, le changement d'expression a été attribué à la protéine ATXN1 humaine (82Q). Toutefois, il est possible que ce changement soit plutôt attribuable à l'expression de la protéine Alt-ATXN1. En effet, Alt-ATXN1 lie les ARN polyadénylés, donc il est envisageable que la protéine puisse lier les microARN et influencer la fonction/stabilité/expression de ceux-ci. De plus, les souris transgéniques de lignées B05 montrent des déficits cérébraux importants ainsi qu'une dégénérescence des cellules de Purkinje (Clark *et al.*, 1997). Ces phénotypes importants ont été directement attribués à la protéine ATXN1 mutante (82Q) et aux dommages subséquents causés par l'accumulation de la protéine agrégée. Or, puisque Alt-ATXN1 est produite en même temps que l'ATXN1 mutante, que les deux protéines interagissent directement et que l'agrégation de l'ATXN1 cause l'agrégation de l'AltATXN1, il est possible qu'une partie des effets menant à la pathologie soit liée à un gain de fonction synergique des deux protéines. Sachant qu'à partir de la séquence codante du gène *ATXN1* deux protéines sont coproduites, on peut penser que la protéine alternative puisse moduler certains des phénotypes observés via son interaction directe avec la protéine de référence ou d'autres interactions non caractérisées à ce jour.

3.2. Rôle possible d'Alt-ATXN1 dans les maladies de type SCA1

Le gène responsable de la SCA1 a été découvert il y a maintenant presque 20 ans (Banfi *et al.*, 1994; Orr *et al.*, 1993) et les mécanismes entourant la pathologie sont à ce jour encore loin d'être parfaitement compris. La protéine ATXN1 mutante pour le nombre de

répétition de glutamine semble suffisante pour causer un phénotype pathologique via l'altération des caractéristiques de plusieurs protéines impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires (tableau 3). L'expression de l'ATXN1 mutante humaine est aussi suffisante pour causer un phénotype pathologique chez d'autres organismes vivants ne possédant pas naturellement une ATXN1 avec un potentiel agrégatif telles la souris et la drosophile (Burrigh *et al.*, 1995; Fernandez-Funez *et al.*, 2000). Or, ces espèces ne possèdent pas non plus le cadre de lecture ouvert alternatif équivalent à l'AltATXN1 humaine. Puisque, comme mentionné précédemment, l'Alt-ATXN1 est coproduite avec l'ATXN1 humaine, il est sensé de se demander si l'Alt-ATXN1 joue un rôle au niveau de la SCA1.

Protéines interagissant avec l'ATXN1	Voie cellulaire	Région de l'ATXN1 responsable de l'interaction	Modulation par le Poly Q
PQBP1		N/D	Oui
Gfi-1/senseless		AXH	Non
Tip60		Région incluant le SAR	Oui
Boat		SAR	Oui
UbcH6	Transcription	C-terminal	Non
LANP		C-terminal	Oui
Capicua		AXH	Non
SMART		N/D	Non
Sp1		AXH	Oui
A1Up		SAR	Non
PQBP1		N/D	Oui
p80 coilin		C-terminal	Non
	Métabolisme des ARN		
TAP/NXF1		N/D	N/D
RBM9		N/D	N/D
PUM1		N/D	N/D
RBM17		C-terminal	Oui
Ubiquitin	Ubiquitination	N/D	Oui
CHIP		N/D	Non
UbcH?		C-terminal	Non
Phosphate	Phosphorylation	C-terminal	Oui
Akt		N/D	N/D
Sumo-1	Sumoylation	Domaines multiples	Oui
USP7	Stabilisation	C-terminal	Oui
14-3-3		C-terminal	Oui

Tableau 3 Protéines interagissant avec l'ATXN1. À gauche se retrouvent les interacteurs de l'ATXN1, suivis des voies cellulaires influencées auxquelles ils sont associés. Les régions de l'ATXN1 connues pour lier ces protéines sont par la suite indiquées, suivies de l'implication dans l'interaction de la longueur de la répétition polyglutamine. N/D : non déterminé, SAR : région responsable de la dimérisation d'ATXN1. Adapté de (Kang et Hong, 2009).

L'ATXN1 possède une quantité assez impressionnante d'interacteurs qui sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires. Ces fonctions sont principalement la transcription, le métabolisme des ARN, la modification protéique, la stabilisation et la transduction de signaux (voir tableau 3). Toutes ces protéines semblent être impliquées dans la SCA1 par leur dérégulation fonctionnelle causée par la présence de l'ATXN1

mutante (Kang et Hong, 2009). Un des exemples de ce phénomène le mieux caractérisé dans la littérature est la présence de deux complexes indépendants *in vivo* contenant l'ATXN1, le premier contenant le répresseur transcriptionnel CIC et le deuxième contenant le facteur d'épissage RBM17 (voir figure 7). Dans le cas où l'ATXN1 mutante est présente, la formation de complexes contenant la protéine RBM17 est favorisée, ce qui induit un gain de fonction dans la SCA1, et le complexe contenant CIC est défavorisé, ce qui mène à une perte de fonction de la protéine CIC et engendre par le fait même une partie du phénotype de la SCA1 (Lam *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2008). Alt-ATXN1 lie les ARN polyadénylés, ce qui suggère un rôle dans le métabolisme des ARN, tout comme un bon nombre d'autres interacteurs de l'ATXN1 (voir tableau 3). Ceci mène à l'hypothèse selon laquelle la fonction normale de l'Alt-ATXN1 pourrait être dérégulée dans la SCA1, ce qui engendrerait certains phénotypes caractéristiques de la pathologie associés à un changement dans le métabolisme des ARN. Puisque Alt-ATXN1 interagit directement avec l'ATXN1, il est probable qu'au moins une des deux protéines ait une influence directe sur l'activité ou la fonction de l'autre. On retrouve dans la littérature plusieurs cas de protéines modulées par l'ATXN1, alors il ne serait pas surprenant que l'Alt-ATXN1 fasse partie de sa panoplie de cibles. Ainsi, le rôle biologique encore obscur de l'Alt-ATXN1 pourrait être régulé par la quantité ou la forme majoritaire de l'ATXN1 dans la cellule. Par contre, il n'est pas exclu que l'Alt-ATXN1 puisse moduler l'action ou les interactions de l'ATXN1 en jouant sur la stabilité ou la conformation de la protéine. Cet effet putatif, plus global, pourrait avoir un grand impact dans la SCA1 lorsque les deux protéines, ATXN1 et Alt-ATXN1, sont séquestrées dans les mêmes inclusions nucléaires. La régulation de l'ATXN1 par l'Alt-ATXN1 pourrait être complètement altérée, ce qui mènerait à une modification de son interactome et conséquemment aux phénotypes particuliers de la SCA1. Quoiqu'il en soit, il est très probable que la fonction de l'Alt-ATXN1 soit affectée dans les SCA1 via sa délocalisation dans les inclusions nucléaires associées à la pathologie SCA1. Cette séquestration est causée par l'ATXN1 mutante, cette même protéine qui engendre plusieurs autres dérégulations fonctionnelles. L'Alt-ATXN1 pourrait donc être impliquée dans le phénotype pathologique de la SCA1.

