



HAL
open science

Utilisation du facteur bactérien Rho pour l'étude de la biogénèse et du contrôle qualité des transcrits eucaryotes

Romy Honorine

► **To cite this version:**

Romy Honorine. Utilisation du facteur bactérien Rho pour l'étude de la biogénèse et du contrôle qualité des transcrits eucaryotes. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2010. Français. NNT : 2010ORLE2004 . tel-00558795

HAL Id: tel-00558795

<https://theses.hal.science/tel-00558795>

Submitted on 24 Jan 2011

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.



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :
Romy HONORINE

soutenue le : **26 février 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire

Utilisation du facteur bactérien Rho pour l'étude
de la biogénèse et du contrôle qualité des
transcrits eucaryotes

THÈSE dirigée par :

Dr. A. Rachid RAHMOUNI Directeur de recherche, CNRS Orléans

RAPPORTEURS :

Dr. Marc DREYFUS Directeur de recherche, CNRS

Dr. Domenico LIBRI Directeur de recherche, CNRS

JURY:

Dr. Yves BIGOT Directeur de recherche, CNRS Tours

Dr. Marc DREYFUS Directeur de recherche, CNRS Paris V

Pr. Alain LEGRAND Professeur à l'université d'Orléans - président du jury

Dr. Domenico LIBRI Directeur de recherche, CNRS Gif sur Yvette

Dr. A. Rachid RAHMOUNI Directeur de recherche, CNRS Orléans

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche qui ont fait l'objet de ce mémoire ont été réalisés au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans sous la direction de Monsieur A. Rachid Rahmouni, directeur de recherche au CNRS. Je tiens à le remercier de m'avoir accueillie au sein de son équipe ainsi que pour la confiance et la disponibilité qu'il m'a accordée. Je lui suis infiniment reconnaissant pour les conseils et les encouragements qu'il a su me prodiguer pendant ces quatre dernières années. C'est avec gratitude que je le remercie de m'avoir transmis son savoir.

Merci à Christine Mosrin-Huaman pour sa coopération et son implication énergique.

Je tiens à remercier Frédérique Jacquinot pour son enthousiasme et son entraide.

Je voudrais remercier Annie Schwartz de m'avoir fait profiter, avec bienveillance, de ces précieux conseils.

Je remercie tout particulièrement Marc Boudvillain pour son soutien et ses qualités humaines. Merci à tous les autres membres de l'équipe ainsi qu'à mes proches pour leur gentillesse.

Merci à Monsieur Yves Bigot, directeur de recherche au CNRS, pour m'avoir transmis ses encouragements qui ont beaucoup compté au cours de ma formation. Je souhaite aussi le remercier pour avoir accepté d'être mon examinateur.

Je témoigne l'expression de mon plus profond respect à Messieurs Domenico Libri et Marc Dreyfus, directeurs de recherche au CNRS, pour m'avoir fait profiter de leurs compétences et je les remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie Monsieur Alain Legrand, professeur à l'université d'Orléans, d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie vivement Arnaud Recton, pour sa patience, sa joie de vivre et son indéfectible soutien.

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS	1
AVANT-PROPOS	2

INTRODUCTION

I. LA BIOGENESE DES mRNPS	4
A. La maturation co-transcriptionnelle de l'ARN naissant	4
1. Le CTD de l'ARNP II	5
2. La maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm couplée à la terminaison poly(A)- dépendante.....	8
a) Un modèle de terminaison unifié	8
b) La machinerie de maturation de l'extrémité 3' des pré-ARNm.....	10
(1) Pcf11.....	12
3. La terminaison poly(A)-indépendante	14
a) Le complexe Nrd1c	14
4. Le choix du système de terminaison	16
B. A l'interface entre la biogénèse et l'export des mRNPs.....	18
1. Les protéines composant les mRNPs	19
a) Des facteurs de maturation du pré-ARNm	19
b) La protéine Sub2	19
c) Les protéines adaptatrices	19
(1) Yra1	19
(2) Npl3.....	20
d) Le complexe THO	20
e) Le complexe TREX-2	22
2. La translocation des mRNPs à travers le NPC	24
C. La dégradation des ARNs aberrants couplée à la biogénèse des mRNPs.....	25
1. L'exosome	25
a) L'activation de l'exosome	27
(1) Des cofacteurs séquence-indépendants	27

(2) Des cofacteurs séquence-spécifiques	28
(3) Un cofacteur structure-dépendant	29
b) Le contrôle qualité au cours de la biogénèse des mRNPs.....	29
(1) Mlp1-Mlp2 participent à la rétention des pré-ARNm aberrants	30
(2) Swt1, une endonucléase impliquée dans le contrôle qualité des mRNPs	31
D. Etat de l'art et méthodologies	32
1. Pourquoi 20% des ORFs de levures ne sont pas caractérisées ?.....	32
2. Intérêt d'une nouvelle approche.....	33
II. UN FACTEUR DE TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION BACTERIENNE : Rho POUR ETUDIER LA BIOGENESE ET LE CONTROLE QUALITE DES TRANSCRITS EUCARYOTES	35
A. Les rôles biologiques de Rho	35
B. Organisation structurale du facteur Rho.....	36
C. Le modèle de terminaison Rho-dépendante.....	38
D. La translocation et la dissociation d'obstacles protéiques.....	39

RESULTATS

III. ARTICLE I : « EXPRESSION OF BACTERIAL Rho FACTOR IN YEAST IDENTIFIES NEW FACTORS INVOLVED IN THE FUNCTIONAL INTERPLAY BETWEEN TRANSCRIPTION AND mRNP BIOGENESIS »	41
A. Introduction	41
B. Article I.....	42
IV. ARTICLE II : « NUCLEAR mRNP QUALITY CONTROL MECHANISM IS MEDIATED BY A STIMULATION OF Nrd1 CO-TRANSCRIPTIONAL RECRUITMENT »	59
A. Introduction	59

B. Article II.....	61
V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	79
A. Une approche originale pour identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la coordination des étapes de la biogénèse des mRNPs.....	79
B. Un modèle d'étude des mécanismes de reconnaissance et de dégradation des transcrits aberrants.....	82
REFERENCES.....	86

ABBREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
APT	Associated with the Pta1
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNP	Acide RiboNucléique Polymérase
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomal
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bt	Biotine
CAGE	Cap-Analysis Gene Expression
CBC	Cap-Binding Complex
CF	Cleavage Factor
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CID	CTD-Interacting Domain
CPF	Cleavage and Polyadenylation Factors
CTD	C-Terminal Domain
CUTs	Cryptique Unstable Transcripts
miRNA	micro RiboNucleic Acid
mRNP	messenger RiboNucleoprotein Particule
NPC	Nuclear Pore Complex
ORF	Open Reading Frame
PIN	PilT N-terminus
Rut	Rho utilization
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
snoRNA	small nucleolar RiboNucleic Acid
snRNA	small nuclear RiboNucleic Acid
TAP-MS	Tandem Affinity Purification- Mass Spectrometry
TEC	Ternary Elongation Complex
TRAMP	Trf4p-Air1/2p-Mtr4p Polyadenylation complex
TREX	TRanscription EXport complex
UTR	Untranslated Terminal Region

AVANT-PROPOS

Mon travail de thèse s'inscrit dans l'étude du métabolisme de l'ARN chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il a été réalisé au sein de l'équipe « Mécanismes moléculaires de la régulation des gènes » sous la direction du Docteur. A. Rachid Rahmouni, au Centre de Biophysique Moléculaire.

Chez les eucaryotes, la transcription des gènes codant des protéines est un processus complexe dans lequel la synthèse de l'ARNm s'accompagne de multiples modifications. La molécule d'ARN précurseur est soumise à des processus de maturation et d'empaquetage. Ces événements participent à la biogénèse d'une particule ribonucleoprotéique (mRNP) capable d'être exportée vers le cytoplasme pour y être traduite en protéine. Si aujourd'hui il est clairement établi que l'initiation de la transcription n'est pas la seule cible des mécanismes de régulation de l'expression des gènes, d'autres étapes intervenant en aval sont hautement régulées. En effet, l'élongation de la transcription est une étape dynamique au cours de laquelle de nombreux facteurs s'associent aux complexes d'élongation de la transcription et assistent l'ARNP II pour synthétiser efficacement le transcrit. De plus, des études génétiques et biochimiques, utilisant la levure comme organisme modèle, ont établi que les différentes étapes de maturation et d'empaquetage des mRNPs étaient physiquement et fonctionnellement couplées à l'élongation de la transcription. Chaque phase de la biogénèse des mRNPs est alors soumise à un contrôle qualité afin d'éviter la production de mRNPs aberrants. D'après le modèle actuel, le transcrit émergent est progressivement recouvert d'une grande variété de protéines. Celles-ci assurent l'intégrité du transcrit ainsi que son transport du site de transcription vers le pore nucléaire.

Bien que l'assemblage co-transcriptionnel fasse l'objet de nombreuses investigations, l'échange dynamique des partenaires protéiques en interaction avec le transcrit est évasive. De plus, les processus par lesquels les mRNPs aberrants sont reconnues puis dirigées vers la machinerie de dégradation restent à déterminer. A juste titre, la caractérisation de nouveaux facteurs impliqués de façon transitoire dans la biogénèse des mRNPs est essentielle à la compréhension des cascades d'évènements qui coordonnent l'expression des gènes.

L'objectif de ma thèse a été d'une part de concevoir un test innovant pour identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la biogénèse des mRNPs et d'autre part de contribuer à la

Avant-propos

découverte des mécanismes nécessaires à la mise en place du contrôle qualité des transcrits. Nous avons élaboré cette étude chez *Saccharomyces cerevisiae* dans un contexte où l'assemblage co-transcriptionnel de la mRNP est perturbé par l'expression hétérologue du facteur de terminaison bactérienne Rho, attendu que le travail mené dans l'équipe de Rachid Rahmouni suggérait que Rho pouvait être un outil astucieux pour sonder un processus dynamique tel que la biogénèse des mRNPs.

