

Analyse fonctionnelle du complexe hNup107-160 des pores nucléaires en mitose

Imène Bouhlel

► **To cite this version:**

Imène Bouhlel. Analyse fonctionnelle du complexe hNup107-160 des pores nucléaires en mitose. Biologie cellulaire. 2011. <hal-01478588>

HAL Id: hal-01478588

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01478588>

Submitted on 28 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation Nationale
et de la Recherche

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la vie et de la terre

Mémoire Présenté le 31 Mai 2011 par

Imene BOUHLEL

en vue de l'obtention du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

Analyse fonctionnelle du complexe hNup107-160 des pores nucléaires en mitose

Devant le Jury composé de :

Marie-Madeleine GIRAUD-GUILLE – Présidente

Sébastien HUET – Rapporteur

Vincent GALY – Examineur

Maité COPPEY-MOISAN – Examineur

Xavier RONOT – Examineur

Valérie DOYE – Examineur

Laboratoire de Dynamique cellulaire:

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Directeur du Laboratoire CaCyS de l'EPHE,

FRE 3405 AGIM, 38706 La Tronche cedex

Directeur : Xavier RONOT

Pores Nucléaires : Transport et Cycle Cellulaire

Institut Jacques Monod -UMR 7592 CNRS -

Université Paris Diderot-Paris7,

15 rue Hélène Brion, 75205 Paris Cedex 13

Directeur : Valérie DOYE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

Analyse fonctionnelle du complexe hNup107-160 des pores nucléaires en mitose.

Présenté par Imène BOUHLEL

Résumé

Chez les eucaryotes, le noyau renferme le matériel génétique de la cellule. Il est isolé du reste de la cellule par une double bicouche lipidique, l'enveloppe nucléaire (EN). Les échanges entre le noyau et le cytoplasme se font par l'intermédiaire des pores nucléaires ou NPCs (pour Nuclear Pore Complexes).

Les NPCs sont composés d'une trentaine de protéines appelées nucléoporines (ou Nups) organisées en sous complexes. Le complexe hNup107-160 est le sous complexe majeur, par sa taille, des pores nucléaires. Ce complexe est conservé au cours de l'évolution, malgré une certaine variabilité entre espèces. Il est composé de neuf protéines distinctes (hNup160, hNup133, hNup107, hNup96, hNup85, hNup43, hNup37, hSec13 et hSeh1) et fait l'objet des études menées au laboratoire.

En interphase, le complexe hNup107-160, est localisé de façon symétrique sur les faces cytoplasmique et nucléaire des pores nucléaires. A ce stade, il est impliqué dans l'export des ARN messagers et dans la biogénèse *de novo* des NPCs.

Chez les vertébrés, la mitose est dite ouverte et nécessite la rupture de l'EN et le désassemblage des NPCs. En fin de mitose, il y a reformation de l'EN autour des chromosomes des deux cellules filles. A cette étape, le complexe hNup107-160 est essentiel au réassemblage des NPCs. Durant la mitose, une fraction du complexe hNup107-160 est localisé aux kinétochores, structures impliquées dans l'ancrage des microtubules aux centromères des chromosomes mitotiques. Il a été démontré dans le laboratoire, que le domaine N-terminal de hNup133 interagit avec CENP-F, une protéine des kinétochores, spécifiquement localisé à l'EN en prophase.

Dans le cadre de mes travaux, je me suis intéressée d'une part, au rôle de la protéine hNup133 lors de la transition G2/M. Ainsi, j'ai entrepris la production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine N-terminal de hNup133, impliqué dans l'interaction avec CENP-F. J'ai aussi contribué à montrer que cette nucléoporine recrute CENP-F à l'EN en prophase. Cette interaction participe à la localisation de NudE/EL et la dynéine-dynactine à l'EN. De plus, ce réseau moléculaire, participe à l'ancrage des centrosomes à l'EN. Enfin, nous avons aussi démontré que ce réseau agit de façon indépendante des protéines RanBP2/BiCD2, récemment impliquées dans le positionnement des centrosomes à l'EN en prophase.

D'autre part, j'ai étudié la dynamique des membres du complexe hNup107-160 en mitose, en utilisant la méthode de la FCCS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy). Cette technique permet de suivre *in vivo* la diffusion simultanée de deux protéines étiquetées par des fluorochromes différents. Lors de cette étude, j'ai d'abord validé l'application de la FLCS (Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy) aux signaux de FCCS dans le but d'éliminer le passage de signal de la GFP dans le détecteur de la mCherry. Une fois la technique validée pour l'interaction entre hNup107 et hNup133 en mitose et en interphase, j'ai entrepris l'analyse des interactions entre hNup107 et les autres membres du complexe.

Mots-clés : Complexes de Pores nucléaires (NPCs), nucléoporine, cycle cellulaire, mitose, centrosomes, culture cellulaire, microscopie à Fluorescence, FCCS

Introduction générale	5
A. Rôle principal des NPCs : Le transport	6
A.1. La famille des karyophérines.....	6
A.2. Rôle de Ran-GTP /GDP dans le transport.....	7
A.3. L'export des ARNs.....	7
B. La structure des pores nucléaires	8
B.1 Architecture du pore nucléaire.....	8
B.2. Les différents motifs structuraux des nucléoporines.....	9
B.2.1. Les motifs FG.....	9
B.2.2. Les domaines transmembranaires.....	10
B.2.3. Les motifs coiled-coil.....	10
B.2.4. Les motifs β -propeller et α -solénoïde.....	10
B.2.5. Les motifs ALPS.....	11
B.3. Le complexe Nup107-160.....	11
C. Les NPCs au cours du cycle cellulaire	12
C.1. Généralités sur le cycle cellulaire.....	12
C.2. Réassemblage des NPCs en fin de mitose.....	13
C.3. Assemblage des NPCs durant l'interphase.....	14
C.4. Désassemblage des NPCs en prophase.....	15
D. Nups et mitose	16
D.1. RAE1-Nup98 et mitose.....	16
D.2. Le complexe RRSU durant la mitose.....	16
D.3. Le complexe Nup107-160 durant la mitose.....	17
Contexte du projet	19
A. Rôle de hNup133 dans l'ancrage de CENP-F, NudE/EL, la dynéine-dynactine à l'EN en prophase.....	19
B. Etude de la dynamique du complexe hNup107-160 en mitose par FCCS.....	20
Bibliographie	22

Liste des Abreviations

ADN	Acide Désoxyribonucléotique
ADNc	ADN complémentaire
ALPS	Amphipatic Lipid Packing Sensor
ARN	Acide Ribonucléotique
ARNm	ARN messenger
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole,dilactate
EN	Enveloppe Nucléaire
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FCCS	Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy
FG	Phenylalanine-Glycine
GDP	Guanosine di-Phosphate
GTP	Guanosine tri-Phosphate
G2/M	G2/Mitose
h	human
HIV	Human Immunodeficient Virus
HRP	Horse Radish Peroxydase
IF	Imuunofluorescence
INM	Inner Nuclear Membrane
IP	Immunoprécipitation
kDA	kilodaltons
mAb	monoclonal Antibody
mRNP	Messenger ribonucleoparticule
NEBD	Nuclear Envelope Breakdown
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localisation Signal
NPCs	Nuclear Pore Complexes
NTF	Nuclear Transport Factor
Nup	Nucléoporine
ONM	Outer Nuclear Membrane
PAF	Paraformaldéhyde
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pom	Pore membrane protein
RanBP1	Ran Binding Protein
RanGAP	Ran GTPase Activating Protein
RanGEF	Ran Guanine nucleotide Exchange Factor
RE	Réticulum Endoplasmique
RSSU	RanBP2-RanGAP1 :SUMO :Ubc9 complex
Scr	Scramble
siRNA	Small interfering RNA
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
WB	Western Blot
WT	Wild-Type

Introduction générale :

L'acquisition de membranes et de compartiments intranucléaires est une des caractéristiques principales des cellules eucaryotes. L'un de ces compartiments, le noyau, une des premières structures intracellulaires découvertes et a été largement décrit par Franz Bauer en 1802 et plus tard par Robert Brown en 1831 (pour revue voir Dundr and Misteli, 2001).

Le noyau est entouré d'une enveloppe nucléaire (EN) composée par une double bicouche lipidique, les membranes interne (INM pour Inner Nuclear Membrane) et externe (ou ONM pour Outer Nuclear Membrane) (D'Angelo et al., 2006) et contient la plus grande partie de l'ADN cellulaire. Les échanges entre le noyau et le cytoplasme sont médiés par des structures situées aux points de fusion de l'EN. Ces structures sont appelées pores nucléaires ou NPCs (pour Nuclear Pores Complexes) et sont composées d'une trentaine de protéines appelées nucléoporines (ou Nups).