Lim *et al.* (2006) ont caractérisé une grande partie du réseau de plusieurs protéines impliquées dans les ataxies héréditaires, dont la SCA1 fait partie, par crible double hybride

(Lim *et al.*, 2006). En plus d'identifier de nouvelles protéines potentiellement impliquées dans les ataxies héréditaires, les auteurs ont fait des liens entre les réseaux de protéines associées aux différentes pathologies. Par exemple, ils ont montré que RBM9, A2BP1, et RBPMS, trois protéines impliquées dans la liaison aux ARN et dans l'épissage (Jin *et al.*, 2003; Nakahata et Kawamoto, 2005; Underwood *et al.*, 2005), étaient présentes dans le réseau de beaucoup de protéines causant les ataxies, et ont donc proposé une implication générale de la dérégulation du métabolisme des ARN dans les différents désordres ataxiques. Cette hypothèse avait déjà été avancée précédemment suite à l'observation de la modulation (positive ou négative) du phénotype ataxique, dans des modèles de drosophiles pour la SCA1, par des protéines liant l'ARN (Fernandez-Funez *et al.*, 2000). De manière intéressante, plusieurs évidences pointent vers une implication de l'Alt-ATXN1 dans le métabolisme des ARN (présence au noyau dépendante de la transcription, interaction avec les ARN polyadénylés, ...), ce qui suggère encore une fois un rôle dans la SCA1. Cette protéine pourrait aussi être affectée dans d'autres désordres ataxiques et causer des phénotypes pathologiques, tout comme plusieurs protéines jouant un rôle au niveau du métabolisme des ARN, notamment RBM17, U2AF2, PUM1, PQBP1 et plusieurs autres dans le cas de de la SCA1.

Dans le même ordre d'idée, Irwin *et al.* (2005) ont montré que les inclusions nucléaires causées par l'ATXN1 étaient dynamiques et qu'elles étaient dépendantes de la présence d'ARN (Irwin *et al.*, 2005). Hors, Alt-ATXN1 lie les ARN et son import nucléaire est également dépendant de la présence d'ARN au noyau. Alt-ATXN1 se retrouve d'ailleurs dans les inclusions causées par l'ATXN1, où se localisent majoritairement les ARN nucléaires. Irwin *et al.* (2005) ont aussi montré que les inclusions nucléaires causées par l'ATXN1 contiennent un facteur d'export des ARNm, la protéine TAP/NXF1. Cette protéine possède normalement une distribution plutôt diffuse au noyau, alors qu'elle est recrutée dans les inclusions pathologiques causées par l'ATXN1, tout comme Alt-ATXN1. Il est donc possible que l'Alt-ATXN1 possède une fonction similaire à celle de la protéine TAP/NXF1 dans le transport des ARNm. La séquestration de ces protéines dans les inclusions nucléaires suggère que leurs fonctions soient altérées. À l'inverse, il est possible qu'Alt-ATXN1 soit séquestrée par l'ATXN1 dans les inclusions nucléaires et qu'Alt-ATXN1 séquestre à son tour certains ARNm cellulaires importants, d'où le besoin pour la

cellule de recruter des protéines de transport des ARNm telle que TAP/NXF1. Ce confinement possible des ARNm par l'ATXN1 pourrait aussi causer certains des phénotypes pathologiques.

3.3. Alt-ATXN1, une protéine alternative

Alt-ATXN1 est exprimée *in cellulo* à partir de la séquence codante du gène *ATXN1* et *in vivo* dans des cellules de glioblastome humain ainsi que dans des cervelets humains. La protéine Alt-ATXN1 est issue de la traduction d'une partie de la séquence codante de l'ARNm du gène *ATXN1* dans un cadre alternatif à celui de la protéine de référence. Pour l'instant, nous n'avons pas d'évidence directe que les deux protéines sont traduites à partir du même ARNm. Cependant, l'hypothèse des deux ARNm est peu probable surtout dans certaines de nos conditions expérimentales dans lesquelles nous avons utilisé un vecteur d'expression contenant la séquence codante de l'ATXN1, et qui n'est pas connu pour produire plusieurs ARNm. Nous privilégions l'hypothèse que ces deux protéines sont bel et bien exprimées à partir du même ARNm. Il est donc probable qu'il existe un phénomène de compétition entre la traduction des deux protéines et qu'un mécanisme de régulation qui reste à déterminer permet aux ribosomes de sélectionner le cadre de lecture de l'ATXN1 ou de l'Alt-ATXN1. Il serait d'ailleurs intéressant de déterminer le ratio des deux protéines. Cela serait possible en ajoutant la même étiquette moléculaire aux deux protéines, et en mesurant le niveau d'expression par immunobuvardage en utilisant le même anticorps. En effet, les deux protéines ont des tailles différentes et peuvent être facilement séparées par SDS-PAGE.

Il est intéressant de spéculer à propos de l'avantage de coder ces deux protéines dans des séquences codantes chevauchantes. Pour la cellule, le coût énergétique pour produire deux protéines à partir d'un seul ARNm est évidemment plus faible que produire un second ARNm. De plus, on peut penser que si ces deux protéines sont impliquées dans la même voie biologique, cette voie peut être génétiquement régulée plus efficacement si ces 2 protéines sont exprimées à partir du même ARNm.

L'Alt-ATXN1 n'est pas le premier, et sûrement pas le dernier, cas de protéine alternative répertorié. Dans les dernières années, de plus en plus de groupes s'intéressent à ce phénomène de protéines alternatives. Le « protéome alternatif » pourrait grandement augmenter la taille et complexifier le protéome humain existant. L'Alt-ATXN1 représente un seul candidat testé parmi les 83 886 candidats présents dans la base de données que nous avons créé dans le laboratoire (Vanderperre *et al.*, soumis à *PNAS*) pour prédire les protéines alternatives potentielles chez l'humain. Quelques exemples sont déjà connus dans la littérature, dont la protéine alternative ALEX qui régule l'activité de la protéine de référence du même gène, XL α S (Freson *et al.*, 2003). ALEX est connue pour avoir un rôle dans un phénomène pathologique amenant un retard de croissance et des problèmes neurologiques et tout semble pointer vers l'implication possible d'Alt-ATXN1 dans une pathologie. La découverte de traitements contre une maladie débute par la compréhension de celle-ci (Zoghbi, 2013), et les protéines alternatives pourraient mener à de nouvelles avenues et de nouvelles connaissances sur les processus biologiques pathologiques ou normaux.

3.4. Conclusion et perspectives

Cette étude a prouvé l'existence *in vivo* de la protéine alternative Alt-ATXN1, produite à partir du gène *ATXN1*. Même si la fonction d'Alt-ATXN1 demeure à ce jour inconnue, beaucoup d'évidences permettent de croire qu'Alt-ATXN1 et ATXN1 seraient grandement liées. D'autres évidences nous permettent de croire que la protéine alternative aurait plus précisément un rôle dans le métabolisme des ARNm et qu'elle pourrait être impliquée au niveau de la SCA1. Par contre, à l'heure actuelle, il n'est pas non plus exclu qu'Alt-ATXN1 ait un rôle redondant dans la cellule et que l'altération de sa localisation dans les inclusions nucléaires causées par l'ATXN1 n'ait aucun impact dommageable sur les cellules. Alt-ATXN1 pourrait tout aussi bien être le fruit de l'évolution du gène *ATXN1* en lien avec l'expression de l'ATXN1 sans pression sélective réelle pour Alt-ATXN1 et que la protéine alternative ne possède pas de fonction biologique importante dans la cellule. Il n'en demeure pas moins que la présence des protéines alternatives chez l'humain doit être investiguée. En effet, d'autres protéines alternatives montrent des fonctions biologiques et

même des implications au niveau de pathologies, tel que ALEX. La caractérisation d'Alt-ATXN1 a permis de montrer plusieurs particularités intéressantes de la protéine, ce qui nous a permis de cibler d'autres aspects de la protéine à investiguer en vue de caractériser son rôle et sa pertinence biologique. Tout d'abord, la localisation nucléaire transcription dépendante d'Alt-ATXN1 pointe vers une implication de la protéine alternative dans le métabolisme des ARN. Certaines validations sont nécessaires pour tester cette hypothèse. Par la suite, l'interaction directe entre Alt-ATXN1 et ATXN1 ainsi que la présence de l'Alt-ATXN1 dans les inclusions nucléaires causées par l'ATXN1 suggère un rôle d'Alt-ATXN1 dans la SCA1, ce qui nécessite plus d'études. Finalement, l'aspect plus global des protéines alternatives demeure aussi un aspect intéressant et important à développer. En effet, Alt-ATXN1 représente un candidat parmi plus de 80 000 protéines alternatives prédites dans le génôme humain. De ce fait, il est intéressant d'aller valider la production et la pertinence biologique de ces autres protéines.