Afin d'introduire mes travaux, je commencerai par évoquer les différentes étapes de la biogénèse des mRNPs. Ensuite, je présenterai un état des lieux sur la caractérisation, par les méthodologies actuelles, du génome et du protéome de l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*. Aussi, je développerai les raisons qui nous ont amené à étudier la biogénèse des mRNPs en utilisant Rho comme outil. Puis, j'énoncerai les propriétés associées au facteur bactérien Rho qui ont justifié son utilisation en tant que sonde de la biogénèse des mRNPs. Enfin, je conclurai en replaçant dans la discussion les résultats obtenus durant cette thèse.

INTRODUCTION

I. La biogénèse des mRNPs

Chez les organismes eucaryotes, tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la transcription des gènes en ARN s'effectue dans le noyau de la cellule. Ce processus complexe et hautement régulé représente la première étape de transmission de l'information génétique. La machinerie transcriptionnelle requiert trois ARN polymérases (ARNPs) : l'ARNP I, II et III. Ces trois enzymes présentent une conservation parfaite du corps catalytique. Cependant, chacune présente des mécanismes distincts de reconnaissance de la séquence promotrice, d'initiation, d'élongation de la molécule d'ARN et de terminaison de la transcription. Parmi ces enzymes, l'ARNP II est la plus versatile puisqu'elle est capable de générer des transcrits très hétérogènes. En effet, elle est responsable de la transcription de gènes codant des protéines, et par conséquent synthétise des ARNm, mais aussi de nombreux ARNs non-codants dont les petits ARN nucléaires spliceosomaux (snRNAs), les petits ARN nucléolaires (snoRNAs), les microARN précurseurs (miRNA) et les transcrits cryptiques instables (CUTs). Chacune de ces molécules, plus ou moins stable, est exposée à différents processus de maturation et de dégradation. Ainsi, l'ARNm naissant subit plusieurs modifications, telles que l'addition de la coiffe, l'épissage des introns, le clivage et la polyadénylation. Au cours de ces événements co-transcriptionnels de maturation, la synthèse du pré-ARNm est couplée à l'assemblage concomitant de facteurs protéiques spécifiques pour former des particules ribonucléoprotéiques (mRNPs). L'ensemble des étapes de maturation, de remodelage et d'empaquetage du transcrit constitue la biogénèse des mRNPs. L'échange dynamique des facteurs composant les mRNPs permet l'acquisition de compétences structurales et fonctionnelles indispensables à l'export des mRNPs vers le cytoplasme. Afin d'éviter les erreurs spontanées lors de la biogénèse, la cellule a déployé diverses stratégies de contrôle qualité des mRNPs. Ces mécanismes de surveillance sont étroitement connectés à la biogénèse des mRNPs.

A. La maturation co-transcriptionnelle de l'ARN naissant

Le domaine C-terminal (CTD) de la grande sous-unité de l'ARNP II (Rpb1) est un motif crucial présent uniquement chez l'ARNP II. Il permet de synchroniser le couplage physique et fonctionnel entre la transcription et la maturation des pré-ARNm.

1. Le CTD de l'ARNP II

Ce domaine correspond à une séquence consensus d'un heptapeptide répété en tandem : Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser ($Y_1 S_2 P_3 T_4 S_5 P_6 S_7$). Cette séquence est très conservée mais le nombre de répétition varie entre les espèces : vingt-six répétitions chez la levure contre cinquante-deux chez l'homme. Au minimum huit répétitions sont indispensables à la viabilité de la levure (West and Corden 1995). De nombreuses évidences suggèrent que le CTD est très flexible et peut adopter différentes conformations : étendu, compacté et random coil (Meinhart et al. 2005) (Figure 1).

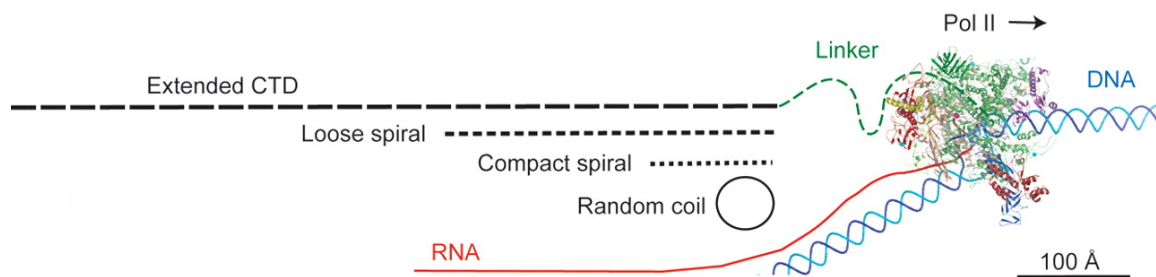


Figure 1 : Schématisation de la dimension relative du CTD de l'ARNP II en cours d'élongation (d'après Meinhart et al. 2005). Les différents états conformationnels du CTD sont représentés en noir tandis que la région faisant le lien flexible entre l'ARNP II et le CTD est symbolisée en vert.

La proximité du CTD et du canal de sortie de l'ARN naissant facilitent la coordination des étapes du cycle transcriptionnel avec les processus de maturation (pour revue Maniatis and Reed 2002). En effet, le CTD interagit directement ou indirectement avec les machineries de la biogénèse des mRNPs. Pour ce faire, cette plateforme de recrutement séquentiel des facteurs protéiques nucléaires est modulée par des modifications dynamiques et réversibles. Ces modifications du CTD sont de nature diverses et variées (pour revue Egloff and Murphy 2008) mais j'aborderai essentiellement les différents états de phosphorylation du CTD qui coordonnent les événements co-transcriptionnels. Les patterns séquentiels de phosphorylation des résidus sérines du CTD définissent, au cours du cycle de transcription, un code spatiotemporel orchestrant les engagements des différentes machineries de maturation (Zorio and Bentley 2004) (Figure 2 page 6).

Introduction

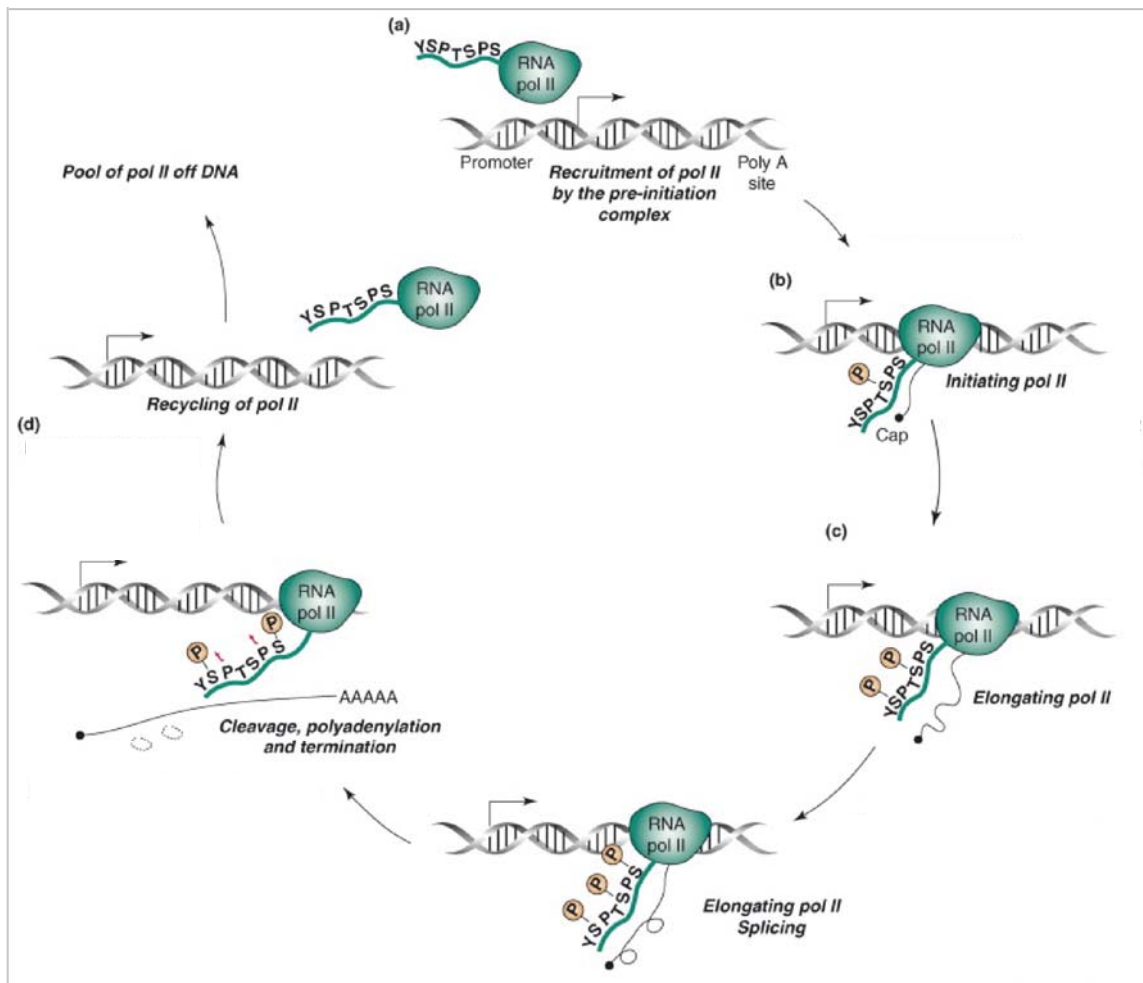


Figure 2 : Schématisation de la phosphorylation du CTD au cours de la transcription des gènes codant des protéines (d'après [Egloff and Murphy 2008](#)). (a) L'ARNP II ayant le CTD non-phosphorylé est recrutée par le complexe de pré-initiation au niveau du promoteur. (b) Au cours de l'initiation, la phosphorylation de la Ser5 du CTD par Kin28 facilite le recrutement des enzymes qui ajoutent la coiffe (représentée par un rond noir) à l'extrémité 5' du transcrit émergent. (c) La phosphorylation progressive de la Ser2 par Ctk1 stimule l'élongation et la maturation. La phosphorylation en Ser7 croît au cours de l'élongation tandis que la Ser5 est progressivement déphosphorylée. (d) Après clivage et polyadénylation de l'extrémité 3' du pré-ARNm, le CTD est déphosphorylé. L'ARNP II peut alors réitérer un nouveau cycle de transcription.