La compartimentation cellulaire permet aux cellules eucaryotes de réguler temporellement et spatialement de multiples évènements cellulaires : la transcription et la réplication des gènes sont intranucléaires alors que la traduction des ARNm en protéines est cytoplasmique. De ce fait, le transport est le rôle principal des NPCs.

A. Rôle principal des NPCs : Le transport :

Les NPCs sont perméables aux petites molécules d'une taille inférieure à 40 kDa, mais régulent le transport des molécules de plus grande taille présentant des signaux d'export ou d'import. Les signaux les plus classiques sont les NLS (Nuclear Localisation Signal, pour les protéines à importer) riches en lysines et arginines, et les NES (Nuclear Export Signal) riche en leucines. Cependant, certaines protéines, du fait des différents rôles qu'elle peuvent jouer dans la cellule, peuvent posséder d'autres types de signaux d'import et d'export dans leur séquence (pour revue voir Terry and Went, 2007).

Le transport nucléo-cytoplasmique requiert la participation des facteurs de transport nucléaire (NTFs pour Nuclear Transport Factors) solubles qui font, pour la plupart, partie de la famille des karyophérines. Il se déroule en trois étapes : (i) les NTFs reconnaissent et lient les macromolécules à transporter, (ii) le complexe (cargos) formé est transloqué à travers le canal central des NPCs grâce aux interactions avec certaines nucléoporines; pour finalement (iii) se dissocier une fois le compartiment cible (nucléoplasme ou cytoplasme) atteint (voir 2).

A.1. La famille des karyophérines :

Il existe plus d'une vingtaine de membres appartenant à la famille des karyophérines chez les métazoaires. Les facteurs de la famille des karyophérines sont caractérisés par leur capacité à lier divers substrats d'import ou d'export à motifs spécifiques (NLS, NES...) et à interagir avec une famille de nucléoporines contenant des motifs FG (voir chapitre B.2.1) et RanGTP (voir chapitre A.2).

On peut distinguer deux sortes karyophérines : les importines et les exportines, même si certaines karyophérines peuvent médier à la fois l'import et l'export (Yoshida and Blobel, 2001).

La voie d'import la plus classique est la voie de l'importine- β . Les séquences NLS des protéines à importer sont reconnues par l'importine- α , qui à son tour lie l'importine- β au niveau de son domaine IBB (pour Importin β -Binding domain). Dans ce cas, l'importine- α joue un rôle d'adaptateur entre le substrat et l'importine- β (Yoneda, 2000). Cependant, la karyophérine β ou d'autres membres de cette famille sont capables d'interagir directement (sans l'intervention d'adaptateurs) avec d'autres substrats d'import possédant des signaux différents des NLS classiques.

La voie d'export des protéines la mieux caractérisée est la voie dépendante de l'exportine Crm1 qui reconnaît les NES typiques. Il faut noter que dans certains cas, Crm1 peut avoir besoin de certains cofacteurs comme RanBP3 ou RanBP1 pour se lier aux protéines possédant un signal NES, ou aux Nups-FG.

A.2. Rôle de Ran-GTP /GDP dans le transport :

Les karyophérines ont la capacité de lier la petite Ran GTPase sous sa forme GTP. La liaison de Ran au GTP ou GDP régule le transport. En effet, la forme RanGTP est essentiellement nucléaire et participe à la dissociation des complexes d'import en liant les NTFs. Le cycle de Ran est régulé par deux types d'enzymes ; dans le cytoplasme, RanGAP1 hydrolyse RanGTP en RanGDP alors que dans le noyau RanGEF transforme RanGDP en RanGTP. Pour l'export nucléaire, RanGTP augmente l'affinité des exportines avec leur cargo et favorise donc l'assemblage des complexes d'export dans le noyau. L'hydrolyse de RanGTP en RanGDP à lieu une fois le cargo arrivé dans le cytoplasme, permettant ainsi la dissociation du cargo (pour revue voir Kohler and Hurt, 2007).

L'import et l'export des macromolécules ne nécessitent pas d'énergie autre que celle apportée par RanGTP mis à part peut-être pour les très gros cargos (Lyman et al., 2002). Les facteurs de transport et RanGDP sont recyclés afin d'être réutilisés. Ainsi 1000 événements de translocation peuvent avoir lieu par seconde et par pore (Yang et al., 2004).

A.3. L'export des ARNs :

Les différents types d'ARNs cellulaires sont transcrits dans le noyau et doivent d'être exportés dans le cytoplasme afin de remplir leurs fonctions. Différents mécanismes d'export existent selon le type d'ARN.

Dans certains cas, l'export des ARNs implique des karyophérines. Ainsi, une exportine spécifique, l'exportine-t, a été impliquée dans l'export des ARN de transfert (ARNt) (Rodriguez et al., 2004). L'exportine-5 quant à elle est impliquée dans l'export des microARNs (miARN).

Par ailleurs, la karyophérine d'export Crm1 est aussi impliqué dans l'export de certains ARNs, comme par exemple dans l'export des UsnARNs (Uridin-rich Small nuclear RNAs ; (Simos et al., 2002)). Les ARNs ribosomiaux (ARNr) interagissent dans le nucléole avec des protéines ribosomiales et des facteurs d'assemblage pour former des sous unités pré-ribosomiales qui sont ensuite exportées dans le cytoplasme où s'achève leur assemblage. Le mécanisme exact de transport des sous unités ribosomiales reste encore mal caractérisé.

Cependant, il semblerait que plusieurs facteurs d'exports soient nécessaires à la translocation des sous unités ribosomales à travers les NPCs. Parmi ces facteurs on retrouve Crm1, premier facteur d'export des ARNr identifié (Fornerod and Ohno, 2002 ;Fukuda et al., 1997 ;Stade et al., 1997).

Crm1 a aussi été impliqué dans l'export de certains ARN messagers (ARNm), comme par exemple celui de l'ARNm non épissé du virus HIV-1. Cet export se fait en présence de la protéine Rev (protéine virale possédant un NES typique). Le complexe ARN pré-messager de HIV-REV-Crm1 lie alors RanGTP et est exporté au travers des NPCs.

Cependant l'export de la majorité des ARNm est médié par des transporteurs qui ne font pas partie de la famille des karyophérines et de façon indépendante de Ran. La voie d'export des ARNm la mieux caractérisée est la voie MEX67/TAP (MEX67 chez la levure et TAP chez les métazoaires). Ce facteur interagit avec l'ARNm via l'adaptateur Yra1/ALY et possède, comme les karyophérines, la capacité d'interagir avec les Nups-FG et de passer au travers des NPCs. La directionnalité du transport des ARNs est apportée par une hélicase, Dbp5, associée à la face cytoplasmique des NPCs et potentiellement impliquée dans le remodelage des mRNPs et la dissociation de MEX67.

L'export des ARNm est lié à d'autres évènements post-transcriptionnels ; seuls les ARNm matures sont exportés sous formes de complexes appelés mRNP (pour Messenger ribonucleoparticule, Dreyfuss et al., 2002). Il existe aussi des points de contrôle de la qualité des ARNm exportés situés au panier des NPCs, et seuls les ARNm correctement maturés peuvent être exportés.

B. La structure des pores nucléaires :

B.1 Architecture du pore nucléaire :

Depuis leur découverte pendant les années 50 par Callan et Tomlin grâce à la microscopie électronique, les NPCs ont beaucoup été étudiés. La structure des NPCs des oocytes (cellules présentant des noyaux géants) de différentes espèces avait déjà été décrite en 1967 (Gall, 1967) non plus comme circulaire mais comme présentant une symétrie octogonale. Depuis, l'élucidation de la composition des NPCs a été permise grâce à différentes techniques de génétique, d'imagerie et surtout grâce aux approches de protéomique.

Malgré quelques différences selon les espèces, l'architecture des NPCs a été remarquablement conservée au cours de l'évolution.

Les NPCs sont constitués d'un anneau membranaire, de quatre anneaux (deux de chaque côté de l'enveloppe) connectés à une structure centrale formée de protéines solubles. Cette structure est prolongée par des filaments cytoplasmiques et nucléaires. Du côté cytoplasmique les filaments ne présentent pas de structure particulière, alors que du côté nucléaire, les filaments se rejoignent pour former un cercle distal dit en panier. Ces filaments mesurent environ 120 nm chez les vertébrés.