Alt-ATXN1 est présente dans un complexe comprenant des ARN polyadénylés, mais on ne sait pas si l'interaction est directe, ni s'il y a une spécificité de séquence le cas échéant. On pourrait répondre à ces deux questions avec la méthode du PAR-CLIP (figure 8). Celle-ci consiste à fixer de façon covalente l'ARN aux protéines qui y sont liées. Pour ce faire, un analogue nucléotidique photoactivable est ajouté au milieu de culture de cellules et ainsi intégré au pool d'ARN cellulaire, ce qui favorise la liaison covalente. Suite au photopontage, la protéine d'intérêt, dans le cas présent Alt-ATXN1, est immunoprécipitée avec l'ARN qui y est fixé. Les régions des ARN liées à la protéine sont protégées de la dégradation suite au traitement par des RNases et des nucléotides radiomarqués y sont par la suite ajoutés, ce qui permet une détection sur gel SDS-PAGE par autoradiographie. À cette étape, il sera possible de répondre à la première question et donc de voir si effectivement Alt-ATXN1 lie directement des ARN. Après l'autoradiographie, la protéine d'intérêt, liée aux fragments d'ARN radiomarqués, peut être éluée et traitée à la protéinase K. Après cette étape, il restera seulement les séquences d'ARN protégées par la protéine d'intérêt. Elles pourront être amplifiées suite à l'ajout d'adaptateurs, et par la suite séquencées. Les résultats de séquençage permettront d'identifier des séquences consensus liées par Alt-ATXN1. Une analyse bio-informatique subséquente permettra de prédire des cibles potentiellement liées et par le fait même

potentiellement modulées par la protéine Alt-ATXN1. L'effet d'Alt-ATXN1 sur ces cibles pourra être validé expérimentalement et ceci amènera beaucoup d'informations quant au rôle normal d'Alt-ATXN1. Les cibles d'Alt-ATXN1 pourront aussi être comparées au réseau de protéines impliquées dans les ataxies héréditaires présenté par Lim *et al.* (2006) pour tenter de voir s'il y a un lien entre la protéine et ces désordres neurodégénératifs.

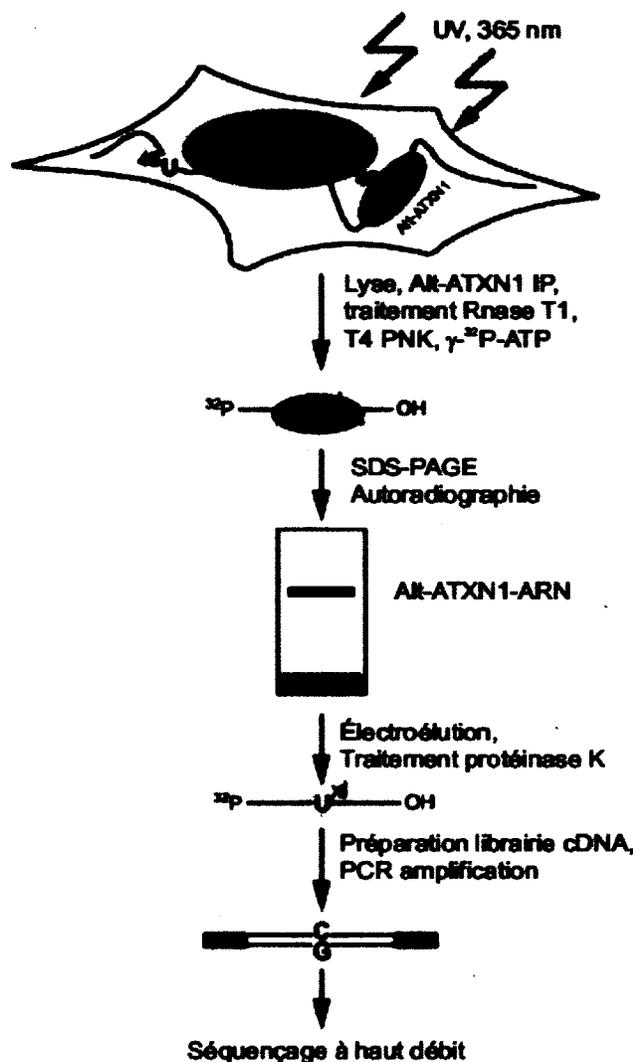


Figure 8 : Technique de PAR-CLIP. Représentation schématique de la technique de PAR-CLIP. Du 4-thiouridine (4SU) est ajouté au milieu de culture des cellules pour ensuite favoriser la liaison covalente entre l'ARN et la protéine d'intérêt, dans ce cas-ci Alt-ATXN1, lors de l'exposition aux rayons ultraviolets (UV). Alt-ATXN1 est par la suite immunoprécipité et le complexe est ensuite traité à la RNase. Des nucléotides radiomarqués sont ajoutés aux extrémités des fragments d'ARN protégés et le tout est analysé par SDS-PAGE. Le complexe ARN-protéine est élué et Alt-ATXN1 est par la suite

digéré. Les fragments d'ARN protégés par la protéine sont finalement amplifiés et séquencés grâce à l'ajout d'adaptateurs. Adapté de (Hafner *et al.*, 2010).

Il existe plusieurs façons et plusieurs techniques pour tenter de déterminer la fonction d'une protéine. Une approche efficace pour caractériser une protéine de rôle inconnu consiste à identifier des partenaires d'interaction, ce qui permet de lier la protéine à certaines voies métaboliques connues. Pour cette approche, le criblage double hybride peut s'avérer extrêmement efficace (figure 9). Pour ce faire, il est possible d'introduire chez la levure la séquence d'Alt-ATXN1 dans un vecteur d'expression spécialement conçu pour le double hybride, qui permettra l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN. Il sera cotransformé avec des vecteurs contenant chacun une séquence provenant d'une librairie de cDNA humains fusionnée à une séquence codant pour un domaine d'activation de la transcription (voir figure 9). Ainsi, les protéines de fusion issues des séquences de cDNA humain qui interagiront avec l'Alt-ATXN1 permettront l'activation de la transcription de certains gènes rapporteurs dans le génome de la levure (*HIS3*, *URA3*, *LacZ*). L'expression de ces gènes rapporteurs permettra d'identifier les levures qui contiennent une protéine interagissant avec l'Alt-ATXN1. Les plasmides pourront être isolés de ces levures et un séquençage permettra de déterminer la séquence ADN codant pour une protéine interagissant avec l'Alt-ATXN1. Une analyse bioinformatique subséquente permettra la création d'une banque de données d'interacteurs possibles de l'Alt-ATXN1, qui permettront par la suite d'associer la protéine d'intérêt à certaines voies métaboliques connues et/ou au réseau de protéines impliquées dans les ataxies héréditaires.