Le CTD sous sa forme non-phosphorylée s'associe à un complexe connu sous le nom de Médiateur pour faciliter la formation du complexe de pré-initiation (PIC : Pré-Initiation Complex) ([Lee and Young 2000](#)). Puis, au cours de l'initiation de la transcription, le CTD est

Introduction

phosphorylé en Ser5 par la kinase Kin28 du facteur général de transcription TFIIH (Hahn 2004). Cette modification induit la dissociation des facteurs d'initiation fixés au CTD ainsi que le recrutement des guanylyltransférase et 7-méthyltransférase. Ces enzymes ainsi que l'ARN triphosphatase synthétisent la coiffe de methylguanosine à l'extrémité 5' de l'ARNm. Ainsi, dès que l'ARN naissant (de près de 25 nucléotides) émerge du canal de sortie de l'ARNP II, son extrémité 5' est protégée des éventuelles dégradations par des exonucléases 5'-3' (McCracken et al. 1997; Shuman 1997; Komarnitsky et al. 2000). Le complexe CBC (Cap-Binding Complex) se fixe à la coiffe en apportant la stabilité du transcrit et en facilitant son export vers le cytoplasme (Lejeune et al. 2002).

La phosphorylation progressive de la Ser2 du CTD permet la conversion de l'ARNP II du stade d'élongation précoce vers une élongation processive (Peterlin and Price 2006). La phosphorylation est effectuée par les kinases Bur1 et la sous unité catalytique Ctk1 du complexe CTDK-1. Cette modification est activée via la déphosphorylation simultanée des Ser5 du CTD par les phosphatases Ssu72 et Rtr1. Ce changement d'état de phosphorylation active l'épissage des introns. En effet, il stimule l'assemblage d'un complexe dynamique ribonucléoprotéique : le spliceosome, constitué de 5 snRNPs riches en uridine et de protéines (Hirose and Manley 2000). Parmi ces protéines, certaines (riches en sérine/arginine) interagissent avec le CTD phosphorylé en Ser2 (Morris and Greenleaf 2000). Dans le chapitre suivant nous verrons que d'autres facteurs, impliqués dans la maturation de l'extrémité 3' des pré-ARNm, sont également recrutés lorsque la Ser2 du CTD est phosphorylée (Ahn et al. 2004). La déphosphorylation des Ser2 par la phosphatase Fcp1 facilite la terminaison c'est à dire la dissociation du complexe ternaire d'élongation (TEC : ADN-ARN-ARNP) (Phatnani and Greenleaf 2006).

Le modèle de phosphorylation du CTD en Ser5/Ser2 est essentiellement basé sur des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) en utilisant des anticorps spécifiques de la phosphorylation en Ser5 ou Ser2 du CTD. Une phosphorylation de la Ser7 du CTD à également été mise en évidence chez les mammifères grâce à un anticorps présentant une affinité pour les Ser7 phosphorylées (Chapman et al. 2007). Très récemment, des études ont révélé la bivalence de la kinase Kin28 par sa capacité à phosphoryler à la fois la Ser5 et la Ser7 dans les régions promotrices de certains gènes (Akhtar et al. 2009; Kim et al. 2009). Il semblerait que la phosphorylation en Ser7 soit indispensable pour l'association de l'ARNP II avec la machinerie de la maturation des snRNA (Chapman et al. 2007; Akhtar et al. 2009).

2. La maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm couplée à la terminaison poly(A)-dépendante

La terminaison permet la dissociation de l'ARNP II de sa matrice. Elle est très importante, non seulement pour éviter l'interférence avec la transcription des gènes situés en aval, mais aussi pour assurer la disponibilité d'un pool d'ARNP II afin de ré-initier une nouvelle transcription (Proudfoot 2004; Richard and Manley 2009). Deux modèles de terminaison de la transcription ont été proposés lors de ces deux dernières décennies bien qu'aucun n'ait pu faire l'unanimité.

D'après le modèle de terminaison allostérique, la dissociation du TEC serait induite par une déstabilisation et/ou un changement conformationnel du complexe d'élongation de l'ARNP II, après transcription d'un signal de polyadénylation (détaillé page 10).

Le modèle de terminaison torpedo, quant à lui, nécessite un clivage endonucléasique au niveau du site de polyadénylation du transcrit en cours d'élongation. Cette coupure du transcrit naissant crée un site d'entrée à une exonucléase 5'-3' dénommée Rat1. Cette enzyme dégrade le transcrit dépourvu de coiffe, qui est encore associé à l'ARNP II, et facilite la déstabilisation du complexe d'élongation (Dengl and Cramer 2009).

a) Un modèle de terminaison unifié

Rat1 semble être insuffisante au relargage de l'ARNP II, par ailleurs, elle favorise le recrutement de facteurs impliqués dans la maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm tels que Pcf11. Réciproquement, ces facteurs facilitent le recrutement de Rat1 sur le complexe d'élongation (Kim et al. 2004b; Luo et al. 2006). Le regroupement de plusieurs études a permis de proposer un modèle hybride qui inclut certains aspects des modes allostérique et torpedo. En effet, Luo et Bentley suggèrent qu'un complexe comprenant l'ARNP II, les facteurs de clivage interagissant avec le CTD phosphorylé et Rat1, se forme de manière coopérative aux abords du site poly(A). Ce complexe subirait plusieurs transitions au niveau du site de clivage : un changement allostérique du site catalytique de l'ARNP II qui diminue sa processivité ainsi qu'une dégradation Rat1-dépendante de l'ARN naissant. La dissociation de l'enzyme à sa matrice ADN serait alors facilitée par les facteurs de terminaison et la dissociation des facteurs d'élongation du TEC (Luo and Bentley 2004; Luo et al. 2006) (Figure 3 page 9).

Introduction

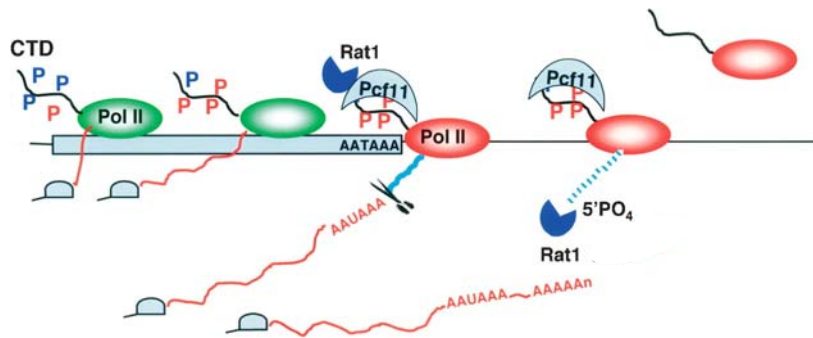


Figure 3 : Représentation schématique du modèle de terminaison unifiée (d'après [Luo and Bentley 2004](#)). Les Ser5 et Ser2 phosphorylées correspondent aux Ps bleu et rouge respectivement. Au niveau du site poly(A) (AATAAA), l'association coopérative de Rat1 et des facteurs de clivage/polyadénylation fixés au CTD phosphorylé en Ser2 est exemplifiée par le facteur Pcf11. Cette interaction serait à l'origine d'un changement allostérique (symbolisé par le changement de couleur du vert au rouge de l'ARNP II) favorisant la terminaison. L'ARN naissant en aval du site poly(A), coloré en bleu, est dégradé par l'exonucléases 5'-3' Rat1.

Consécutivement à la terminaison de la transcription, l'extrémité 3' libre des ARNm est stabilisée par polyadénylation. Ce processus est orchestré par la poly(A) polymérase de la machinerie de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm : Pap1. Elle participe à l'addition d'une succession de ribonucléotides adénosines à l'extrémité 3' du transcrit naissant. La taille de la queue poly(A) peut atteindre cinquante à soixante-dix résidus chez la levure. Cette queue poly(A) représente un gage de stabilité de l'ARNm. Toutefois, pour protéger davantage l'ARNm naissant des dégradations exonucléolytiques, des protéines dénommées PABPs (pour poly(A) Binding Proteins) se lient à la queue poly(A) du transcrit néo-synthétisé ([Proudfoot 2004](#); [Buratowski 2005](#)).

A ce jour, plusieurs aspects du mécanisme de terminaison restent à élucider. En effet, nous ne savons toujours pas comment s'effectue le choix du site de polyadénylation. Qui plus est, nous ignorons quelle est l'endonucléase spécifique de clivage du transcrit au niveau du site de polyadénylation.

b) La machinerie de maturation de l'extrémité 3' des pré-ARNm

La machinerie de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm participe à la reconnaissance co-transcriptionnelle du signal de polyadénylation. Ce dernier, localisé au sein des régions 3' non-traduites (3'UTR), est défini par quatre éléments de séquence : un élément d'efficacité (EE) riche en AU, l'élément de positionnement (PE) riche en A, le site de clivage et les éléments riches en U en amont et en aval du site de clivage (UUE et DUE) (Mandel et al. 2008) (Figure 4).