Le pore nucléaire représente une des plus grosses structures macromoléculaires dans une cellule interphasique, avec une masse qui varie entre 65 MDa chez la levure et 125 MDa chez les vertébrés (Rout et al., 2000 ; Stoffler et al., 1999 ; Cronshaw et al., 2002 ; Reichelt et al., 1990). Malgré cette masse importante, il n'est composé que d'une trentaine de protéines différentes, appelées nucléoporines ou Nups (pour comparaison, un ribosome de 4MDa est composé d'environ 75 protéines). La plupart des Nups sont nommées NupX ou X est leur poids moléculaire et sont assemblées en sous complexes structuraux.

Les nucléoporines et les complexes correspondants sont présents en 16 copies par NPC pour les Nups symétriques (présentes des côtés cytoplasmique et nucléaire de l'EN) ou en 8 copies pour les Nups asymétriques, formant les structures cytoplasmiques ou nucléaires.

On peut définir trois catégories principales de Nups ; (i) les Nups transmembranaires qui permettent l'ancrage des NPCs à l'EN, (ii) les Nups possédant un motif FG et qui

B.2. Les différents motifs structuraux des nucléoporines :

Les Nups sont caractérisées par la présence de motifs et domaines différents ; les domaines β -propeller, α -solénoïde, motifs FG (répétitions de séquences phénylalanine glycine), domaines coiled-coil et domaines transmembranaires.

B.2.1. Les motifs FG

Les motifs à répétition de phénylalanine glycine (FG), sous forme GFLG, FxFG, PxFG ou SxFG séparés en moyenne par 5 à 30 acides aminés hydrophiles sont retrouvés dans près d'un tiers des nucléoporines, appelés Nups-FG. Les Nups-FG ne possèdent pas de structure tridimensionnelle formant ainsi des polypeptides flexibles capables d'adapter différentes conformations (Denning et al., 2003).

Les Nups-FG sont majoritaires dans le canal central du NPC (Nup98, Nup62, Nup45, Nup54 et Nup58) et s'étendent jusque dans les filaments cytoplasmiques (Nup358, Nup214 et hCG1) et nucléoplasmiques (Nup153 et Nup50). Cette localisation particulière favorise les interactions de ces Nups avec les karyophérines (pour revue voir Terry and Went, 2009). En revanche, ces motifs ne sont pas essentiels à la formation des NPCs ; les délétions de domaines FG des nucléoporines n'induisent de défauts de transport importants que si la majorité des motifs FG de ces Nups est délétée (Walther et al., 2002 ; Zeitler and Weis, 2004 ; Strawn et al., 2004).

B.2.2. Les domaines transmembranaires :

D'autres Nups possèdent des hélices- α transmembranaires et sont généralement appelées PomX pour « Pore membrane Protein de X kDa ». Elles sont insérées dans l'EN au niveau de la membrane du pore et sont supposées ancrer la structure du pore dans la bicouche lipidique. Chez les mammifères, trois nucléoporines transmembranaires existent : Pom121, gp210 et Ndc1, cette dernière étant la seule conservée au cours de l'évolution (Madrid et al., 2006 ; Stavru et al., 2006). Récemment une quatrième nucléoporine transmembranaire a été identifiée chez la levure, il s'agit de Pom33 (Chadrin et al., 2010). Dans les cellules humaines, TMEM33, homologue de Pom33 a été localisée à l'EN mais sa localisation aux NPCs n'a pas encore été démontrée.

B.2.3. Les motifs coiled-coil :

Certaines Nups présentent une structure secondaire en hélice- α , avec une distribution en heptade des acides aminés hydrophobes et chargés, permettant des interactions homologues ou hétérologues de type « coiled-coil » (hélice super enroulée). Des domaines coiled-coil étendus sont retrouvés dans le domaine N-terminal de la nucléoporine du panier nucléaire, Tpr. Il a été montré que ce motif coiled-coil de Tpr est requis pour son homo-dimérisation et pour la formation du panier nucléaire (Hase et al., 2001).

B.2.4. Les motifs β -propeller et α -solénoïde :

La structure centrale des NPCs est constituée essentiellement de Nups présentant seulement deux types de motifs structuraux : des β -propellers et des α -solénoïdes. Le motif β -propeller contient plusieurs sous-unités disposées radialement autour d'un axe central, chacune étant composée de quatre feuillets- β antiparallèles. Le motif α -solénoïde est

composé de nombreuses paires antiparallèles d'hélices- α empilées sur elles-mêmes formant un solénoïde. Ainsi, le β -propeller forme une région globulaire, probablement dédiée à l'interaction avec d'autres protéines, alors que l' α -solénoïde forme un bras allongé et courbé. Ainsi, beaucoup de Nups se composent de l'un ou l'autre de ces motifs ou d'une association des deux (Devos et al., 2006). Certaines Nups comme hNup133 ou hNup160 contiennent dans leur séquence les deux motifs. D'autres Nups, comme hNup43, hNup37 et hSeh1 sont formées exclusivement de domaines β -propeller. Malgré des variations dans les séquences primaires des Nups entre la levure et les vertébrés, ces domaines structuraux sont bien conservés (Devos et al., 2006).

B.2.5. Les motifs ALPS :

Un autre motif structural a été récemment caractérisé, le motif ALPS (Amphipathic Lipid Packing Sensor) commun aux protéines favorisant l'assemblage du manteau COPI (ArfGAP1) et à certaines Nups (dont hNup133) (Bigay et al., 2005 ; Mesmin et al., 2007 ; Drin et al., 2007). Ce motif non structuré en solution peut former une hélice amphipatique capable de s'insérer dans les membranes à fortes courbures. Cette hélice, est différente des hélices classiques qui lient la membrane, car elle est riche en sérine et thréonine et pauvre en acides aminés chargés. Ainsi, les hélices du motif ALPS s'insèrent entre les lipides uniquement lorsque la courbure induit un écartement suffisant des têtes lipidiques (Drin et al., 2009). Récemment ce domaine a été impliqué dans la biogenèse des NPCs en interphase (Doucet et al., 2010 voir chapitre C.3).

B.3. Le complexe hNup107-160

Le complexe hNup107-160, composé de neuf protéines chez les vertébrés (hNup160, hNup133, hNup107, hNup96, hNup85, hNup43, hNup37, hSeh1 et Sec13) est le sous complexe macromoléculaire majeur du pore nucléaire (Vasu et al., 2001 ; Belgareh et al., 2001). Même s'il est conservé chez tous les eucaryotes, certaines variations existent selon les espèces, comme par exemple l'absence de hNup37 et hNup43 chez la levure *S. cerevisiae*. La majorité des membres du complexe hNup107-160 comporte des motifs β -propeller dans leur séquence et certaines (comme hNup133 ou hNup160) comportent des motifs β -propeller et α -solénoïdes.

Des observations en microscopie électronique ont montré que les membres du complexe scNup84 (homologue du complexe hNup107-160 chez *S. cerevisiae*) s'associent en formant une structure dite en Y (Lutzmann et al., 2002). Ces dernières années, l'avancement

dans l'élucidation de la structure cristallographique des membres du complexe scNup84/hNup107-160 a permis d'établir un modèle structural plus détaillé (Kampmann and Blobel, 2009 ; Nagy et al., 2009).

Des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont montré que pendant l'interphase, le complexe hNup107-160, qui est situé du côté nucléaire et cytoplasmique de l'enveloppe, constitue une structure stable des NPCs (Belgareh et al., 2001 ; Rabut et al., 2004). Des expériences ont montré que chez les vertébrés, les NPCs ne sont pas mobiles dans le plan de l'enveloppe (Daigle et al., 2001). Dans ce cadre l'absence d'échanges entre les différentes régions blanchies, indique que le complexe hNup107-160 n'est pas capable de s'échanger entre différents NPCs (alors que certaines Nups comme hNup98 ou hNup153 sont très mobiles), (Rabut et al., 2004).

Récemment, une nouvelle protéine, ELYS, a été identifiée par des expériences d'immuno-précipitation comme partenaire du complexe hNup107-160 dans les cellules humaines ou dans des extraits cellulaires de *Xenope*. ELYS est l'orthologue de MEL28/C38D4.3 chez *C. elegans* ou du gène *flo* codé chez le poisson zèbre, mais n'existe pas chez *S. cerevisiae*.

Chez les vertébrés, le complexe hNup107-160 participe à différentes fonctions dans la cellule notamment à l'export des ARN messagers en interphase, l'assemblage des pores nucléaires ou à la progression dans la mitose (voir chapitre C.2).

C. Les NPCs au cours du cycle cellulaire :

C.1. Généralités sur le cycle cellulaire:

Lors de la division, la cellule doit séparer le matériel génétique dupliqué lors de la phase S. Pour le bon déroulement de la division, plusieurs structures spécifiques de la mitose sont nécessaires.