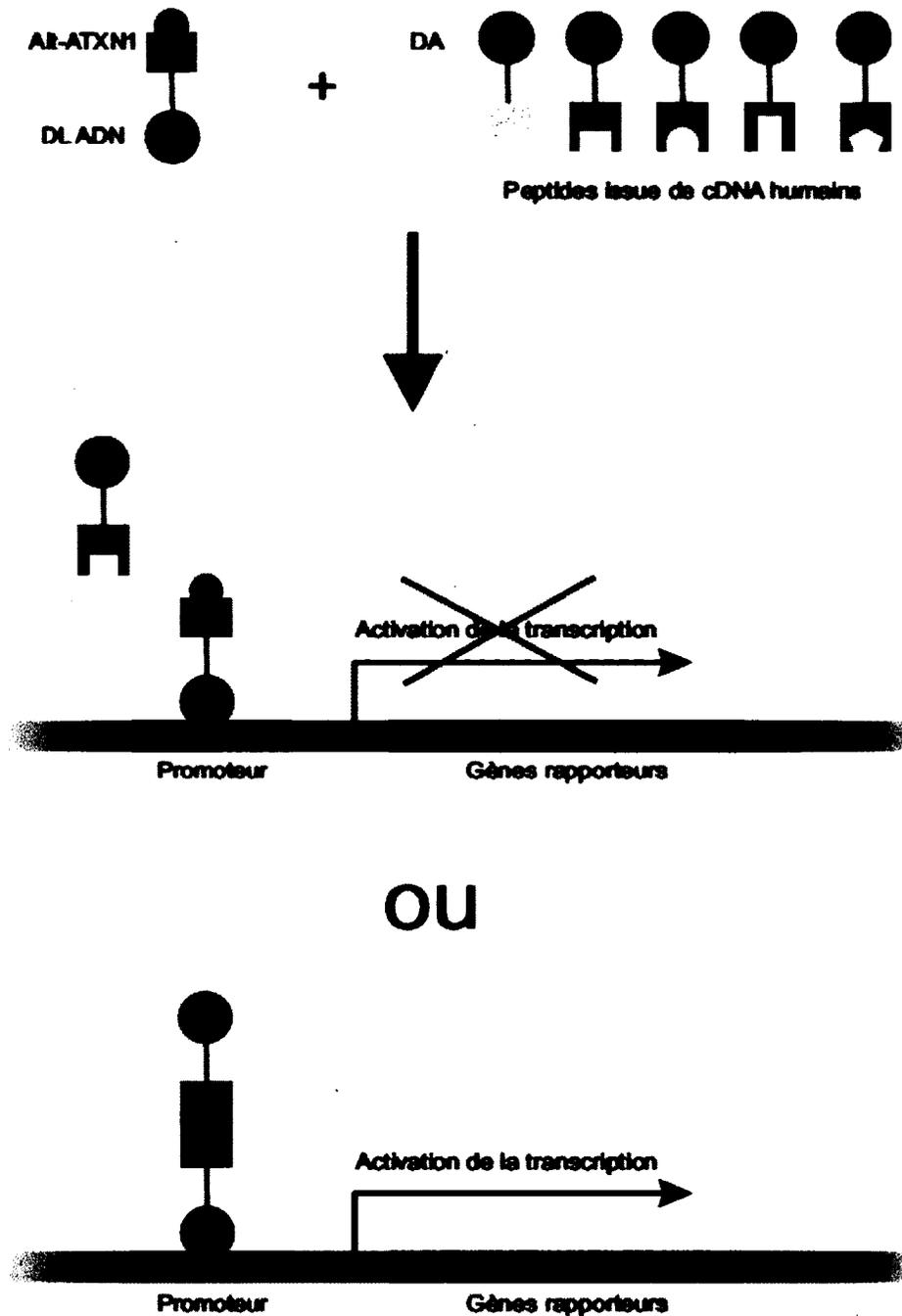


Figure 9 : Technique de criblage double hybride. Représentation schématique du criblage double hybride utilisant la protéine Alt-ATXN1 fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN (DL ADN) et une librairie de cDNA humains qui seront traduits en peptides fusionnés à un domaine d'activation de la transcription (DA). Seuls les peptides ayant une interaction avec l'Alt-ATXN1 permettront l'activation de la transcription des gènes rapporteurs chez la levure.

Les particularités d'Alt-ATXN1 concernant sa localisation nucléaire, sa liaison avec l'ATXN1, sa présence dans les inclusions nucléaires causées par l'ATXN1 et sa liaison aux ARN semblent extrêmement intéressantes d'un point de vue pathologique. Les données semblent pointer vers un rôle possible d'Alt-ATXN1 dans la SCA1. Or, l'étude sur les caractéristiques d'Alt-ATXN1 a été effectuée en surexpression du gène *ATXN1* dans des modèles cellulaires. La suite logique est de regarder ces caractéristiques *in vivo*. Nous possédons déjà deux anticorps reconnaissant chacun un épitope différent de la protéine Alt-ATXN1. Par contre, ces anticorps reconnaissent aussi beaucoup d'autres protéines de façon non spécifique, ce qui rend impossible la visualisation d'Alt-ATXN1 par immunofluorescence ou immunohistochimie de tissus par exemple. Avant de procéder aux analyses *in vivo*, il faudra d'abord produire des anticorps efficaces et spécifiques pour la protéine Alt-ATXN1 endogène. Pour ce faire, la protéine Alt-ATXN1 entière sera produite de façon recombinante et sera utilisée comme immunogène pour produire des anticorps. Si l'anticorps est assez spécifique, il sera possible d'effectuer des analyses d'immunohistochimie sur des tranches de cerveau de patients humains atteints ou non de la SCA1. Il sera ainsi possible premièrement de valider la localisation nucléaire de la protéine Alt-ATXN1 endogène et par la suite la présence de l'Alt-ATXN1 dans les inclusions nucléaires causées par l'ATXN1. Une coimmunoprécipitation pourra aussi être effectuée sur un extrait de cerveau humain pour valider l'interaction *in vivo* entre Alt-ATXN1 et ATXN1. Un essai de liaison aux ARN polyadénylés sur un extrait de cerveau humain serait aussi intéressant pour confirmer les résultats obtenus *in cellulo*. Tous ces résultats renforceraient la pertinence biologique de la protéine Alt-ATXN1 ainsi que son implication probable au niveau de la pathologie.

Ensuite, il serait intéressant d'aller regarder directement l'implication d'Alt-ATXN1 dans la SCA1. Les lignées de souris A02 et B05 sont des modèles animaux grandement utilisés pour tenter de mieux comprendre les mécanismes pathologiques entourant la SCA1. Les souris B05, qui expriment l'ATXN1 humaine avec 82 répétitions de glutamines, développent des symptômes caractéristiques de la SCA1 après seulement 12 semaines, alors que les A02, qui expriment une allèle normale d'ATXN1, n'ont aucun phénotype pathologique (Burrigh *et al.*, 1995). Puisque Alt-ATXN1 et ATXN1 sont simultanément produites à partir de la même séquence, Alt-ATXN1 est très probablement produite dans

ces lignées murines. Pour regarder l'influence d'Alt-ATXN1 dans la SCA1, il serait intéressant de créer des lignées de souris possédant un transgène de la version normale ou mutante l'ATXN1 humaine et dans lesquelles la production de l'Alt-ATXN1 a été abolie. Ces séquences posséderaient des mutations ponctuelles qui n'auraient aucune influence sur la composition en acide aminé de l'ATXN1, mais qui introduirait des séquences « STOP » dans le cadre de lecture de la protéine alternative peu après son site d'initiation. Les transgènes auraient les mêmes caractéristiques que ceux des souris A02 ou B05, c'est à dire qu'ils seraient exprimés sous le contrôle du promoteur *pcp2* et insérés de façon aléatoire dans le génome. Les symptômes pathologiques et leur vitesse d'apparition pourraient être comparés entre la B05 et les souris transgéniques produisant le même allèle de l'ATXN1 mais dont l'expression d'Alt-ATXN1 a été abolie. S'il y a une divergence au niveau des symptômes, de la gravité ou du développement de ceux-ci, il sera possible de les attribuer directement à la protéine Alt-ATXN1, tout comme il a été fait pour associer certains phénotypes à la présence d'un plus grand nombre de glutamine en comparant la lignée B05 et A02. Ceci indiquera directement si Alt-ATXN1 est impliquée dans la SCA1 ou non.