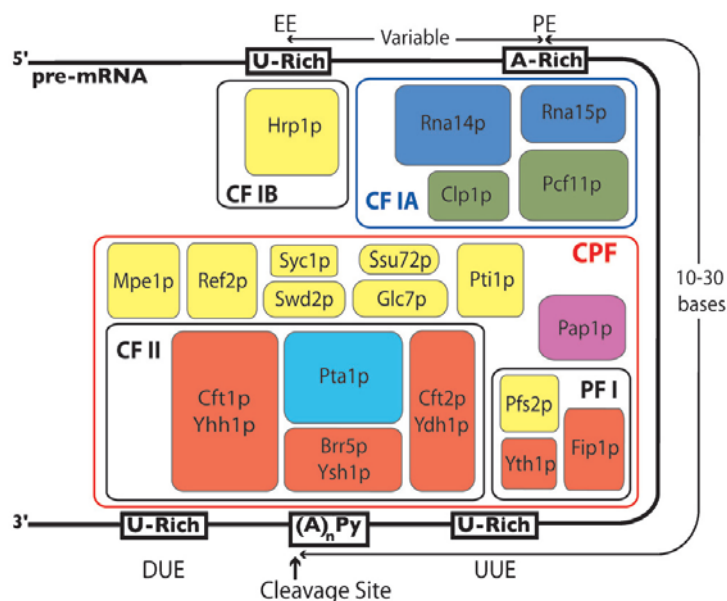


Figure 4 : Schématisation de la machinerie de maturation des pré-ARNm chez la levure (d'après Mandel et al. 2008). L'élément EE améliore l'efficacité de la maturation de l'extrémité 3' mais n'est pas requis pour le clivage. Situé en aval de l'élément EE, PE est localisé approximativement de 10 à 30 nucléotides en amont du site de clivage. Le site de clivage est généralement défini par un élément de séquence contenant des pyrimidines suivies par de multiples adénosines $(A)_nPy$. Les séquences riches en U (UUE et DUE) ont un rôle synergique avec le site de clivage.

Des études de purification par affinité couplées à une identification par spectrométrie de masse TAP-MS (Tandem Affinity Purification- Mass Spectrometry), ont mis en évidence de nombreux facteurs protéiques de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm (Gavin et al. 2002; Dheur et al. 2003) (tableau 1 page 11).

Introduction

	Protéines	Partenaires protéiques	Fonctions et caractéristiques structurales
CF IB	Hrp1	Rna14, Rna15	Impliquée dans le choix du site de polyadénylation (Minvielle-Sebastia et al. 1998)- interagit avec l'ARN au niveau de séquences riche en AU- contient deux domaines RRM (RNA Recognition Motif)
	Rna14	ARNP II CTD, Rna15, Pcf11	Protéine de structure nécessaire au clivage et à la polyadénylation du pré-ARNm- contient un domaine HAT (Half A Tétratricopeptide repeat) ainsi qu'un segment riche en proline
CF IA	Rna15	Pcf11, Rna14	Impliquée dans le choix du site de polyadénylation (Mandart and Parker 1995)- interagit avec l'ARN via son domaine RRM
	Pcf11	ARNP II CTD, Rna14, Rna15, Clp1, Swd2, Cft1/Yhh1, Cft2/Ydh1, Brr5/Ysh1, Pta1	Composant essentiel du CF IA impliquée dans la terminaison de la transcription, interagit avec le CTD de l'ARNP II- contient deux motifs en doigt de zinc
	Clp1	Brr5/Ysh1, Cft2/Ydh1, Pcf11	Impliquée dans le clivage et la polyadénylation- contient un motif Walker A et B de fixation à l'ATP
CPF	Cft1/Yhh1	ARNP II CTD, Fip1, Cft2/Ydh1, Swd2	Impliquée dans la reconnaissance du site Poly(A)- nécessaire au clivage et à la polyadénylation du pré-ARNm, interagit avec l'ARN
	Cft2/Ydh1	ARNP II CTD, Brr5/Ysh1, Cft1/Yhh1, Pta1, Pfs2, Ssu72, Pcf11, YDL094c	Impliquée dans la reconnaissance du site poly(A)- nécessaire au clivage et à la polyadénylation du pré-ARNm- interagit avec l'ARN au niveau de séquences riches en U- pouvant agir comme une protéine de structure- ne contient pas d'ion métal dans son domaine métallo-β-lactamase,
	Brr5/Ysh1	Pta1, Cft2/Ydh1, Yth1, Clp1, Syc1, Swd2	Endonucléase susceptible de participer à la réaction de clivage- nécessaire à la maturation de l'extrémité 3' des pré-ARNm, à l'épissage ainsi qu'à la terminaison de la transcription des ARNm et des snoRNA- contient un métal dans son domaine métallo-β-lactamase
	Pta1	ARNP II CTD, Brr5/Ysh1, Syc1, Cft2/ydh1, Swd2, Glc7, Pti1, Ssu72	Impliquée dans la terminaison de la transcription des ARNm et des snoRNA- réalise des interactions pour le pontage entre le CPF et le CF IA
	Yth1	Fip1, Brr5/Ysh1	Nécessaire au clivage et à la polyadénylation du pré-ARNm- interagit avec l'ARN au niveau de séquences riches en U- contient cinq doigts de zinc
	Fip1	Pap1, Yth1	Interagit directement avec Pap1 et régule son activité- impliquée dans la sélection du site de polyadénylation- interagit avec l'ARN au niveau de séquences riches en U
	Pfs2	Fip, Brr5/Ysh1, Swd2, Rna14	Essentielle aux réactions de clivage et de polyadénylation- permet le pontage entre différents facteurs de maturation facilitant l'assemblage de la machinerie de maturation
	Mpe	L'ensemble des protéines du CPF	Membre fonctionnel du CPF nécessaire au clivage et à la polyadénylation du pré-ARNm- contient un zinc knuckle
	Ref2	Swd2	Améliore l'efficacité de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm- impliquée dans le clivage des ARNm et des snoRNA
	Syc1	Pta1, Brr5/Ysh1	Impliquée dans la terminaison des ARNm et des snoRNA- régulerait négativement la maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm par compétition avec le domaine C-terminal de Brr5/Ysh1
	Swd2	Pta1, Cft1/Yhh1, Brr5/Ysh1, Pta1, Pfs2, Ref2, Ssu72, Glc7, Pti1, Pcf11, Set1	Impliquée dans la terminaison des ARNm- permet au complexe CPF d'interagir avec d'autres protéines afin d'établir des connexions multiples avec la transcription- sous-unité du complexe COMPASS permettant la méthylation de l'histone H3 et de la lysine 4.
	Ssu72	Pta1, Cft2/Ydh1, ARNP II Rpb2, TFIIB	Phosphatase de la Ser5 du CTD- impliquée dans la réaction de clivage mais aussi dans la sélection du site d'initiation de la transcription
	Glc7	Pta1, Pti1	Phosphatase qui déphosphoryle Pta1- impliquée dans la polyadénylation des pré-ARNm et la maturation de l'extrémité 3' des snoRNA
	Pti1	Rna14, Pcf11, Pta1, Glc7	Impliquée dans la terminaison de la transcription des ARNm et des snoRNA- contient un domaine RRM
	Pap1	Fip1	Impliquée dans les réactions de clivage et de polyadénylation- ajoute une queue poly(A) au pré-ARNm- nécessaire à l'export des ARNm
	CTD de l'ARNP II	Cft2/Ydh1, Cft1/Yhh1, Pcf11, Rna14, Pta1	Intervient dans la terminaison de la transcription
	Pab1	Rna15	Stimule la polyadénylation et stabilise la queue poly(A)- protéine à l'origine d'une interaction avec la coiffe de l'ARNm- contient un domaine RRM

Tableau 1 : Fonctions et caractéristiques structurales des différents facteurs protéiques composant la machinerie de maturation des pré-ARNm chez *Saccharomyces cerevisiae* (d'après Mandel et al. 2008).

Introduction

A ce jour, vingt facteurs ont été découverts par cette approche TAP-MS chez la levure. Cependant, d'autres facteurs seraient probablement impliqués dans la maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm car cette méthode ne permet pas de détecter les interactions transitoires. Présentement, la machinerie de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm est constituée de différents sous-complexes comprenant : le facteur de clivage et de polyadénylation (CPF) ainsi que les facteurs de clivage IA et IB (CF IA - CF IB). Nedeia et collaborateurs ont isolé un complexe multi-protéique : l'holo-CPF, constitué du facteur CPF ainsi qu'un complexe APT (pour Associated with the Pta1 subunit of CPF) dans lequel les protéines Pti1, Swd2, Glc7, Ssu72, Ref2 et Syc1 sont associées à la sous-unité Pta1 (Nedeia et al. 2003).

Des expériences de ChIP indiquent que les facteurs Pcf11, Fip1 et Hrp1 sont recrutés à l'extrémité 5' et 3' du gène (Licatalosi et al. 2002). Les interactions physiques de ces facteurs à la fois avec les régions promotrices et terminatrices du gène favorisent l'apparition de « gene loops » (Calvo and Manley 2003; O'Sullivan et al. 2004; Ansari and Hampsey 2005). D'après ce modèle de « gene looping », la proximité des régions 5' et 3' du gène faciliterait la ré-initiation transcriptionnelle d'un même gène.

Le CTD est l'élément clé de la maturation de l'extrémité 3' des pré-ARNm car il coopère au recrutement de la machinerie nécessaire au processus de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm. Par conséquent, les cellules pourvues d'un CTD tronqué présentent une faible efficacité de terminaison de la transcription ARNP II-dépendante ainsi que des ARNm ayant une queue poly(A) plus courte (McCracken et al. 1997). Le CTD est en interaction directe avec certains facteurs de la machinerie de maturation de l'extrémité 3' des pré-ARNm tels que Pcf11, Rna14, Cft1/Yhh1, Cft2/Ydh1 et Pta1. D'autres facteurs comme Rna15 coopèrent avec le CTD de façon indirecte (Barilla et al. 2001; Kyburz et al. 2003; Ahn et al. 2004; Kim et al. 2004a; Noble et al. 2005; Luo et al. 2006). La protéine Pcf11 comporte un Domaine d'Interaction au CTD (CID). Elle est spécifiquement recrutée en fonction de l'état de phosphorylation du CTD et contribue à la terminaison des ARNm (Kim et al. 2004b).