Les centrosomes sont des acteurs clés de la mitose. Ces structures, formées par deux centrioles entourés par du matériel pericentriolaire, constituent des centres de nucléation et d'ancrage des microtubules. Au cours de l'interphase, la cellule duplique son centrosome en effectuant une copie de chaque centriole. Les centrosomes sont associés à l'EN et le restent jusqu'en prophase. Lors de la prophase, les deux centrosomes se séparent et migrent afin de former une structure clé de la mitose : le fuseau mitotique.

Chez les vertébrés, la mitose est dite ouverte. En effet, la formation du fuseau mitotique nécessite la rupture de l'enveloppe nucléaire ou NEBD (pour Nuclear Envelope Breakdown). A cette étape, les NPCs et la lamina (fibres structurales associées à l'EN) se désassemblent (voir chapitre C.4) et les membranes de l'EN se résorbe dans le réticulum endoplasmique (RE). Cette rupture permet aux microtubules d'accéder aux chromosomes.

L'attachement des microtubules aux chromosomes mitotiques s'effectue au niveau des kinétochores, structures protéiques qui s'assemblent au niveau des centromères des chromosomes lors de la mitose.

Les kinétochores jouent un rôle important dans la séparation des chromatides sœurs en anaphase, mais sont aussi impliqués dans le point de contrôle de sortie de mitose, le « checkpoint » mitotique, qui inhibe la ségrégation des chromosomes tant que ces derniers ne sont pas tous alignés sur la plaque métaphasique et correctement ancrés aux microtubules. A cette étape, parmi les différents facteurs impliqués, les protéines Mad1 et Mad2 jouent un rôle crucial. En effet, elles forment un complexe qui interagit avec les kinétochores libres (non attachés aux microtubules) et séquestrent la kinase Cdc20, inhibant ainsi l'activation du complexe APC (Anaphase Promoting Complex).

En télophase, il y a reformation de l'enveloppe nucléaire et des NPCs autour de la chromatine de chaque cellule fille (détaillé dans la partie C.2). Cependant, il y aussi un assemblage des NPCs durant l'interphase, il s'agit de la biogénèse *de novo*, au moment où la cellule double le nombre de ses NPCs en préparation à une nouvelle division (détaillé dans la partie C.3). Dans les organismes à mitoses fermées où l'EN ne se désassemble pas (comme par exemple chez la levure *S. cerevisiae*), la biogénèse *de novo* est la seule voie d'assemblage des NPCs.

Bien que ces deux événements de biogénèse conduisent à l'assemblage des NPCs, les mécanismes qui les régissent sont totalement différents. En effet, lors de l'assemblage post mitotique, les NPCs se réassemblent en même temps que la formation de l'EN à partir de nucléoporines dispersées dans le cytoplasme mitotique, alors qu'en interphase, l'assemblage a lieu sur une enveloppe intacte à partir de nucléoporines nouvellement synthétisées.

C.2. Réassemblage des NPCs en fin de mitose :

A la fin de la mitose, des membranes du réticulum endoplasmique sont recrutées afin de reformer l'EN autour des chromosomes des deux cellules filles. L'assemblage des NPCs a lieu en parallèle selon un processus ordonné (Dultz et al., 2008 ; Anderson and Hetzer, 2008 ;

Walther et al., 2003). La protéine ELYS/MEL28 est un acteur clé dans la reformation post mitotique des NPCs. En effet, ELYS s'associe à la chromatine via son domaine de liaison à l'ADN et recrute le complexe hNup107-160 (Belgareh et al., 2001 ; Franz et al., 2007 ; Galy et al., 2006 ; Gillespie et al., 2007). Des expériences d'interférence par ARN (siRNA) ainsi que des approches *in vitro* à partir d'extraits d'œufs de *Xenopus*, ont montré que le complexe hNup107-160 est essentiel à l'assemblage post mitotique des NPCs (Boehmer et al., 2003 ; Harel et al., 2003 ; Walther et al., 2003).

Ensuite des vésicules membranaires contenant les nucléoporines transmembranaires Pom121 et Ndc1 (Antonin et al., 2005 ; Rasala et al., 2008) sont recrutées au niveau des complexes préformés. Puis, les nucléoporines hNup155 et hNup53/35 sont incorporées afin de faciliter la fusion des membranes issues du RE (Antonin et al., 2008). Enfin, les nucléoporines des structures périphériques et les Nups-FG sont incorporées aux NPCs afin de finaliser l'assemblage.

C.3. Assemblage des NPCs durant l'interphase :

Pendant longtemps, il a été admis que l'assemblage des NPCs durant l'interphase était spécifique à la phase S (Maul et al., 1972). Depuis il a été montré que ce processus s'étendait de la phase G1 jusqu'en G2 (Maeshima et al., 2006 ; Winey et al., 1997). Des observations au microscope électronique d'embryons de drosophile ont montré que les nouveaux NPCs sont formés dans des régions de l'EN où il n'existe pas de NPCs (Kiseleva et al., 2001). Récemment, D'Angelo et ses collaborateurs, ont montré que l'assemblage des NPCs en interphase a lieu *de novo* sur les deux côtés de l'enveloppe nucléaire intacte, et que ce mécanisme nécessite au moins la présence de RanGTP, de l'importine- β et du complexe hNup107-160 (D'Angelo et al., 2006). Cette étude laisse émerger la nouvelle hypothèse de la formation de précomplexes qui seront ensuite incorporés à l'enveloppe nucléaire.

Une récente étude a montré que dans les cellules humaines, Pom121 est nécessaire dans les étapes précoces de l'assemblage des NPCs en interphase. De plus, le domaine ALPS de la protéine hNup133 joue un rôle spécifique en interphase dans le recrutement du complexe hNup107-160 (Doucet et al., 2010), alors qu'il n'est pas requis dans l'assemblage des pores durant la mitose. Inversement, ELYS ne semble pas requis pour l'assemblage durant l'interphase alors qu'il est essentiel pour l'assemblage post mitotique (Doucet et al., 2010).

Ces informations permettent d'établir le mécanisme de formation des NPCs en interphase. Ce mécanisme débute par le recrutement des deux côtés de l'EN des nucléoporines transmembranaires et les composants formants les anneaux internes des NPCs. Le complexe scNup84 (homologue de hNup107-160) est ensuite recruté des deux côtés de l'EN, sa fusion avec cette dernière met en place une structure stable de pré-pore. Le recrutement des nucléoporines de liaison et des Nups-FG se fait en dernier, finalisant la formation du pore nucléaire (pour revue voir Fernandez-Martinez and Rout, 2009).

C.4. Désassemblage des NPCs en prophase:

Les cellules de vertébrés sont caractérisées par une mitose dite ouverte, impliquant la rupture de l'EN et le désassemblage des NPCs. De la même façon que pour l'assemblage, le désassemblage des NPCs a lieu selon un processus ordonné.

Une étude de la cinétique du désassemblage des NPCs, montre qu'il s'agit d'un processus plus rapide que l'assemblage des NPCs, et qui a lieu de manière synchronisée aux niveaux des NPCs de toute la cellule.

Dans les cellules de vertébrés, la première étape est le détachement de hNup98 et hNup153 des NPCs ; cette étape est suivie du détachement de la nucléoporine présente sur l'anneau cytoplasmique hNup214 (Dultz et al., 2008). La dissociation de Nups provoque une perte progressive de la perméabilité des NPCs.

De façon intéressante, le désassemblage n'a pas lieu dans l'ordre inverse de l'assemblage ; par exemple les nucléoporines du complexe hNup107-160, recrutées à la chromatine dès les premières étapes de l'assemblage sont détachées avant des nucléoporines incorporées plus tard aux NPCs, comme hNup58 (Dultz et al., 2008).

Bien que le mécanisme moléculaire régissant le désassemblage des NPCs n'ait pas été caractérisé en détails, il semblerait que la phosphorylation joue un rôle dans le déclenchement du désassemblage. En effet, plusieurs études ont montré que certaines Nups étaient spécifiquement phosphorylées pendant la mitose (Bodoor et al., 1999 ;Macaulay et al., 1995 ;Favreau et al., 1996 ;Glavy et al., 2007). Un rôle dépendant de la phosphorylation de hNup98 dans l'initiation du désassemblage des NPCs a été très récemment proposé (Laurell et al., 2011), montrant que le désassemblage des NPCs était dépendant de la phosphorylation de cette nucléoporine.

D. Nups et mitose :

Certaines protéines du « checkpoint » mitotique, notamment Mad1 et Mad2, sont localisées aux NPCs durant l'interphase. Inversement un nombre croissant d'études a mis en évidence ces dernières années la localisation de différents composants des NPCs aux kinétochores ou au fuseau mitotique, et leur implication durant la mitose (pour revue voir Strambio-De-Castillia et al., 2010 ; Tran and Went, 2006 ; D'Angelo and Hetzer, 2008 ; Wozniak et al., 2010).