Par la suite, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'Alt-ATXN1 sur un paralogue d'ATXN1. En effet, une des explications de la viabilité des souris déficientes pour le gène *ATXN1* est que son paralogue, la protéine BOAT, possède des fonctions redondantes à l'ATXN1 (Bowman *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011). Mais qu'en est-il du rôle d'Alt-ATXN1? Est-ce que son rôle peut aussi être complété par le gène *ATXNIL* codant pour BOAT? Est-ce que le gène *ATXNIL* possède lui aussi un ORF issu d'un cadre de lecture alternatif dans sa séquence codante? La réponse à cette dernière question est : oui, potentiellement. En effet, lorsqu'on regarde la séquence codante du gène *ATXNIL*, on peut prédire un ORF alternatif dans le cadre de lecture +2, qui produirait une protéine basique composée de 149 acides aminés (figure 10). Si cette protéine est réellement produite, elle pourrait, tout comme la protéine BOAT pour l'ATXN1, avoir une fonction redondante à Alt-ATXN1. En effet, Alt-ATXN1 et la protéine alternative du gène *ATXNIL* sont deux protéines basiques, proline-riche, de petite taille (Alt-ATXN1 : 20 kDa, pI : 11.53, 14.1 % proline ; Alt-BOAT : 17.3 kDa, pI : 9.33, 14.7 % proline) dont la séquence codante est située à l'intérieur de la séquence codante du gène. Si Alt-BOAT possède une fonction redondante à

Alt-ATXN1, il n'est pas exclu qu'Alt-ATXN1 puisse avoir une fonction biologique importante dans la cellule et que celle-ci soit dans certains cas sauvé par Alt-BOAT. Pour investiguer sur le lien entre Alt-ATXN1 et Alt-BOAT, il sera possible, premièrement, de vérifier si la protéine alternative du gène *ATXNIL* peut bel et bien être produite dans un système de surexpression *in cellulo*. La même technique que celle utilisée pour l'Alt-ATXN1 pourra être utilisée, c'est-à-dire l'insertion d'une étiquette HA en 3' de la séquence codante pour la protéine alternative, dans le cDNA du gène *ATXNIL*. Après transfection et analyse subséquente par immunobuvardage, il sera possible de valider la présence de la protéine alternative. Par la suite, il sera intéressant de voir si cette protéine possède des caractéristiques semblables à l'Alt-ATXN1, c'est-à-dire une localisation nucléaire, une interaction avec l'ATXN1, une présence dans les inclusions nucléaires caractéristiques de l'ATXN1, une localisation nucléaire transcription dépendante et une liaison aux ARN polyadénylés. Si la protéine alternative du gène *ATXNIL* possède une partie ou toutes ces caractéristiques, il sera possible de valider davantage le lien de cette protéine avec l'Alt-ATXN1 et de regarder son implication aussi dans la SCA1.

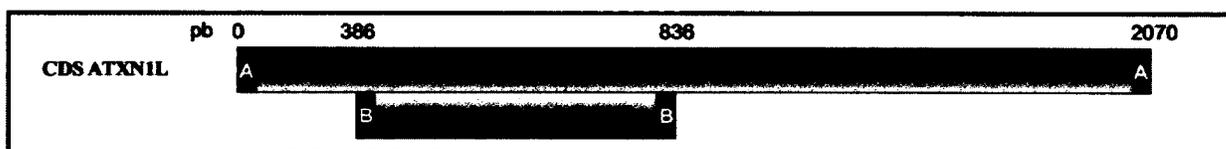


Figure 10 : Représentation du gène chevauchant potentiel dans *ATXNIL*. Séquence codante du gène *ATXNIL* codant potentiellement pour deux protéines issues de cadres de lectures différents, BOAT (cadre de lecture +1) et Alt-BOAT (cadre de lecture +2), les deux protéines comportant des sites initiateurs différents. CDS : séquence codante, pb : paires de bases.

Finalement, il existe un aspect plus global à cette étude en ce qui a trait aux protéines alternatives. Quelques groupes de recherche se sont intéressés à ce phénomène chez l'humain et ont créé des bases de données permettant de prédire ces protéines alternatives (Chung *et al.*, 2007; Ribrioux *et al.*, 2008; Vanderperre *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010b). Cependant, à ce jour, il n'existe que peu d'exemples validés expérimentalement de l'expression de ces protéines. Il devient donc intrigant de se demander si ce phénomène existe réellement à grande échelle ou bien s'il représente seulement quelques exceptions.

Beaucoup de bases de données de spectrométrie de masse effectuées sur différents échantillons et tissus humains sont publiquement disponibles. Il est possible de comparer ces bases de données avec les bases de données de prédiction de protéines alternatives pour valider *in cellulo* et *in vivo* l'expression de ceux-ci. Certains candidats pourront être validés de la même façon que pour Alt-ATXN1, c'est-à-dire par l'étude *in cellulo* de constructions surexprimées contenant une étiquette fusionnée aux protéines alternatives permettant leur détection suivie de la validation de l'expression endogène par un anticorps spécifiquement produit contre ces protéines alternatives. S'il est montré que les protéines alternatives sont réellement présentes à grande échelle, ceci apportera une plus grande compréhension de la complexité du protéome humain existant et l'étude de ces protéines apportera potentiellement de nouvelles connaissances sur plusieurs mécanismes cellulaires normaux ou pathologiques.

5. Remerciements

J'aimerais premièrement remercier mon directeur de recherche, Dr. Xavier Roucou, pour m'avoir guidé tout au long de ma maîtrise et m'avoir permis de réaliser ce projet de recherche dans son laboratoire. J'aimerais remercier Guillaume Tremblay pour avoir partagé avec moi ses innombrables connaissances et pour son aide face au développement et à la réalisation de ce projet de recherche. J'aimerais aussi remercier Julie Motard qui m'a aussi grandement guidé tout au long de ma maîtrise et son grand esprit critique m'a permis d'évoluer grandement en tant que jeune scientifique. J'aimerais aussi remercier Catherine Lapointe pour sa contribution dans ce projet de recherche. Je veux remercier aussi Guylain Boissonneault et François Boudreau pour avoir accepté de réviser mon mémoire de maîtrise. Je remercie aussi Simon Beaudoin, Maxime Béland, Cynthia Bissonnette, Karolyn Forget et Benoit Vanderperre, pour leurs conseils, leurs idées et leurs critiques. Je remercie finalement les organismes CRSNG et FRSQ pour m'avoir subventionné durant ma maîtrise ainsi que les IRSC pour avoir subventionné mon projet de recherche.

6. Références

- Aguzzi, A., Sigurdson, C. et Heikenwaelder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu.Rev.Pathol.*, **3** 11-40.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R. et Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, **431** (7010), 805-810.
- Banfi, S., Servadio, A., Chung, M. Y., Kwiatkowski, T. J., Jr, McCall, A. E., Duvick, L. A. et al. (1994). Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nat.Genet.*, **7** (4), 513-520.
- Barrell, B. G., Air, G. M. et Hutchison, C. A.,3rd (1976). Overlapping genes in bacteriophage phiX174. *Nature*, **264** (5581), 34-41.
- Bastepe, M., Gunes, Y., Perez-Villamil, B., Hunzelman, J., Weinstein, L. S. et Juppner, H. (2002). Receptor-mediated adenylyl cyclase activation through XLalpha(s), the extra-large variant of the stimulatory G protein alpha-subunit. *Mol.Endocrinol.*, **16** (8), 1912-1919.
- Bauer, P. O. et Nukina, N. (2009). The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J.Neurochem.*, **110** (6), 1737-1765.
- Blumenthal, T. (2004). Operons in eukaryotes. *Brief Funct.Genomic Proteomic*, **3** (3), 199-211.
- Bolger, T. A., Zhao, X., Cohen, T. J., Tsai, C. C. et Yao, T. P. (2007). The neurodegenerative disease protein ataxin-1 antagonizes the neuronal survival function of myocyte enhancer factor-2. *J.Biol.Chem.*, **282** (40), 29186-29192.
- Bowman, A. B., Lam, Y. C., Jafar-Nejad, P., Chen, H. K., Richman, R., Samaco, R. C. et al. (2007). Duplication of Atxn11 suppresses SCA1 neuropathology by decreasing incorporation of polyglutamine-expanded ataxin-1 into native complexes. *Nat.Genet.*, **39** (3), 373-379.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **7** (9), 678-689.
- Burright, E. N., Clark, H. B., Servadio, A., Matilla, T., Feddersen, R. M., Yunis, W. S. et al. (1995). SCA1 transgenic mice: A model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell*, **82** (6), 937-948.