(1) Pcf11

Pcf11 est une sous-unité du facteur CF IA qui contient une région conservée (essentielle pour la viabilité de la cellule) correspondant aux 130 résidus N-terminaux de la protéine : le CID (Sadowski et al. 2003) (Figure 5 page 13).

Introduction

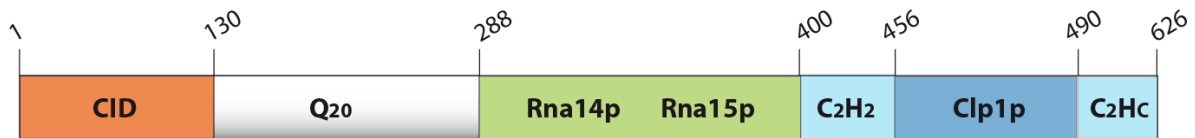


Figure 5 : Représentation schématique de la protéine Pcf11 en différents domaines (d'après Sadowski et al. 2003). Sur cette séquence d'acides aminés, le CID est indiqué en orange, suivie par un segment représenté en gris, comprenant vingt glutamines consécutives (Q20) entre les acides aminés 234 et 253. Les domaines d'interaction aux protéines Rna14 et Rna15 d'une part et Clp1 d'autre part sont représentés en vert et bleu respectivement. Les deux motifs en doigt de Zinc (C₂H₂ et C₂HC) sont indiqués en bleu turquoise.

Des études biochimiques ont mis en évidence que Pcf11 pouvait interagir avec la forme non-phosphorylée du CTD. Cependant, Pcf11 présente une affinité nettement plus importante avec la forme phosphorylée en Ser2 (Barilla et al. 2001). En effet, la structure cristalline du CID de Pcf11 en complexe avec le peptide CTD phosphorylé indique que le CID de Pcf11 reconnaît la Ser2 phosphorylée (Meinhart and Cramer 2004). D'après cette structure cristalline, l'interaction résulte d'une stabilisation du CTD en feuillet- β via des liaisons hydrogènes intramoléculaires. Celles-ci sont formées entre le phosphate de la Ser2 et les acides-aminés 68 et 69 de Pcf11 tandis que l'acide aminé 70 interagirait avec des résidus hydrophobes du core de la protéine (Meinhart and Cramer 2004). Néanmoins, le CID de Pcf11 ne se fixe pas exclusivement au CTD car il est aussi capable d'interagir avec la molécule d'ARN (Zhang et al. 2005). Des analyses structurales suggèrent qu'il existe une compétition entre les interactions du CID de Pcf11 avec le CTD et l'ARN. Ce mécanisme de compétition du peptide et de l'ARN vis-à-vis de Pcf11 serait requis pour la perturbation de l'interaction CF IA - ARNP II au profit de la fixation du complexe CF IA à l'ARN uniquement (Hollingworth et al. 2006).

Pcf11 est une protéine ayant deux fonctions bien distinctes qui ne sont pas couplées *in vivo* : d'une part l'activité de clivage/polyadénylation et d'autre part son rôle de terminateur de la transcription (Kyburz et al. 2003; Sadowski et al. 2003). Ainsi, certaines mutations du CID de Pcf11 n'affectent pas le clivage et la polyadénylation mais provoquent une terminaison transcriptionnelle incorrecte. Par l'intermédiaire d'un pontage entre le CTD et le transcrit naissant, Pcf11 serait à l'origine du changement conformationnel du complexe

d'élongation de l'ARNP II. En effet, des études ont montré que les 140 acides-aminés N-terminaux de Pcf11 étaient suffisants pour démanteler le complexe d'élongation *in vitro* en exerçant une force sur le transcrit naissant (Zhang et al. 2005). Des études chez la *drosophile* ont précisé que l'implication de Pcf11 dans le démantèlement du complexe d'élongation était dépendant des sites de pause (Zhang and Gilmour 2006). Néanmoins, Pcf11 ne serait pas le seul facteur impliqué dans ce phénomène. Le recrutement de facteurs régulant négativement l'élongation, ainsi que la dissociation de facteurs d'antiterminaison, pourraient également favoriser la terminaison (Bucheli and Buratowski 2005).

3. La terminaison poly(A)-indépendante

Les transcrits sn/snoRNA primaires présentent une extrémité 3' prolongée qui est ensuite maturée. Ce processus est initié par un clivage endonucléasique Rnt1-dépendant, spécifique de structures ARN en tige-boucle (Chanfreau et al. 1998). Cette coupure génère un site d'entrée à une exonucléase qui dégrade le transcrit de 3' en 5' jusqu'à ce que le complexe Nrd1c empêche l'enzyme de progresser.

a) Le complexe Nrd1c

Nrd1 est une protéine de fixation à l'ARN impliquée dans la terminaison des sn/snoRNA et de quelques transcrits ARNm. Elle est détectée par CHIP, principalement au niveau des régions promotrices, sur les gènes snoRNAs (Kim et al. 2006) mais aussi sur certains gènes codant pour des protéines (Nedea et al. 2003). Elle interagit avec deux autres protéines pour constituer le complexe Nrd1c: l'hélicase Sen1 (Steinmetz et al. 2001; Ursic et al. 2004; Vasiljeva and Buratowski 2006) ainsi qu'une protéine de fixation à l'ARN, Nab3 (Yuryev et al. 1996). Les protéines Nrd1 et Nab3 reconnaissent spécifiquement des séquences d'ARN localisées en aval de l'extrémité 3' des sn/snoRNAs matures (GUAA/G et UCUU respectivement) (Conrad et al. 2000; Steinmetz et al. 2001; Carroll et al. 2007). Certains terminateurs des snoRNA contiennent de multiples sites de fixation potentiels Nrd1 et Nab3 induisant la formation d'hétérodimère par recrutement coopératif (Carroll et al. 2007). Buratowski et ses collaborateurs ont mis en évidence des interactions physiques entre le complexe Nrd1c et CBC, ainsi qu'avec la forme nucléaire de l'exosome (Vasiljeva and Buratowski 2006). L'exosome est un complexe multiprotéique ayant une activité 3'-5' exonucléase qui est détaillé page 25-26. C'est ce complexe qui participe à la dégradation de l'ARN naissant de 3' vers 5' jusqu'à rencontrer le complexe Nrd1c fixé à des éléments ARN

Introduction

à l'extrémité 3' du sn/snoRNA mature (Allmang et al. 1999b). Le complexe Nrd1c est très important fonctionnellement puisque les mutations de Nrd1 et de Sen1, de même que les mutations des sites de fixation de Nrd1 et Nab3, génèrent des défauts de terminaison des sn/snoRNA (Carroll et al. 2004; Kim et al. 2006).

Nrd1 est une protéine comportant un CID qui présente une structure cristalline similaire au CID de Pcf11 (Vasiljeva et al. 2008). Mais à l'instar de Pcf11, Nrd1 contient un CID qui interagit spécifiquement avec le CTD phosphorylé en Ser5. Cette affinité a été révélée par des expériences de ChIP ainsi que des études d'interaction *in vitro* avec des peptides CTD mimétiques non-phosphorylés ou phosphorylés en Ser2 ou Ser5 (Conrad et al. 2000; Gudipati et al. 2008; Vasiljeva et al. 2008). Des expériences de TAP-tag et d'immunoprécipitation suggèrent que Nrd1 recrute l'exosome nucléaire afin de faciliter la reconnaissance de certains ARNs qui sont des cibles pour la machinerie de dégradation des ARNs (Vasiljeva and Buratowski 2006). D'après le modèle de Buratowski, Nrd1 pourrait influencer le choix du mode « dégradation » ou « maturation » de l'exosome nucléaire (Figure 6).

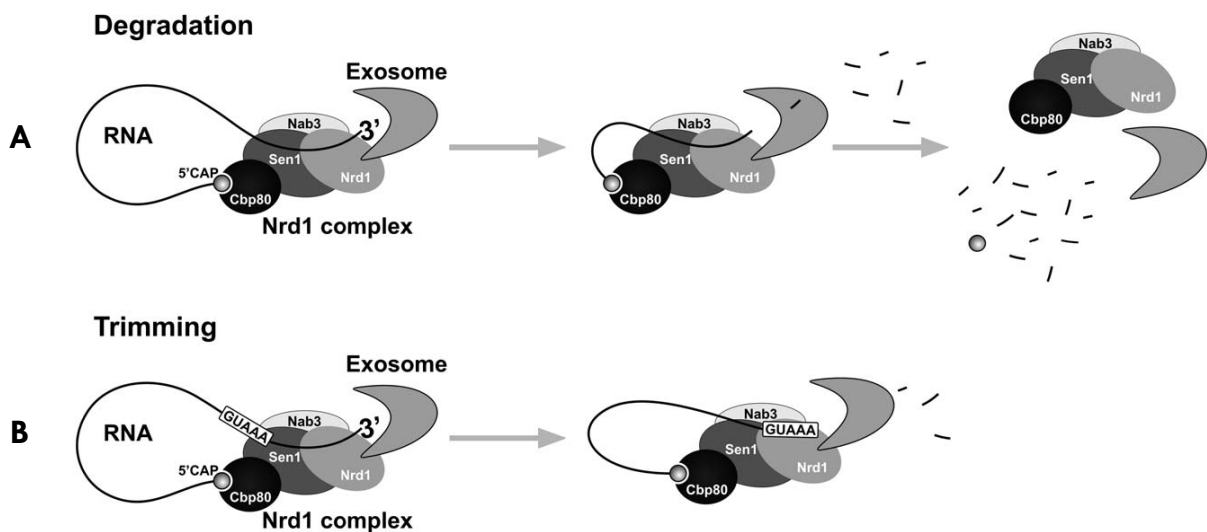


Figure 6 : Modes de « dégradation » (A) et de « maturation » (B) de l'exosome nucléaire orchestrés par Nrd1 (d'après Vasiljeva and Buratowski 2006). (A) Au cours du mode de dégradation, le complexe Nrd1c recrute l'exosome sur un substrat ARN pour favoriser sa dégradation. Cette voie peut être utilisée soit pour la dégradation des ARNm NRD1 et NAB3 car leur synthèse est autorégulée, soit pour les ARNm qui ne sont pas correctement maturés. (B) Lors du mode de maturation de l'exosome, le complexe Nrd1c recrute l'exosome qui dégrade l'ARN de 3' vers 5' de façon processive jusqu'aux sites de fixation Nrd1/Nab3. Cette voie peut être utilisée pour la maturation de l'extrémité 3' correcte des sn/snoRNA.