D.1. RAE1-hNup98 et mitose :

Pendant l'interphase, RAE1 (RNA export 1) interagit avec hNup98 pour former un complexe ayant un rôle majeur dans l'export d'ARNm (Kraemer and Blobel, 1997 ; Pritchard et al., 1999). Pendant la mitose, ce complexe interagit avec la kinase spécifique du checkpoint Bub1 et permet l'inhibition du complexe APC (Anaphase Promoting Complex) (Jeganathan et al., 2005). De plus, il a été montré récemment que le domaine C-terminal de hNup98 interagit avec les microtubules et contribue à la mise en place des deux pôles du fuseau mitotique (Cross and Powers, 2011).

D.2. Le complexe RanBP2-RanGAP1:SUMO:Ubc9 durant la mitose

En interphase, le complexe RanBP2-RanGAP1:SUMO:Ubc9 (RRSU) est localisé aux NPCs et impose la direction du transport nucléo cytoplasmique. En effet, RanGAP favorise l'hydrolyse de RanGTP en GDP. Chez les vertébrés, RanGAP1 est modifiée par SUMO (Small ubiquitin like modifier), et seule la forme sumoylée peut interagir avec RanBP2/Nup358.

Durant la mitose, le complexe RRSU est retrouvé au fuseau mitotique et, de façon dépendante des microtubules, aux kinétochores (Joseph et al., 2002). De plus, des études ont montré que la localisation en mitose du complexe RRSU est dépendante de Crm1, facteur de transport de la famille des karyophérines (voir chapitre transport) (Arnaoutov et al., 2005 ; Arnaoutov and Dasso, 2005 ; Zuccolo et al., 2007 pour revue voir Wozniak et al., 2010).

Des expériences de siRNA ont montré que la déplétion du complexe RRSU provoque des défauts du fuseau mitotique, des dysfonctionnements des kinétochores et des défauts de ségrégation des chromosomes (Salina et al., 2003). De plus, la déplétion de RanBP2 induit la délocalisation de RanGAP1 et d'autres protéines comme Mad1/Mad2, CENP-E, CENP-F et la dynéine (Joseph et al., 2004). Ces observations montrent l'importance du complexe RRSU dans l'interaction des microtubules avec les kinétochores.

D.3. Le complexe hNup107-160 durant la mitose :

En plus de son rôle crucial dans l'assemblage post mitotique des NPCs, le complexe hNup107-160 possède plusieurs autres fonctions durant la mitose.

En effet, une fraction du complexe hNup107-160 et de ELYS se localise au fuseau mitotique et aux kinétochores (Belgareh et al., 2001). Deux populations différentes ont été identifiées au niveau des kinétochores. En effet, un premier pool est étroitement lié au complexe Ndc80, alors que le second pool est lié à l'interaction de hNup133 et de CENP-F (Zuccolo et al., 2007).

Les premiers résultats montrant les fonctions mitotiques du complexe hNup107-160 ont été obtenus à partir d'observations *in vitro*. Ces résultats montrent que le complexe hNup107-160 est essentiel à la formation d'un fuseau mitotique bipolaire dans des extraits d'œufs de *Xenopus* (Orjalo et al., 2006) et joue un rôle dans l'assemblage ou le maintien des fibres des microtubules entre les pôles du fuseaux mitotique et les chromosomes.

De plus, des défauts de ségrégations de chromosomes ont été observés après la déplétion de MEL28 (homologue de ELYS) dans des embryons de *C.elegans* (Fernandez and Piano, 2006 ; Galy et al., 2006). Dans les cellules humaines, la déplétion individuelle des constituants du complexe hNup107-160 n'a que peu d'effets sur l'intégrité du fuseau mitotique et n'induit pas de défauts de ségrégations des chromosomes (Zuccolo et al., 2007 ; Rasala et al., 2006). La déplétion de plusieurs membres du complexe hNup107-160 provoque un défaut d'assemblage post mitotique des NPCs et ne peut donc pas être utilisée dans l'étude de la fonction du complexe aux kinétochores durant la mitose. Cependant, la déplétion d'un membre du complexe hNup107-160, hSeh1, ne provoque que peu de problèmes de réassemblage des NPCs (Loiodice et al., 2004) alors qu'elle induit une diminution de la localisation du complexe hNup107-160 aux kinétochores (Zuccolo et al., 2007) provoquant un allongement du temps de mitose. Les analyses des cellules déplétées de hSeh1 présentent des défauts de ségrégation des chromosomes et un nombre plus faible de microtubules résistants aux traitements par le froid, suggérant une déstabilisation des interactions entre les kinétochores et les chromosomes.

De plus, la déplétion du complexe hNup107-160 aux kinétochores perturbe le recrutement de Crm1, RanGAP1-RanBP2 à ces structures (Zuccolo et al., 2007). Cette étude a aussi révélé que le complexe hNup107-160 est nécessaire au maintien de l'attachement de CENP-F aux kinétochores.

D'autre part, une étude récente montre que la déplétion de hSeh1 ou d'ELYS perturbe la localisation aux centromères des chromosomes alignés sur la plaque métaphasique du complexe CPC (Chromosome Passenger Complex) ainsi que de MCAK (substrat de la kinase Aurora B) et de sa forme phosphorylée P-MCAK (Platani et al., 2009).

Enfin des expériences d'immunoprécipitation du complexe hNup107-160 suivies d'analyses en spectrométrie de masse, ont montré une association avec les protéines GCP2 et GCP3, membres du complexe γ -TuRC, complexe impliqué dans la nucléation des microtubules aux kinétochores. Cette étude a montré que l'interaction entre le complexe hNup107-160 et le complexe γ -TuRC favorise la formation du fuseau mitotique en permettant la nucléation des microtubules aux kinétochores. De plus, RanGTP est requis pour cette fonction du complexe hNup107-160 (Mishra et al., 2010).

L'ensemble de ces travaux indique donc les rôles importants du complexe hNup107-160 à différentes étapes du cycle cellulaire : en interphase, l'assemblage *de novo* des NPCs et export des ARNm, et en mitose, la mise en place du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes, et en fin de mitose, le réassemblage des NPCs.

CONTEXTE DU PROJET

Dans le laboratoire, l'équipe s'intéresse à la division cellulaire, et plus spécifiquement aux rôles du complexe hNup107-160 en mitose. Durant ma formation, je me suis intéressée à deux aspects différents impliquant les membres du complexe hNup107-160. D'une part, j'ai participé à l'étude du rôle du domaine N-terminal de hNup133 dans l'ancrage des centrosomes à l'EN pendant la transition G2/Mitose. D'autre part, j'ai étudié la dynamique du complexe hNup107-160 pendant la mitose.

A. Rôle de hNup133 dans l'ancrage de CENP-F, NudE/EL, la dynéine/dynactine à l'EN en prophase :

D'autres protéines ayant des fonctions spécifiques en mitose sont aussi localisées à l'EN spécifiquement en prophase. Parmi elles, CENP-F (aussi appelé mitosine), est une protéine des kinétochores, caractérisée par une localisation très dynamique au cours du cycle cellulaire. Ayant une localisation nucléaire pendant la phase G2, CENP-F s'accumule à l'enveloppe nucléaire lors de la transition G2/M, puis se lie aux kinétochores en formation en prophase précoce jusqu'à l'anaphase. Bien que plusieurs études aient contribué à comprendre les rôles de CENP-F pendant la mitose (pour revue voir Varis et al., 2006). Le mécanisme d'ancrage de CENP-F et son rôle à l'enveloppe nucléaire pendant la prophase restaient inconnus.

De façon intéressante, un crible double hybride ainsi que des expériences d'immunoprécipitation avaient permis de montrer que hNup133 ancre CENP-F à l'enveloppe via son domaine N-terminal qui présente une structure en β -propeller (Zuccolo et al., 2007).

Durant la prophase, la dynéine, un moteur moléculaire se déplaçant vers les bouts moins des microtubules et son cofacteur, la dynactine, sont aussi recrutées à l'EN (Busson et al., 1998 ; Salina et al., 2002). Il a été montré que la présence de ces deux protéines à l'EN crée des tensions, facilitant ainsi la rupture de l'EN (Hebbar et al., 2008 ; Beaudouin et al., 2002 ; Salina et al., 2002).

De plus, des études récentes démontrent que CENP-F joue un rôle dans le recrutement de la dynéine et de la dynactine aux kinétochores via son interaction avec NudE et/ou NudEL (aussi appelées Nde1) (Liang et al., 2007 ; Stehman et al., 2007 ; Vergnolle and Taylor, 2007). Il semblait donc qu'il existait un lien entre hNup133 et la localisation de CENP-F, NudE/EL, la dynéine et la dynactine durant la prophase (Busson et al., 1998 ; Salina et al., 2002 ; Hebbar et al., 2008).