- Cansizoglu, A. E., Lee, B. J., Zhang, Z. C., Fontoura, B. M. et Chook, Y. M. (2007). Structure-based design of a pathway-specific nuclear import inhibitor. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, **14** (5), 452-454.
- Carter, J. R., Franden, M. A., Aebersold, R. et McHenry, C. S. (1993). Identification, isolation, and overexpression of the gene encoding the psi subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *J.Bacteriol.*, **175** (17), 5604-5610.
- Chong, S. S., McCall, A. E., Cota, J., Subramony, S. H., Orr, H. T., Hughes, M. R. et al. (1995). Gametic and somatic tissue-specific heterogeneity of the expanded SCA1 CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat.Genet.*, **10** (3), 344-350.
- Chook, Y. M. et Suel, K. E. (2011). Nuclear import by karyopherin-betas: Recognition and inhibition. *Biochim.Biophys.Acta*, **1813** (9), 1593-1606.
- Chung, M. Y., Ranum, L. P., Duvick, L. A., Servadio, A., Zoghbi, H. Y. et Orr, H. T. (1993). Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nat.Genet.*, **5** (3), 254-258.
- Chung, W. Y., Wadhawan, S., Szklarczyk, R., Pond, S. K. et Nekrutenko, A. (2007). A first look at ARFome: Dual-coding genes in mammalian genomes. *PLoS Comput.Biol.*, **3** (5), e91.
- Ciechanover, A. et Brundin, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: Sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*, **40** (2), 427-446.
- Clark, H. B., Burrig, E. N., Yunis, W. S., Larson, S., Wilcox, C., Hartman, B. et al. (1997). Purkinje cell expression of a mutant allele of SCA1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations. *J.Neurosci.*, **17** (19), 7385-7395.
- Contreras, R., Rogiers, R., Van de Voorde, A. et Fiers, W. (1977). Overlapping of the VP2-VP3 gene and the VP1 gene in the SV40 genome. *Cell*, **12** (2), 529-538.
- Cummings, C. J., Mancini, M. A., Antalffy, B., DeFranco, D. B., Orr, H. T. et Zoghbi, H. Y. (1998). Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat.Genet.*, **19** (2), 148-154.
- Cummings, C. J., Reinstein, E., Sun, Y., Antalffy, B., Jiang, Y., Ciechanover, A. et al. (1999). Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron*, **24** (4), 879-892.
- Cummings, C. J. et Zoghbi, H. Y. (2000). Trinucleotide repeats: Mechanisms and pathophysiology. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.*, **1** 281-328.

- Cvetanovic, M., Patel, J. M., Marti, H. H., Kini, A. R. et Opal, P. (2011). Vascular endothelial growth factor ameliorates the ataxic phenotype in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *Nat.Med.*, **17** (11), 1445-1447.
- Cvetanovic, M., Rooney, R. J., Garcia, J. J., Toporovskaya, N., Zoghbi, H. Y. et Opal, P. (2007). The role of LANP and ataxin 1 in E4F-mediated transcriptional repression. *EMBO Rep.*, **8** (7), 671-677.
- Cyert, M. S. (2001). Regulation of nuclear localization during signaling. *J.Biol.Chem.*, **276** (24), 20805-20808.
- Davis, L. I. (1995). The nuclear pore complex. *Annu.Rev.Biochem.*, **64** 865-896.
- de Chiara, C., Giannini, C., Adinolfi, S., de Boer, J., Guida, S., Ramos, A. et al. (2003). The AXH module: An independently folded domain common to ataxin-1 and HBP1. *FEBS Lett.*, **551** (1-3), 107-112.
- de Chiara, C., Menon, R. P., Dal Piaz, F., Calder, L. et Pastore, A. (2005). Polyglutamine is not all: The functional role of the AXH domain in the ataxin-1 protein. *J.Mol.Biol.*, **354** (4), 883-893.
- Diener, H. C. et Dichgans, J. (1992). Pathophysiology of cerebellar ataxia. *Mov.Disord.*, **7** (2), 95-109.
- Durr, A. (2010). Autosomal dominant cerebellar ataxias: Polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol.*, **9** (9), 885-894.
- Emamian, E. S., Kaytor, M. D., Duvick, L. A., Zu, T., Tousey, S. K., Zoghbi, H. Y. et al. (2003). Serine 776 of ataxin-1 is critical for polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Neuron*, **38** (3), 375-387.
- Fan, X. C. et Steitz, J. A. (1998). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95** (26), 15293-15298.
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M. L., de Gouyon, B., She, W. C., Luchak, J. M., Martinez, P. et al. (2000). Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*, **408** (6808), 101-106.
- Freson, K., Jaeken, J., Van Helvoirt, M., de Zegher, F., Wittevrongel, C., Thys, C. et al. (2003). Functional polymorphisms in the paternally expressed XLalphas and its cofactor ALEX decrease their mutual interaction and enhance receptor-mediated cAMP formation. *Hum.Mol.Genet.*, **12** (10), 1121-1130.
- Gatchel, J. R. et Zoghbi, H. Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: Mechanisms and common principles. *Nat.Rev.Genet.*, **6** (10), 743-755.

- Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B. S. et Stormo, G. (1981). Translational initiation in prokaryotes. *Annu.Rev.Microbiol.*, **35** 365-403.
- Goldfarb, L. G., Vasconcelos, O., Platonov, F. A., Lunkes, A., Kipnis, V., Kononova, S. et al. (1996). Unstable triplet repeat and phenotypic variability of spinocerebellar ataxia type 1. *Ann.Neurol.*, **39** (4), 500-506.
- Gorlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E. et al. (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr.Biol.*, **5** (4), 383-392.
- Guttinger, S., Muhlhauser, P., Koller-Eichhorn, R., Brennecke, J. et Kutay, U. (2004). Transportin2 functions as importin and mediates nuclear import of HuR. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101** (9), 2918-2923.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P. et al. (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, **141** (1), 129-141.
- Irwin, S., Vandelft, M., Pinchev, D., Howell, J. L., Graczyk, J., Orr, H. T. et al. (2005). RNA association and nucleocytoplasmic shuttling by ataxin-1. *J.Cell.Sci.*, **118** (Pt 1), 233-242.
- Iwamoto, F., Stadler, M., Chalupnikova, K., Oakeley, E. et Nagamine, Y. (2008). Transcription-dependent nucleolar cap localization and possible nuclear function of DExH RNA helicase RHAU. *Exp.Cell Res.*, **314** (6), 1378-1391.
- Jana, N. R., Zemskov, E. A., Wang, G. et Nukina, N. (2001). Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum.Mol.Genet.*, **10** (10), 1049-1059.
- Jen, J. C. (2008). Hereditary episodic ataxias. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1142** 250-253.
- Jin, Y., Suzuki, H., Maegawa, S., Endo, H., Sugano, S., Hashimoto, K. et al. (2003). A vertebrate RNA-binding protein fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J.*, **22** (4), 905-912.
- Jodice, C., Malaspina, P., Persichetti, F., Novelletto, A., Spadaro, M., Giunti, P. et al. (1994). Effect of trinucleotide repeat length and parental sex on phenotypic variation in spinocerebellar ataxia I. *Am.J.Hum.Genet.*, **54** (6), 959-965.
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. et Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, **311** (5981), 33-38.