Introduction

Des études récentes indiquent que le complexe Nrd1c est également impliqué dans la terminaison d'une nouvelle classe de transcrits ARNP II-dépendants : les transcrits cryptiques instables (CUTs). Ces transcrits, originaires de près de 10 % des régions intergéniques, sont de petits ARNs non-codants de 300 à 600 nt (Neil et al. 2009). Ils ont été détectés après analyse du transcriptome par microarray dans une souche de levure dépourvue de la principale exonucléase 3'-5' de l'exosome nucléaire : Rrp6 (Wyers et al. 2005; Davis and Ares 2006). Dans cette souche, les CUTs présentant une extrémité 3' hétérogène s'accumulent. En effet, suite à la terminaison dépendante du complexe Nrd1c *in vivo*, les CUTs seraient rapidement polyadénylés par un cofacteur de l'exosome : le complexe TRAMP (dont le mécanisme d'action est détaillé page 27-28) puis dégradés par l'exosome nucléaire (Wyers et al. 2005; Arigo et al. 2006a; Thiebaut et al. 2006).

Malgré les différences mécanistiques entre la terminaison des sn/snoRNA, des CUTs et des mRNA, certains facteurs de maturation de l'extrémité 3' du transcrit sont impliqués dans plusieurs modes de terminaison (Morlando et al. 2002; Lykke-Andersen and Jensen 2007). Cependant, nous ignorons pourquoi certains facteurs de clivage et de polyadénylation plutôt que d'autres sont impliqués dans divers modes de terminaison. Ce recouvrement multifonctionnel des facteurs de maturation de l'extrémité 3' du transcrit a été évoqué en raison de l'absence d'altération de la terminaison poly(A)-dépendante d'un ARNm comportant des régions terminatrices des snoRNA en 3' UTR (Steinmetz et al. 2006a). Le contexte spécifique semble donc être important pour le choix du système de terminaison. De plus, les terminateurs des snoRNA présentent des similarités de séquence avec le signal consensus de polyadénylation (Steinmetz and Brow 2003; Steinmetz et al. 2006a).

4. Le choix du système de terminaison

Le sous-complexe APT de l'holo-CPF ainsi que les sous-unités Pcf11, Rna14 et Rna15 du complexe CFI A sont impliqués dans la maturation couplée à la terminaison des mRNA et des sn/snoRNA (Dheur et al. 2003; Ganem et al. 2003; Nedea et al. 2003; Nedea et al. 2008). De plus, le complexe Nrd1c assure également la régulation de l'expression de certains ARNm par terminaison, indépendamment du site de polyadénylation (Arigo et al. 2006b; Steinmetz et al. 2006b; Ciais et al. 2008) (Figure 7 page 17).

Introduction

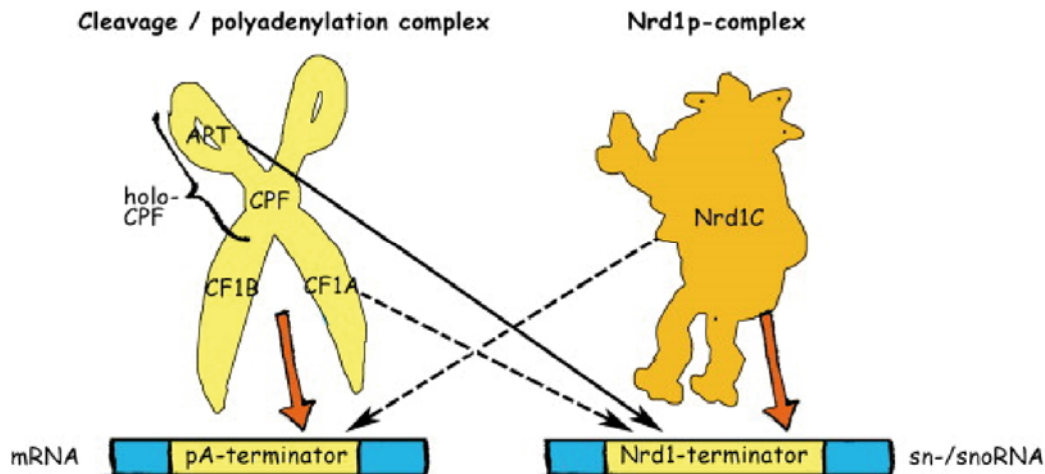


Figure 7 : Fonctions partagées de certains facteurs spécifiques au cours de la maturation et de la terminaison des transcrits ARNP II-dépendants (d'après [Lykke-Andersen and Jensen 2007](#)). Le complexe de clivage/polyadénylation ainsi que le complexe Nrd1c, représentés en jaune et orange respectivement, sont schématisés au dessus des terminateurs auxquels ils sont associés généralement (flèche rouge). Le sous-complexe APT agit aussi sur le terminateur des sn/snoRNA (flèche pleine noire). Les complexes Nrd1 et CFI A sont tous deux impliqués simultanément dans la terminaison des sn/snoRNA et des ARNm (flèche pointillée noire).

Les laboratoires de Libri et de Buratowski suggèrent que le choix du mode de terminaison dépend de l'état de phosphorylation du CTD de l'ARNP II en cours de transcription ([Gudipati et al. 2008](#); [Vasiljeva et al. 2008](#)). Lorsque l'ARNP II synthétise des transcrits courts, la phosphorylation de son CTD en Ser5 est prédominante. Ces transcrits sont alors terminés par un mécanisme Nrd1-dépendant. A l'inverse, les transcrits longs qui sont le plus souvent des ARNm, sont associés à une phosphorylation du CTD en Ser2 accrue au niveau de l'extrémité 3' du gène. Dans ce contexte favorable au recrutement de Pcf11, l'action de Rat1 est facilitée, générant alors la terminaison polyadénylation-dépendante ([Rondon et al. 2008](#)).

Nous avons d'ores et déjà pu constater que la biogénèse des mRNPs suscite le recrutement concomitant de multiples facteurs de maturation interagissant avec l'ARN et l'ARNP II ([Zenklusen and Stutz 2001](#); [Sommer and Nehrbass 2005](#); [Kohler and Hurt 2007](#)). L'ensemble des machineries protéiques d'assemblage qui participent à la formation des mRNPs sont essentielles à l'acquisition de la compétence à l'export des mRNPs vers le

cytoplasme (Jensen et al. 2001a; Hammell et al. 2002; Kim et al. 2004b; Vinciguerra and Stutz 2004).

B. A l'interface entre la biogénèse et l'export des mRNPs

L'interaction dynamique des différentes classes de protéines constituant les mRNPs est coordonnée afin de guider l'ARN vers les pores nucléaires (Iglesias and Stutz 2008; Luna et al. 2008) (Figure 8).

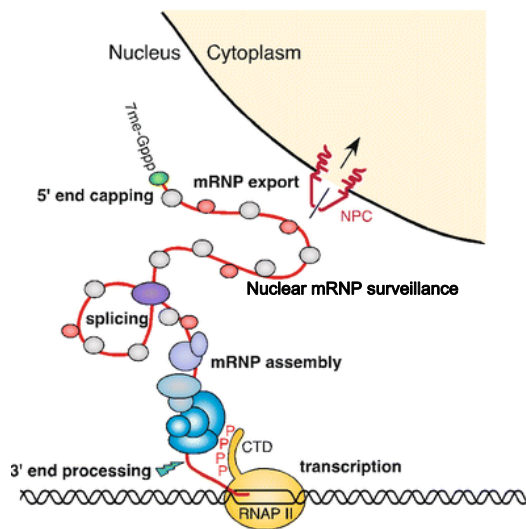


Figure 8 : Schéma simplifié de la transcription coordonnée aux différentes étapes de formation des mRNPs (d'après Luna et al. 2008).

La majorité des protéines composant les mRNPs présente de multiples fonctions au cours de l'expression des gènes et toutes sont essentielles à l'export des mRNPs. Certaines protéines, appelées adaptatrices, permettent d'accompagner les mRNPs vers les pores nucléaires grâce à leurs interactions avec l'ARN et le récepteur nucléaire (Zenklusen et al. 2002; Vinciguerra and Stutz 2004). Ce dernier est une unité structurale et fonctionnelle composé d'un hétérodimère : Mex67-Mtr2 qui est recruté par la machinerie transcriptionnelle, indépendamment de l'ARN. Son rôle est de favoriser la translocation des mRNPs cargo vers le cytoplasme grâce à son interaction avec des nucléoporines (Strasser et al. 2000).

1. Les protéines composant les mRNPs

a) Des facteurs de maturation du pré-ARNm

Le CBC qui protège l'extrémité 5' de l'ARN naissant interagit physiquement avec une protéine adaptatrice : Npl3, ainsi qu'avec le facteur de remodelage des mRNPs THO, détaillé ultérieurement (Cheng et al. 2006).