De même, des travaux en collaboration avec l'équipe de R.Vallee ont montré que

NudE/EL est retrouvé à l'enveloppe nucléaire pendant l'interphase, en plus d'être localisé aux kinétochores. De plus, la déplétion de CENP-F, provoquait la perte de localisation de NudE/EL à l'EN et aux kinétochores (Bolhy, **Bouhleb**, Dultz et al 2010). Ces résultats montrent donc que hNup133 est à la base d'un réseau d'interaction permettant la localisation de la dynéine et la dynactine à l'EN en prophase.

Enfin, des expériences de vidéo microscopie ont montré que la déplétion des différents membres de ce réseau provoque un défaut d'ancrage des centrosomes de l'EN durant la prophase.

Dans le cadre de cette étude, j'ai contribué à finaliser ces travaux pour mieux comprendre les relations entre les NPCs et les centrosomes en reproduisant de façon plus quantitative les expériences d'interférence à l'ARN montrant l'implication du domaine N-terminal de hNup133 dans l'adressage de CENP-F à l'EN en prophase et caractérisé l'effet de l'altération de ce réseau d'interaction (hNup133, CENP-F, NudE/EL) sur le recrutement de la dynéine-dynactine à l'EN. Dans un second temps, j'ai réalisé les expériences nécessaires à la mesure des distances noyaux-centrosomes dans les cellules HeLa puis dans les cellules U2OS. J'ai aussi observé les effets de la déplétion de NudE/EL sur la formation du fuseau mitotique dans les cellules U2OS.

Enfin, sachant que CENP-F interagit avec le complexe hNup107-160 par l'intermédiaire du domaine N-terminal de hNup133, j'ai entrepris la production d'un anticorps monoclonal dirigé contre ce domaine. Pour cela, j'ai entrepris la construction du plasmide, l'expression de ce domaine dans les bactéries puis la caractérisation des différents surnageants de culture d'hybridomes et de fractions purifiées d'anticorps dirigés contre le domaine N-terminal de hNup133 obtenus par un prestataire extérieur.

B. Etude de la dynamique du complexe hNup107-160 en mitose par FCCS :

Lors de la mitose ouverte chez les vertébrés, les NPCs se désassemblent en même temps que l'EN (voir chapitre C.4). Cependant, certains sous complexes ne désassemblent pas totalement, et certaines nucléoporines restent sous forme de complexe. Ainsi, des approches biochimiques (immuno-précipitation, en interphase et en mitose ou séparation sur gradient de sucrose) ont mis en évidence, que de façon générale, les constituants du complexe hNup107-160 restent assemblés en mitose.

Cependant, l'interaction de hSeh1 avec le complexe hNup107-160 était faible en interphase et l'interaction en mitose n'avait pas été mise en évidence. De plus une étude

récente a montré qu'une fraction de hNup43 se dissociait du complexe hNup107-160 en mitose (Chakraborty et al., 2008). Cette étude a aussi montré que hNup96 était dégradée en mitose. Dans ce contexte, j'ai réalisé une approche *in vivo* afin de valider et compléter ces données. Pour cela, j'ai utilisé la technique de la FCCS afin de suivre les membres du complexe hNup107-160 durant la mitose.

La FCCS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) permet de détecter les interactions entre deux protéines étiquetées par deux fluorophores différents (ici, la GFP et la mCherry) diffusant dans un volume focal. Cependant, étant donné la petite taille du volume focal et la nécessité d'être appliquée à des molécules solubles, les protéines exprimées en grande quantité ou immobiles dans la cellule ne peuvent être suivies par cette méthode. Les nucléoporines, présentes en faibles quantités dans les cellules et solubles durant la mitose constituaient un bon modèle pour cette méthode. Il existe en revanche une limite importante de la FCCS ; l'interférence entre les signaux émis par la GFP et retrouvés dans le détecteur de la mCherry conduit à des signaux de cross-corrélation artéfactuels.

Dans l'institut, des membres de l'équipe de Maïté Coppey (M. Tramier et S. Padilla-Para) venaient de valider une technique mise au point par PicoQuant, permettant d'éliminer les interférences entre les signaux d'émission de la GFP et de la mCherry par application de la FLCS (Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy) aux signaux détectés par FCCS. Lors de cette étude, ils ont mesuré la cross-corrélation dans cellules HeLa exprimant la GFP et la mCherry ou un tandem GFP-mCherry. L'application de la FLCS a permis d'éliminer la proportion de cross-corrélation artéfactuelle (due au passage de certains photons émis dans le canal vert), dans les cellules exprimant les deux protéines fluorescentes non liées mais pas dans les cellules exprimant le tandem, validant ainsi cette approche.

Dans cette partie de mes travaux, réalisée en étroite collaboration avec Marc Tramier, puis avec Nicolas Audugé, j'ai tout d'abord validé la technique de la FCCS/FLCS en suivant l'interaction entre hNup107 et hNup133 durant la mitose. Une fois la faisabilité du projet validée, l'étude a été étendue aux autres membres du complexe hNup107-160, dans le but de compléter les résultats précédemment obtenus par biochimie.

- Alber, F., S. Dokudovskaya, L.M. Veenhoff, W. Zhang, J. Kipper, D. Devos, A. Suprpto, O. Karni-Schmidt, R. Williams, B.T. Chait, A. Sali, and M.P. Rout. 2007. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature*. 450:695-701.
- Anderson, D.J., and M.W. Hetzer. 2008. The life cycle of the metazoan nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol*. 20:386-392.
- Antonin, W., J. Ellenberg, and E. Dultz. 2008. Nuclear pore complex assembly through the cell cycle: regulation and membrane organization. *FEBS Lett*. 582:2004-2016.
- Antonin, W., C. Franz, U. Haselmann, C. Antony, and I.W. Mattaj. 2005. The integral membrane nucleoporin pom121 functionally links nuclear pore complex assembly and nuclear envelope formation. *Mol Cell*. 17:83-92.
- Arnautov, A., Y. Azuma, K. Ribbeck, J. Joseph, Y. Boyarchuk, T. Karpova, J. McNally, and M. Dasso. 2005. Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. *Nat Cell Biol*. 7:626-632.
- Arnautov, A., and M. Dasso. 2005. Ran-GTP regulates kinetochore attachment in somatic cells. *Cell Cycle*. 4:1161-1165.
- Beaudouin, J., D. Gerlich, N. Daigle, R. Eils, and J. Ellenberg. 2002. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell*. 108:83-96.
- Belgareh, N., G. Rabut, S.W. Bai, M. van Overbeek, J. Beaudouin, N. Daigle, O.V. Zatssepina, F. Pasteau, V. Labas, M. Fromont-Racine, J. Ellenberg, and V. Doye. 2001. An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J Cell Biol*. 154:1147-1160.
- Berke, I.C., T. Boehmer, G. Blobel, and T.U. Schwartz. 2004. Structural and functional analysis of Nup133 domains reveals modular building blocks of the nuclear pore complex. *J Cell Biol*. 167:591-597.
- Bigay, J., J.F. Casella, G. Drin, B. Mesmin, and B. Antonny. 2005. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *Embo J*. 24:2244-2253.
- Bodoor, K., S. Shaikh, D. Salina, W.H. Raharjo, R. Bastos, M. Lohka, and B. Burke. 1999. Sequential recruitment of NPC proteins to the nuclear periphery at the end of mitosis. *J Cell Sci*. 112 (Pt 13):2253-2264.
- Boehmer, T., J. Enninga, S. Dales, G. Blobel, and H. Zhong. 2003. Depletion of a single nucleoporin, Nup107, prevents the assembly of a subset of nucleoporins into the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:981-985.
- Boehmer, T., S. Jeudy, I.C. Berke, and T.U. Schwartz. 2008. Structural and functional studies of Nup107/Nup133 interaction and its implications for the architecture of the nuclear pore complex. *Mol Cell*. 30:721-731.
- Busson, S., D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre, and J.R. De Mey. 1998. Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr Biol*. 8:541-544.
- Chadrin, A., B. Hess, M. San Roman, X. Gatti, B. Lombard, D. Loew, Y. Barral, B. Palancade, and V. Doye. 2010. Pom33, a novel transmembrane nucleoporin required for proper nuclear pore complex distribution. *J Cell Biol*. 189:795-811.
- Chakraborty, P., Y. Wang, J.H. Wei, J. van Deursen, H. Yu, L. Malureanu, M. Dasso, D.J. Forbes, D.E. Levy, J. Seemann, and B.M. Fontoura. 2008. Nucleoporin levels regulate cell cycle progression and phase-specific gene expression. *Dev Cell*. 15:657-667.
- Cronshaw, J.M., A.N. Krutchinsky, W. Zhang, B.T. Chait, and M.J. Matunis. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol*. 158:915-927.
- Cross, M.K., and M.A. Powers. 2011. Nup98 regulates bipolar spindle assembly through association with microtubules and opposition of MCAK. *Mol Biol Cell*. 22:661-672.