- Kandalepas, P. C. et Vassar, R. (2012). Identification and biology of beta-secretase. *J.Neurochem.*, **120 Suppl 1** 55-61.
- Kang, S. et Hong, S. (2009). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 1 disease. *Mol.Cells*, **27** (6), 621-627.
- Keese, P. K. et Gibbs, A. (1992). Origins of genes: "big bang" or continuous creation? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89** (20), 9489-9493.
- Kehlenbach, R. H., Matthey, J. et Huttner, W. B. (1994). XL alpha s is a new type of G protein. *Nature*, **372** (6508), 804-809.
- Klement, I. A., Skinner, P. J., Kaytor, M. D., Yi, H., Hersch, S. M., Clark, H. B. et al. (1998). Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: Role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell*, **95** (1), 41-53.
- Klemke, M., Kehlenbach, R. H. et Huttner, W. B. (2001). Two overlapping reading frames in a single exon encode interacting proteins--a novel way of gene usage. *EMBO J.*, **20** (14), 3849-3860.
- Klemke, M., Pasolli, H. A., Kehlenbach, R. H., Offermanns, S., Schultz, G. et Huttner, W. B. (2000). Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. II. signal transduction properties. *J.Biol.Chem.*, **275** (43), 33633-33640.
- Klockgether, T. et Paulson, H. (2011). Milestones in ataxia. *Mov.Disord.*, **26** (6), 1134-1141.
- Kopan, R. et Ilagan, M. X. (2009). The canonical notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism. *Cell*, **137** (2), 216-233.
- Kovacs, E., Tompa, P., Liliom, K. et Kalmar, L. (2010). Dual coding in alternative reading frames correlates with intrinsic protein disorder. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **107** (12), 5429-5434.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44** (2), 283-292.
- Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.*, **16** (9), 2482-2492.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, **234** (2), 187-208.

- La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E. et Fischbeck, K. H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, **352** (6330), 77-79.
- Lai, E. C. (2004). Notch signaling: Control of cell communication and cell fate. *Development*, **131** (5), 965-973.
- Lam, Y. C., Bowman, A. B., Jafar-Nejad, P., Lim, J., Richman, R., Fryer, J. D. et al. (2006). ATAXIN-1 interacts with the repressor capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology. *Cell*, **127** (7), 1335-1347.
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E. et Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin alpha. *J.Biol.Chem.*, **282** (8), 5101-5105.
- Lee, B. J., Cansizoglu, A. E., Suel, K. E., Louis, T. H., Zhang, Z. et Chook, Y. M. (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell*, **126** (3), 543-558.
- Lee, Y., Fryer, J. D., Kang, H., Crespo-Barreto, J., Bowman, A. B., Gao, Y. et al. (2011). ATXN1 protein family and CIC regulate extracellular matrix remodeling and lung alveolarization. *Dev.Cell.*, **21** (4), 746-757.
- Liang, H. et Landweber, L. F. (2006). A genome-wide study of dual coding regions in human alternatively spliced genes. *Genome Res.*, **16** (2), 190-196.
- Lim, J., Crespo-Barreto, J., Jafar-Nejad, P., Bowman, A. B., Richman, R., Hill, D. E. et al. (2008). Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1. *Nature*, **452** (7188), 713-718.
- Lim, J., Hao, T., Shaw, C., Patel, A. J., Szabo, G., Rual, J. F. et al. (2006). A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of purkinje cell degeneration. *Cell*, **125** (4), 801-814.
- Lin, Y. T. et Yen, P. H. (2006). A novel nucleocytoplasmic shuttling sequence of DAZAP1, a testis-abundant RNA-binding protein. *RNA*, **12** (8), 1486-1493.
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A., Cammarota, M., Izquierdo, I. et Brentani, R. R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol.Rev.*, **88** (2), 673-728.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P. (2005) Les mécanismes moléculaires fondamentaux de la génétique. *Biologie moléculaire de la cellule / Traduit par Pierre L. Masson et Chrystelle Sanlaville Frederick M.Ausubel*. Chapitre 4, Unité 3

- Matilla, A., Koshy, B. T., Cummings, C. J., Isobe, T., Orr, H. T. et Zoghbi, H. Y. (1997). The cerebellar leucine-rich acidic nuclear protein interacts with ataxin-1. *Nature*, **389** (6654), 974-978.
- Matilla, A., Roberson, E. D., Banfi, S., Morales, J., Armstrong, D. L., Burrigh, E. N. et al. (1998). Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation. *J.Neurosci.*, **18** (14), 5508-5516.
- Matilla-Duenas, A., Goold, R. et Giunti, P. (2008). Clinical, genetic, molecular, and pathophysiological insights into spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum*, **7** (2), 106-114.
- Michael, W. M., Choi, M. et Dreyfuss, G. (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: A signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell*, **83** (3), 415-422.
- Michael, W. M., Eder, P. S. et Dreyfuss, G. (1997). The K nuclear shuttling domain: A novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.*, **16** (12), 3587-3598.
- Mizutani, A., Wang, L., Rajan, H., Vig, P. J., Alaynick, W. A., Thaler, J. P. et al. (2005). Boat, an AXH domain protein, suppresses the cytotoxicity of mutant ataxin-1. *EMBO J.*, **24** (18), 3339-3351.
- Morfini, G., Pigino, G. et Brady, S. T. (2005). Polyglutamine expansion diseases: Failing to deliver. *Trends Mol.Med.*, **11** (2), 64-70.
- Morton, S. M. et Bastian, A. J. (2004). Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist*, **10** (3), 247-259.
- Muller, S., Ledl, A. et Schmidt, D. (2004). SUMO: A regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene*, **23** (11), 1998-2008.
- Mushegian, A. R., Bassett, D. E., Jr, Boguski, M. S., Bork, P. et Koonin, E. V. (1997). Positionally cloned human disease genes: Patterns of evolutionary conservation and functional motifs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **94** (11), 5831-5836.
- Nakahata, S. et Kawamoto, S. (2005). Tissue-dependent isoforms of mammalian fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities. *Nucleic Acids Res.*, **33** (7), 2078-2089.
- Nakamoto, T. (2009). Evolution and the universality of the mechanism of initiation of protein synthesis. *Gene*, **432** (1-2), 1-6.
- Okazawa, H. (2003). Polyglutamine diseases: A transcription disorder? *Cell Mol.Life Sci.*, **60** (7), 1427-1439.

- Orr, H. T., Chung, M. Y., Banfi, S., Kwiatkowski, T. J., Jr, Servadio, A., Beaudet, A. L. et al. (1993). Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat. Genet.*, **4** (3), 221-226.
- Palleja, A., Harrington, E. D. et Bork, P. (2008). Large gene overlaps in prokaryotic genomes: Result of functional constraints or mispredictions? *BMC Genomics*, **9** 335-2164-9-335.
- Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J. et al. (2002). Early mitochondrial calcium defects in huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.*, **5** (8), 731-736.
- Pinol-Roma, S. et Dreyfuss, G. (1991). Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science*, **253** (5017), 312-314.
- Pinol-Roma, S. et Dreyfuss, G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature*, **355** (6362), 730-732.
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F. et Dreyfuss, G. (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell*, **86** (6), 985-994.
- Powell, M. L. (2010). Translational termination-reinitiation in RNA viruses. *Biochem.Soc.Trans.*, **38** (6), 1558-1564.
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A. et Sherr, C. J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, **83** (6), 993-1000.
- Rancurel, C., Khosravi, M., Dunker, A. K., Romero, P. R. et Karlin, D. (2009). Overlapping genes produce proteins with unusual sequence properties and offer insight into de novo protein creation. *J.Virol.*, **83** (20), 10719-10736.
- Ranum, L. P., Chung, M. Y., Banfi, S., Bryer, A., Schut, L. J., Ramesar, R. et al. (1994). Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type I: Evidence for familial effects on the age at onset. *Am.J.Hum.Genet.*, **55** (2), 244-252.
- Ribrioux, S., Brungger, A., Baumgarten, B., Seuwen, K. et John, M. R. (2008). Bioinformatics prediction of overlapping frameshifted translation products in mammalian transcripts. *BMC Genomics*, **9** 122-2164-9-122.
- Riley, B. E., Zoghbi, H. Y. et Orr, H. T. (2005). SUMOylation of the polyglutamine repeat protein, ataxin-1, is dependent on a functional nuclear localization signal. *J.Biol.Chem.*, **280** (23), 21942-21948.

- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. et Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64** (3), 615-623.
- Rodriguez-Lebron, E., Liu, G., Keiser, M., Behlke, M. A. et Davidson, B. L. (2013). Altered purkinje cell miRNA expression and SCA1 pathogenesis. *Neurobiol.Dis.*,
- Rogozin, I. B., Spiridonov, A. N., Sorokin, A. V., Wolf, Y. I., Jordan, I. K., Tatusov, R. L. et al. (2002). Purifying and directional selection in overlapping prokaryotic genes. *Trends Genet.*, **18** (5), 228-232.
- Sabath, N., Graur, D. et Landan, G. (2008). Same-strand overlapping genes in bacteria: Compositional determinants of phase bias. *Biol.Direct*, **3** 36-6150-3-36.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. et Greenberg, M. E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, **95** (1), 55-66.
- Schols, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T. et Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: Clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.*, **3** (5), 291-304.
- Seidel, K., Siswanto, S., Brunt, E. R., den Dunnen, W., Korf, H. W. et Rub, U. (2012). Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol.*, **124** (1), 1-21.
- Serra, H. G., Duvick, L., Zu, T., Carlson, K., Stevens, S., Jorgensen, N. et al. (2006). RORalpha-mediated purkinje cell development determines disease severity in adult SCA1 mice. *Cell*, **127** (4), 697-708.
- Shao, J. et Diamond, M. I. (2007). Polyglutamine diseases: Emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum.Mol.Genet.*, **16 Spec No. 2** R115-23.
- Shaw, D. C., Walker, J. E., Northrop, F. D., Barrell, B. G., Godson, G. N. et Fiddes, J. C. (1978). Gene K, a new overlapping gene in bacteriophage G4. *Nature*, **272** (5653), 510-515.
- Shine, J. et Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of escherichia coli 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **71** (4), 1342-1346.
- Shine, J. et Dalgarno, L. (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature*, **254** (5495), 34-38.
- Sims, R. J.,3rd, Mandal, S. S. et Reinberg, D. (2004). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **16** (3), 263-271.

- Siomi, H. et Dreyfuss, G. (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J.Cell Biol.*, **129** (3), 551-560.
- Skinner, P. J., Koshy, B. T., Cummings, C. J., Klement, I. A., Helin, K., Servadio, A. et al. (1997). Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature*, **389** (6654), 971-974.
- Stewart, M., Baker, R. P., Bayliss, R., Clayton, L., Grant, R. P., Littlewood, T. et al. (2001). Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett.*, **498** (2-3), 145-149.
- Szebenyi, G., Morfini, G. A., Babcock, A., Gould, M., Selkoe, K., Stenoien, D. L. et al. (2003). Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. *Neuron*, **40** (1), 41-52.
- Takahashi, T., Katada, S. et Onodera, O. (2010). Polyglutamine diseases: Where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J.Mol.Cell.Biol.*, **2** (4), 180-191.
- Tang, T. S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I. G., Sugimori, M., Llinas, R. et al. (2005). Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in huntington's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **102** (7), 2602-2607.
- Thinakaran, G. et Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J.Biol.Chem.*, **283** (44), 29615-29619.
- Tong, X., Gui, H., Jin, F., Heck, B. W., Lin, P., Ma, J. et al. (2011). Ataxin-1 and brother of ataxin-1 are components of the notch signalling pathway. *EMBO Rep.*, **12** (5), 428-435.
- Torresi, J. (2002). The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J.Clin.Virol.*, **25** (2), 97-106.
- Tran, E. J., Bolger, T. A. et Wenthe, S. R. (2007). SnapShot: Nuclear transport. *Cell*, **131** (2), 420.
- Tsai, C. C., Kao, H. Y., Mitzutani, A., Banayo, E., Rajan, H., McKeown, M. et al. (2004). Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101** (12), 4047-4052.
- Tsuda, H., Jafar-Nejad, H., Patel, A. J., Sun, Y., Chen, H. K., Rose, M. F. et al. (2005). The AXH domain of ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with gfi-1/Senseless proteins. *Cell*, **122** (4), 633-644.
- Underwood, J. G., Boutz, P. L., Dougherty, J. D., Stoilov, P. et Black, D. L. (2005). Homologues of the caenorhabditis elegans fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals. *Mol.Cell.Biol.*, **25** (22), 10005-10016.

- Vanderperre, B., Lucier, J. F. et Roucou, X. (2012). HAItORF: A database of predicted out-of-frame alternative open reading frames in human. *Database (Oxford)*, **2012** bas025.
- Vanderperre, B., Staskevicius, A. B., Tremblay, G., McCoy, M., O'Neill, M. A., Cashman, N. R. et al. (2011). An overlapping reading frame in the PRNP gene encodes a novel polypeptide distinct from the prion protein. *FASEB J.*, **25** (7), 2373-2386.
- Watase, K., Weeber, E. J., Xu, B., Antalffy, B., Yuva-Paylor, L., Hashimoto, K. et al. (2002). A long CAG repeat in the mouse Scal locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron*, **34** (6), 905-919.
- Xu, D., Farmer, A. et Chook, Y. M. (2010a). Recognition of nuclear targeting signals by karyopherin-beta proteins. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **20** (6), 782-790.
- Xu, H., Wang, P., Fu, Y., Zheng, Y., Tang, Q., Si, L. et al. (2010b). Length of the ORF, position of the first AUG and the kozak motif are important factors in potential dual-coding transcripts. *Cell Res.*, **20** (4), 445-457.
- Yee, A. S., Paulson, E. K., McDevitt, M. A., Rieger-Christ, K., Summerhayes, I., Berasi, S. P. et al. (2004). The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: Unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene*, **336** (1), 1-13.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. et Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, **107** (7), 881-891.
- Yue, S., Serra, H. G., Zoghbi, H. Y. et Orr, H. T. (2001). The spinocerebellar ataxia type 1 protein, ataxin-1, has RNA-binding activity that is inversely affected by the length of its polyglutamine tract. *Hum.Mol.Genet.*, **10** (1), 25-30.
- Zaaijer, H. L., van Hemert, F. J., Koppelman, M. H. et Lukashov, V. V. (2007). Independent evolution of overlapping polymerase and surface protein genes of hepatitis B virus. *J.Gen.Virol.*, **88** (Pt 8), 2137-2143.
- Zhang, C., Browne, A., Child, D., Divito, J. R., Stevenson, J. A. et Tanzi, R. E. (2010). Loss of function of ATXN1 increases amyloid beta-protein levels by potentiating beta-secretase processing of beta-amyloid precursor protein. *J.Biol.Chem.*, **285** (12), 8515-8526.
- Zoghbi, H. Y. (2013). The basics of translation. *Science*, **339** (6117), 250.
- Zoghbi, H. Y. et Orr, H. T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu.Rev.Neurosci.*, **23** 217-247.
- Zoghbi, H. Y. et Orr, H. T. (2009). Pathogenic mechanisms of a polyglutamine-mediated neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia type 1. *J.Biol.Chem.*, **284** (12), 7425-7429.