Les protéines Pab1 et Nab2, en contact avec la queue poly(A) du transcrit, participent au couplage entre la maturation de l'extrémité 3' et l'export (Brown and Sachs 1998; Dunn et al. 2005). En ce sens, il a été montré que Nab2 interagit avec la protéine de contrôle périnucléaire : Mlp1 (Myosine-Like Protein 1), dont le rôle est explicité page 30-31 (Fasken and Corbett 2005; Vinciguerra et al. 2005).

b) La protéine Sub2

Sub2 est une protéine de la superfamille des ARN hélicases ATP-dépendantes à boîte DEAD (Linder and Stutz 2001) qui participe à l'épissage et qui est essentielle à l'export des mRNPs (Fleckner et al. 1997; Jensen et al. 2001b; Libri et al. 2001). D'après le modèle actuel, Sub2 est recrutée très rapidement sur le transcrit émergent puis elle s'associe à la protéine adaptatrice : Yra1.

c) Les protéines adaptatrices

(1) *Yra1*

La protéine Yra1 est un membre de la famille des protéines REFs (pour RNA Export Factor) (Strasser and Hurt 2000). Elle est considérée comme le principal adaptateur à l'export puisqu'elle est l'une des premières protéines recrutée par la machinerie transcriptionnelle (Cole 2000; Strasser and Hurt 2000; Zenklusen et al. 2002). L'association de Yra1 au transcrit se fait par l'intermédiaire de la protéine Sub2, indépendamment de l'ARN (Strasser et al. 2002; Abruzzi et al. 2004). Des résultats biochimiques complémentaires suggèrent que c'est uniquement après la fixation initiale à Pcf11 que Yra1 serait transféré à Sub2 (Johnson et al. 2009; Saguez and Jensen 2009). Pour faciliter l'export des mRNPs, Yra1 interagit avec le récepteur nucléaire via le domaine N-terminal de la protéine Mex67 puis se dissocie de Sub2 (Strasser and Hurt 2000; Zenklusen et al. 2001; Reed and Hurt 2002; Iglesias and Stutz 2008).

(2) *Npl3*

Plusieurs protéines SR (riche en sérine/arginine) participent au métabolisme de l'ARN (Hurt et al. 2004; Windgassen et al. 2004). Npl3, est une protéine SR qui est recrutée abondamment sur le transcrit précoce. Elle interagit avec l'ARNP II puis reste fixée à l'ARN pendant sa translocation vers le cytoplasme (Lei et al. 2001). Outre les diverses implications de Npl3 dans la biogénèse des mRNPs (Bucheli and Buratowski 2005; Kress et al. 2008), elle participe à la formation de l'extrémité 3' des pré-ARNm ainsi qu'à l'export des transcrits (pour revue Iglesias and Stutz 2008). L'interaction de l'adaptateur Npl3 avec le récepteur nucléaire Mex67-Mtr2 est dépendante de sa déphosphorylation par Glc7 (Gilbert and Guthrie 2004). Cette déphosphorylation coïncide avec la dissociation du complexe CPF/CF des transcrits, ce qui renforce l'implication de Npl3 dans le couplage entre la formation de l'extrémité 3' des pré-ARNm et l'export (Iglesias and Stutz 2008).

d) Le complexe THO

Il y a plus de deux décennie, la protéine Hpr1 a été caractérisée par un crible génétique (Aguilera and Klein 1988) car sa délétion stimule les phénomènes d'hyper-recombinaison (Chavez and Aguilera 1997; Huertas and Aguilera 2003). Un suppresseur multicopie du mutant *hpr1Δ* correspondant à l'ORF *THO2* a été isolé (Piruat and Aguilera 1998). Des analyses d'interactions *in vivo*, par immunoprécipitation en utilisant la protéine Tho2 étiquetée, ont permis d'isoler un complexe oligomérique : THO, composé de quatre protéines : Tho2, Hpr1, Mft1 et Thp2. La délétion de chacun de ces gènes génère des instabilités génomiques ainsi qu'une diminution de l'efficacité d'élongation de la transcription (Chavez et al. 2000; Jimeno et al. 2002; Aguilera 2005). Les facteurs du complexe THO sont donc impliqués à la fois dans la transcription, le maintien de l'intégrité du génome mais aussi dans l'export (Libri et al. 2002; Strasser et al. 2002; Mason and Struhl 2005). Le recrutement co-transcriptionnel du complexe THO est facilité par l'interaction directe de Hpr1 avec Sub2 (Zenklusen et al. 2002; Abruzzi et al. 2004). La protéine Hpr1, sous sa forme ubiquitinylée, permet le recrutement du récepteur nucléaire en interagissant avec le domaine C-terminal de Mex67 (Dieppois et al. 2006; Gwizdek et al. 2006). En regroupant l'ensemble des interactions génétiques et biochimiques, le laboratoire de Stutz a établi la connexion entre le complexe THO et les protéines Sub2 et Yra1, pour former un complexe TREX (pour TRanscription et EXport) (Zenklusen et al. 2002) (Figure 9 page 21).

Introduction

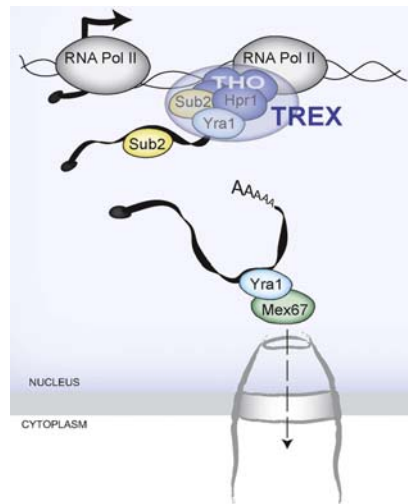


Figure 9 : Modèle simplifié de l'export des mRNPs (d'après *Iglesias and Stutz 2008*).

Plusieurs études suggèrent que le complexe Sub2-THO est indispensable pour coordonner la maturation de l'extrémité 3' du transcrit avec l'acquisition de la compétence pour l'export. En effet, Sub2-THO est nécessaire à la maturation de l'extrémité 3' des pré-ARNm car des mutants de THO interagissent génétiquement avec des mutants de la machinerie de formation de l'extrémité 3' (*Saguez et al. 2005; Saguez et al. 2008*). De plus, des analyses réalisées sur la chromatine insoluble par Fractionnement Différentiel de la Chromatine (DCF) ont montré une accumulation d'intermédiaires de la biogénèse des mRNPs chez des mutants de Sub2 et de THO (*Rougemaille et al. 2008b*). Ces intermédiaires, incapables de se dissocier des mRNPs, correspondent à des facteurs du NPC (Nuclear Pore Complex) et des facteurs de polyadénylation du complexe CPF/CF (Figure 10 page 22).

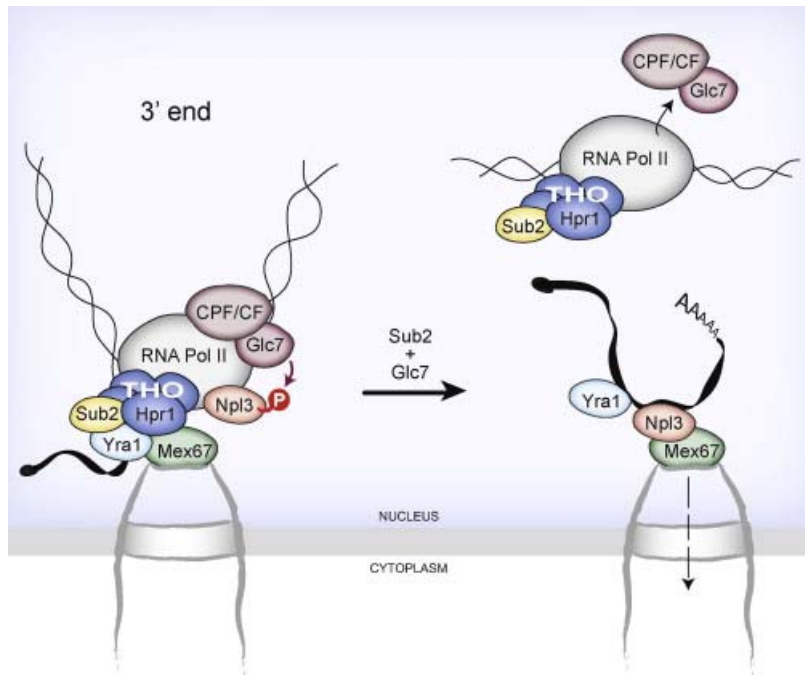


Figure 10 : Série d'étapes dynamiques et coordonnées impliquant l'hélicase Sub2 et la phosphatase de Npl3 : Glc7, pour le remodelage de l'extrémité 3' du transcrit (d'après Iglesias and Stutz 2008). Dans un contexte sauvage, l'export des mRNPs s'effectue après fixation de Mex67 aux mRNPs via son interaction avec les protéines adaptatrices Yra1 et/ou Npl3. Puis, le récepteur Mex67 interagit avec des facteurs du NPC pour faciliter la translocation des mRNPs à travers le NPC (à droite). Les activités enzymatiques de Glc7 et de Sub2 sont nécessaires au recrutement de Mex67 par l'adaptateur Npl3 d'une part, à la dissociation entre le complexe CPF/CF et le mRNP d'autre part, mais aussi à la dissociation de l'ARNm du site de transcription. La perte de fonction de Sub2 et de THO conduit à la formation d'un très gros complexe, appelé DCF, bloqué au niveau du NPC (à gauche). Ainsi, le mRNP est incapable de se dissocier du complexe CPF/CF pour être exporté vers le cytoplasme.

e) Le complexe TREX-2

Le complexe TREX-2, mis en évidence au laboratoire de Hurt, participe également au couplage entre la transcription et l'export des ARNm (Fischer et al. 2002; Rodriguez-Navarro et al. 2004). Ce complexe est constitué de Sac3, Thp1, ainsi qu'une protéine du complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase) : Sus1, qui participe à l'activation de la transcription (Gallardo and Aguilera 2001). Cette dernière est recrutée au niveau de la région promotrice tandis que la protéine Sac3 est associée au NPC. Le gène Sac3 a été isolé à partir

Introduction

d'un crible de létalité synthétique avec l'allèle *yra1-RRMΔ* (Fischer et al. 2002). Sac3 interagit avec Thp1 qui est impliqué dans l'élongation de la transcription et la stabilité du génome (Fischer et al. 2002). Les mutations de chacun des facteurs Thp1, Sac3 et Sus1 induisent des phénotypes de rétention des ARNm (Fischer et al. 2002). Le facteur Sus1, quant à lui, est impliqué dans deux processus distincts car sa délétion génère des défauts tant transcriptionnels que liés à l'export des transcrits. Le modèle actuel suggère que le complexe TREX-2 se fixe à l'ARNm durant la transcription, interagit avec Sub2 via Sac3 pour ensuite se lier à Mex67 (Fischer et al. 2002; Strasser et al. 2002). Ainsi, le complexe TREX-2 se fixe au NPC via Nup1 et Nup60 afin de garantir l'export des mRNPs (Rodriguez-Navarro et al. 2004) (Figure 11).