- D'Angelo, M.A., D.J. Anderson, E. Richard, and M.W. Hetzer. 2006. Nuclear pores form de novo from both sides of the nuclear envelope. *Science*. 312:440-443.
- D'Angelo, M.A., and M.W. Hetzer. 2008. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol*. 18:456-466.
- Daigle, N., J. Beaudouin, L. Hartnell, G. Imreh, E. Hallberg, J. Lippincott-Schwartz, and J. Ellenberg. 2001. Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol*. 154:71-84.
- Denning, D.P., S.S. Patel, V. Uversky, A.L. Fink, and M. Rexach. 2003. Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:2450-2455.
- Devos, D., S. Dokudovskaya, R. Williams, F. Alber, N. Eswar, B.T. Chait, M.P. Rout, and A. Sali. 2006. Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:2172-2177.
- Doucet, C.M., J.A. Talamas, and M.W. Hetzer. 2010. Cell cycle-dependent differences in nuclear pore complex assembly in metazoa. *Cell*. 141:1030-1041.
- Dreyfuss, G., V.N. Kim, and N. Kataoka. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:195-205.
- Drin, G., J. Bigay, and B. Antonny. 2009. [Regulation of vesicular transport by membrane curvature]. *Med Sci (Paris)*. 25:483-488.
- Drin, G., J.F. Casella, R. Gautier, T. Boehmer, T.U. Schwartz, and B. Antonny. 2007. A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol*. 14:138-146.
- Dultz, E., E. Zanin, C. Wurzenberger, M. Braun, G. Rabut, L. Sironi, and J. Ellenberg. 2008. Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells. *J Cell Biol*. 180:857-865.
- Dundr, M., and T. Misteli. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J*. 356:297-310.
- Favreau, C., H.J. Worman, R.W. Wozniak, T. Frappier, and J.C. Courvalin. 1996. Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry*. 35:8035-8044.
- Fernandez, A.G., and F. Piano. 2006. MEL-28 is downstream of the Ran cycle and is required for nuclear-envelope function and chromatin maintenance. *Curr Biol*. 16:1757-1763.
- Fernandez-Martinez, J., and M.P. Rout. 2009. Nuclear pore complex biogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 21:603-612.
- Fornerod, M., and M. Ohno. 2002. Exportin-mediated nuclear export of proteins and ribonucleoproteins. *Results Probl Cell Differ*. 35:67-91.
- Franz, C., R. Walczak, S. Yavuz, R. Santarella, M. Gentzel, P. Askjaer, V. Galy, M. Hetzer, I.W. Mattaj, and W. Antonin. 2007. MEL-28/ELYS is required for the recruitment of nucleoporins to chromatin and postmitotic nuclear pore complex assembly. *EMBO Rep*. 8:165-172.
- Fridolfsson, H.N., N. Ly, M. Meyerzon, and D.A. Starr. 2010. UNC-83 coordinates kinesin-1 and dynein activities at the nuclear envelope during nuclear migration. *Dev Biol*. 338:237-250.
- Fukuda, M., S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida, and E. Nishida. 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*. 390:308-311.
- Gall, J.G. 1967. Octagonal nuclear pores. *J Cell Biol*. 32:391-399.
- Galy, V., P. Askjaer, C. Franz, C. Lopez-Iglesias, and I.W. Mattaj. 2006. MEL-28, a novel nuclear-envelope and kinetochore protein essential for zygotic nuclear-envelope assembly in *C. elegans*. *Curr Biol*. 16:1748-1756.

- Gillespie, P.J., G.A. Khoudoli, G. Stewart, J.R. Swedlow, and J.J. Blow. 2007. ELYS/MEL-28 chromatin association coordinates nuclear pore complex assembly and replication licensing. *Curr Biol.* 17:1657-1662.
- Glavy, J.S., A.N. Krutchinsky, I.M. Cristea, I.C. Berke, T. Boehmer, G. Blobel, and B.T. Chait. 2007. Cell-cycle-dependent phosphorylation of the nuclear pore Nup107-160 subcomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3811-3816.
- Guo, J., Z. Yang, W. Song, Q. Chen, F. Wang, Q. Zhang, and X. Zhu. 2006. Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly. *Mol Biol Cell.* 17:680-689.
- Harel, A., A.V. Orjalo, T. Vincent, A. Lachish-Zalait, S. Vasu, S. Shah, E. Zimmerman, M. Elbaum, and D.J. Forbes. 2003. Removal of a single pore subcomplex results in vertebrate nuclei devoid of nuclear pores. *Mol Cell.* 11:853-864.
- Hase, M.E., N.V. Kuznetsov, and V.C. Cordes. 2001. Amino acid substitutions of coiled-coil protein Tpr abrogate anchorage to the nuclear pore complex but not parallel, in-register homodimerization. *Mol Biol Cell.* 12:2433-2452.
- Hebbar, S., M.T. Mesngon, A.M. Guillotte, B. Desai, R. Ayala, and D.S. Smith. 2008. Lis1 and Ndel1 influence the timing of nuclear envelope breakdown in neural stem cells. *J Cell Biol.* 182:1063-1071.
- Jeganathan, K.B., L. Malureanu, and J.M. van Deursen. 2005. The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature.* 438:1036-1039.
- Joseph, J., S.T. Liu, S.A. Jablonski, T.J. Yen, and M. Dasso. 2004. The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr Biol.* 14:611-617.
- Joseph, J., S.H. Tan, T.S. Karpova, J.G. McNally, and M. Dasso. 2002. SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol.* 156:595-602.
- Kampmann, M., and G. Blobel. 2009. Three-dimensional structure and flexibility of a membrane-coating module of the nuclear pore complex. *Nat Struct Mol Biol.* 16:782-788.
- Kiseleva, E., S. Rutherford, L.M. Cotter, T.D. Allen, and M.W. Goldberg. 2001. Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early *Drosophila* embryos. *J Cell Sci.* 114:3607-3618.
- Kohler, A., and E. Hurt. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:761-773.
- Kraemer, D., and G. Blobel. 1997. mRNA binding protein mrnp 41 localizes to both nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9119-9124.
- Laurell, E., K. Beck, K. Krupina, G. Theerthagiri, B. Bodenmiller, P. Horvath, R. Aebersold, W. Antonin, and U. Kutay. 2011. Phosphorylation of Nup98 by Multiple Kinases Is Crucial for NPC Disassembly during Mitotic Entry. *Cell.* 144:539-550.
- Liang, Y., W. Yu, Y. Li, L. Yu, Q. Zhang, F. Wang, Z. Yang, J. Du, Q. Huang, X. Yao, and X. Zhu. 2007. Nudel modulates kinetochore association and function of cytoplasmic dynein in M phase. *Mol Biol Cell.* 18:2656-2666.
- Loiodice, I., A. Alves, G. Rabut, M. Van Overbeek, J. Ellenberg, J.B. Sibarita, and V. Doye. 2004. The entire Nup107-160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis. *Mol Biol Cell.* 15:3333-3344.
- Lupu, F., A. Alves, K. Anderson, V. Doye, and E. Lacy. 2008. Nuclear pore composition regulates neural stem/progenitor cell differentiation in the mouse embryo. *Dev Cell.* 14:831-842.
- Lutzmann, M., R. Kunze, A. Buerer, U. Aebi, and E. Hurt. 2002. Modular self-assembly of a Y-shaped multiprotein complex from seven nucleoporins. *Embo J.* 21:387-397.

- Lyman, S.K., T. Guan, J. Bednenko, H. Wodrich, and L. Gerace. 2002. Influence of cargo size on Ran and energy requirements for nuclear protein import. *J Cell Biol.* 159:55-67.
- Macaulay, C., E. Meier, and D.J. Forbes. 1995. Differential mitotic phosphorylation of proteins of the nuclear pore complex. *J Biol Chem.* 270:254-262.
- Madrid, A.S., J. Mancuso, W.Z. Cande, and K. Weis. 2006. The role of the integral membrane nucleoporins Ndc1p and Pom152p in nuclear pore complex assembly and function. *J Cell Biol.* 173:361-371.
- Maeshima, K., K. Yahata, Y. Sasaki, R. Nakatomi, T. Tachibana, T. Hashikawa, F. Imamoto, and N. Imamoto. 2006. Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins. *J Cell Sci.* 119:4442-4451.
- Malone, C.J., L. Misner, N. Le Bot, M.C. Tsai, J.M. Campbell, J. Ahringer, and J.G. White. 2003. The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell.* 115:825-836.
- Maul, G.G., H.M. Maul, J.E. Scogna, M.W. Lieberman, G.S. Stein, B.Y. Hsu, and T.W. Borun. 1972. Time sequence of nuclear pore formation in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes and in HeLa cells during the cell cycle. *J Cell Biol.* 55:433-447.
- Mesmin, B., G. Drin, S. Levi, M. Rawet, D. Cassel, J. Bigay, and B. Antonny. 2007. Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry.* 46:1779-1790.
- Mishra, R.K., P. Chakraborty, A. Arnaoutov, B.M. Fontoura, and M. Dasso. 2010. The Nup107-160 complex and gamma-TuRC regulate microtubule polymerization at kinetochores. *Nat Cell Biol.* 12:164-169.
- Nagy, V., K.C. Hsia, E.W. Debler, M. Kampmann, A.M. Davenport, G. Blobel, and A. Hoelz. 2009. Structure of a trimeric nucleoporin complex reveals alternate oligomerization states. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:17693-17698.
- Nakano, H., W. Wang, C. Hashizume, T. Funasaka, H. Sato, and R.W. Wong. 2011. Unexpected role of nucleoporins in coordination of cell cycle progression. *Cell Cycle.* 10:425-433.
- Nousiainen, M., H.H. Sillje, G. Sauer, E.A. Nigg, and R. Korner. 2006. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:5391-5396.
- Orjalo, A.V., A. Arnaoutov, Z. Shen, Y. Boyarchuk, S.G. Zeitlin, B. Fontoura, S. Briggs, M. Dasso, and D.J. Forbes. 2006. The Nup107-160 nucleoporin complex is required for correct bipolar spindle assembly. *Mol Biol Cell.* 17:3806-3818.
- Piel, M., P. Meyer, A. Khodjakov, C.L. Rieder, and M. Bornens. 2000. The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J Cell Biol.* 149:317-330.
- Platani, M., R. Santarella-Mellwig, M. Posch, R. Walczak, J.R. Swedlow, and I.W. Mattaj. 2009. The Nup107-160 nucleoporin complex promotes mitotic events via control of the localization state of the chromosome passenger complex. *Mol Biol Cell.* 20:5260-5275.
- Pritchard, C.E., M. Fornerod, L.H. Kasper, and J.M. van Deursen. 1999. RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J Cell Biol.* 145:237-254.
- Rabut, G., V. Doye, and J. Ellenberg. 2004. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat Cell Biol.* 6:1114-1121.
- Rasala, B.A., A.V. Orjalo, Z. Shen, S. Briggs, and D.J. Forbes. 2006. ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:17801-17806.

- Rasala, B.A., C. Ramos, A. Harel, and D.J. Forbes. 2008. Capture of AT-rich chromatin by ELYS recruits POM121 and NDC1 to initiate nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell*. 19:3982-3996.
- Reichelt, R., A. Holzenburg, E.L. Buhle, Jr., M. Jarnik, A. Engel, and U. Aebi. 1990. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol*. 110:883-894.
- Rodriguez, M.S., C. Dargemont, and F. Stutz. 2004. Nuclear export of RNA. *Biol Cell*. 96:639-655.
- Rout, M.P., J.D. Aitchison, A. Suprapto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B.T. Chait. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*. 148:635-651.
- Saitoh, H., R. Pu, M. Cavenagh, and M. Dasso. 1997. RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:3736-3741.
- Salina, D., K. Bodoor, D.M. Eckley, T.A. Schroer, J.B. Rattner, and B. Burke. 2002. Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell*. 108:97-107.
- Salina, D., P. Enarson, J.B. Rattner, and B. Burke. 2003. Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly. *J Cell Biol*. 162:991-1001.
- Schwille, P., F.J. Meyer-Almes, and R. Rigler. 1997. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys J*. 72:1878-1886.
- Simos, G., H. Grosshans, and E. Hurt. 2002. Nuclear export of tRNA. *Results Probl Cell Differ*. 35:115-131.
- Splinter, D., M.E. Tanenbaum, A. Lindqvist, D. Jaarsma, A. Flotho, K.L. Yu, I. Grigoriev, D. Engelsma, E.D. Haasdijk, N. Keijzer, J. Demmers, M. Fornerod, F. Melchior, C.C. Hoogenraad, R.H. Medema, and A. Akhmanova. 2010. Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol*. 8:e1000350.
- Stade, K., C.S. Ford, C. Guthrie, and K. Weis. 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*. 90:1041-1050.
- Stavru, F., B.B. Hulsmann, A. Spang, E. Hartmann, V.C. Cordes, and D. Gorlich. 2006. NDC1: a crucial membrane-integral nucleoporin of metazoan nuclear pore complexes. *J Cell Biol*. 173:509-519.
- Stehman, S.A., Y. Chen, R.J. McKenney, and R.B. Vallee. 2007. NudE and NudEL are required for mitotic progression and are involved in dynein recruitment to kinetochores. *J Cell Biol*. 178:583-594.
- Stoffler, D., B. Fahrenkrog, and U. Aebi. 1999. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 11:391-401.
- Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel, and M.P. Rout. 2010. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:490-501.
- Strawn, L.A., T. Shen, N. Shulga, D.S. Goldfarb, and S.R. Wentz. 2004. Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nat Cell Biol*. 6:197-206.
- Terry, L.J., and S.R. Wentz. 2007. Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex. *J Cell Biol*. 178:1121-1132.
- Terry, L.J., and S.R. Wentz. 2009. Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryot Cell*. 8:1814-1827.
- Tran, E.J., and S.R. Wentz. 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell*. 125:1041-1053.
- Varis, A., A.L. Salmela, and M.J. Kallio. 2006. Cenp-F (mitosin) is more than a mitotic marker. *Chromosoma*. 115:288-295.

- Vasu, S., S. Shah, A. Orjalo, M. Park, W.H. Fischer, and D.J. Forbes. 2001. Novel vertebrate nucleoporins Nup133 and Nup160 play a role in mRNA export. *J Cell Biol.* 155:339-354.
- Vergnolle, M.A., and S.S. Taylor. 2007. Cenp-F links kinetochores to Ndel1/Nde1/Lis1/dynein microtubule motor complexes. *Curr Biol.* 17:1173-1179.
- Walther, T.C., A. Alves, H. Pickersgill, I. Loiodice, M. Hetzer, V. Galy, B.B. Hulsmann, T. Kocher, M. Wilm, T. Allen, I.W. Mattaj, and V. Doye. 2003. The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell.* 113:195-206.
- Walther, T.C., H.S. Pickersgill, V.C. Cordes, M.W. Goldberg, T.D. Allen, I.W. Mattaj, and M. Fornerod. 2002. The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import. *J Cell Biol.* 158:63-77.
- Winey, M., D. Yarar, T.H. Giddings, Jr., and D.N. Mastronarde. 1997. Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol Biol Cell.* 8:2119-2132.
- Wozniak, R., B. Burke, and V. Doye. 2010. Nuclear transport and the mitotic apparatus: an evolving relationship. *Cell Mol Life Sci.* 67:2215-2230.
- Yang, W., J. Gelles, and S.M. Musser. 2004. Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:12887-12892.
- Yoneda, Y. 2000. New steps toward the nucleocytoplasmic traffic of macromolecules. *Cell Struct Funct.* 25:205-206.
- Yoshida, K., and G. Blobel. 2001. The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol.* 152:729-740.
- Zeitler, B., and K. Weis. 2004. The FG-repeat asymmetry of the nuclear pore complex is dispensable for bulk nucleocytoplasmic transport in vivo. *J Cell Biol.* 167:583-590.
- Zhang, X., K. Lei, X. Yuan, X. Wu, Y. Zhuang, T. Xu, R. Xu, and M. Han. 2009. SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron.* 64:173-187.
- Zhu, X., M.A. Mancini, K.H. Chang, C.Y. Liu, C.F. Chen, B. Shan, D. Jones, T.L. Yang-Feng, and W.H. Lee. 1995. Characterization of a novel 350-kilodalton nuclear phosphoprotein that is specifically involved in mitotic-phase progression. *Mol Cell Biol.* 15:5017-5029.
- Zuccolo, M., A. Alves, V. Galy, S. Bolhy, E. Formstecher, V. Racine, J.B. Sibarita, T. Fukagawa, R. Shiekhattar, T. Yen, and V. Doye. 2007. The human Nup107-160 nuclear pore subcomplex contributes to proper kinetochore functions. *Embo J.* 26:1853-1864.