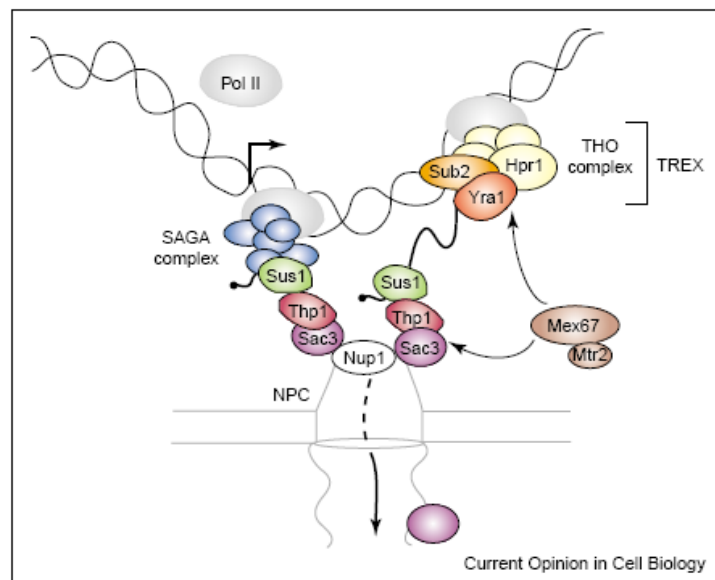


Figure 11 : Modèle de transcription couplé à l'export par le complexe TREX-2 (*Sus1-Thp1-Sac3*) et TREX (*THO-Sub2-Yra1*) (d'après Vinciguerra and Stutz 2004). La protéine Sus1 est connectée, d'une part au complexe SAGA qui est impliqué dans l'initiation de la transcription et d'autre part au complexe *Thp1-Sac3* qui est associé au NPC via Nup1. La protéine Sac3 peut faciliter le chargement du mRNP sur le NPC en interagissant avec Mex67 et les nucléoporines. Les facteurs d'export Sub2 et Yra1 se fixent au transcrit naissant pendant l'élongation de la transcription au cours d'un processus qui est facilité par le complexe THO. Yra1 recrute le récepteur d'export Mex67 qui cible les mRNPs vers le NPC tandis que Mex67 interagit avec Sac3.

Introduction

Le complexe TREX-2, tout comme Mex67, participe au processus de « gene anchoring » qui consiste à la relocalisation des gènes transcriptionnellement actifs à la périphérie du noyau (Casolari et al. 2004; Cabal et al. 2006; Dieppois et al. 2006). D'après le modèle de « gene gating » proposé par Bobel en 1985, cet ancrage des gènes actifs au NPC favoriserait la coordination des différents processus de l'expression des gènes : transcription, maturation, contrôle qualité et export (Kohler and Hurt 2007).

2. La translocation des mRNPs à travers le NPC

Le mouvement unidirectionnel des mRNPs du noyau vers le cytoplasme nécessite d'une part, la dissociation du transcrit aux récepteurs nucléaires Mex67- Mtr2 et d'autre part, un moteur moléculaire permettant la translocation des mRNPs à travers le pore nucléaire. Ce puissant moteur moléculaire impliqué dans l'export est une ARN hélicase ATP-dépendante à boîte DEAD : Dbp5 (Iglesias and Stutz 2008). Cette hélicase est concentrée dans le cytoplasme où elle interagit avec 2 nucléoporines : Nup159 et Gle1 (Schmitt et al. 1999; Weirich et al. 2006). Cependant, Dbp5 serait recrutée dès l'initiation de la transcription grâce à son interaction avec TFIIH (Hodge et al. 1999). Comme d'autres hélicases, Dbp5 est capable de dissocier les protéines fixées à l'ARN, car il a été constaté que Dbp5 démantèle l'interaction entre la mRNP et des facteurs d'exports, comme Nab2 (Lund and Guthrie 2005; Tran et al. 2007).

La formation et l'export des mRNPs requièrent pléthore d'évènements nucléaires co-transcriptionnels de maturation et d'empaquetage. Cette biogénèse des mRNPs représente un coût énergétique très important, c'est pourquoi elle est très régulée. En effet, le métabolisme de l'ARN produit une grande diversité de substrats à dégrader, comme des sous-produits d'épissage ou de maturation des ARNr, des ARNm non-fonctionnels, des ARNs non-codants mal repliés, ou encore des transcrits en fin de vie. L'accumulation physiologique de ces macromolécules anormales peut, au cours du temps, devenir dommageable à la survie cellulaire : leur élimination est par conséquent essentielle. D'autre part, les nucléotides issus de leur dégradation peuvent être recyclés pour synthétiser de nouveaux acides nucléiques.

L'ensemble des étapes de la formation des mRNPs est alors contrôlé par des mécanismes de surveillance afin d'empêcher l'export vers le cytoplasme de transcrits défectueux. Ainsi, les transcrits aberrants, dépourvus de protéines cruciales, sont séquestrés

Introduction

puis éliminés par le système de contrôle qualité des mRNPs. En effet, la mutation de chacune des protéines composantes des mRNPs génère des phénotypes communs d'accumulation de transcrits dans le noyau de la cellule et une diminution de la quantité de transcrit.

Au cours du chapitre suivant, je détaillerai tout d'abord la machinerie de contrôle qualité nucléaire, puis nous aborderons le mécanisme de reconnaissance et d'activation de ce complexe. Enfin, je décrirai comment cette dégradation est connectée à la machinerie de transcription ainsi qu'à l'export.

C. La dégradation des ARNs aberrants couplée à la biogénèse des mRNPs

Le contrôle qualité nucléaire implique deux complexes enzymatiques ayant des activités catalytiques de dégradation des ARNs 5'-3' ou 3'-5'. Chez la levure, l'exonucléase 5'-3' : Rat1 et ses cofacteurs, induisent la dégradation des pré-ARNm présentant des défauts d'épissage. Cette dégradation est stimulée par l'élimination de la coiffe de méthylguanosine (Bousquet-Antonelli et al. 2000). Cependant, la nucléase majeure qui combine la dégradation des transcrits en fin de vie et le contrôle qualité est l'exosome.

1. L'exosome

L'exosome est un complexe nucléo-cytoplasmique essentiel constitué d'un cœur de 10 sous-unités (Rrp4, Rrp40, Csl4, Ski6/Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46, Mtr3, Dis3/Rrp44) (Houseley et al. 2006) dont neuf sont organisées en une structure en anneau apparentée à son homologue d'Archée (Liu et al. 2006) (Figure 12 page 26). L'exosome possède aussi des similarités structurales et fonctionnelles avec certaines nucléases bactériennes : la polynucléotide phosphorylase (PNPase) et la RNase II (Lorentzen and Conti 2006). Parmi les 10 sous-unités de l'exosome, trois d'entre-elles (Rrp4, Rrp40 et Csl4) comportent un domaine de fixation à l'ARN (Dziembowski et al. 2007). Le cœur de l'exosome est présent à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Cependant, l'association à un cofacteur, Rrp6, confère la spécificité de localisation nucléaire (Allmang et al. 1999a). Rrp6 et la sous-unité Dis3/Rrp44 du cœur de l'exosome possèdent toutes deux des activités exonucléasiques 3'-5'.

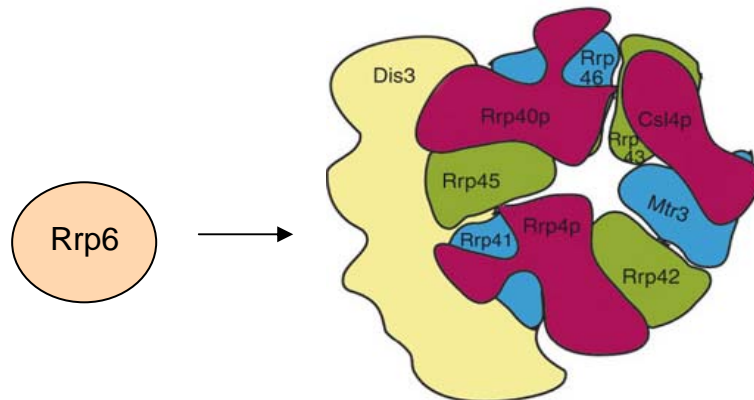


Figure 12: Schématisation de l'exonucléase Rrp6 et de la structure en anneau du cœur de l'exosome chez la levure (d'après [Dziembowski et al. 2007](#)).

L'exosome est impliqué aussi bien dans la maturation des ARNs non-codants que dans la dégradation des CUTs et des ARNs aberrants ([Villa et al. 2008](#)). Les différentes sous-unités de l'exosome ont alors été identifiées indépendamment, à travers divers cribles génétique chez la levure ([Hilleren et al. 2001](#); [Torchet et al. 2002](#); [Milligan et al. 2005](#)).

La dégradation de cibles spécifiques nécessiterait uniquement le cœur de l'exosome ou alternativement Rrp6 avec et sans le cœur de l'exosome ([Allmang et al. 1999a](#); [Mitchell et al. 2003](#)). En effet, il a récemment été montré que la sous-unité Dis3/Rrp44 du cœur de l'exosome était la principale exonucléase 3'-5' ([Dziembowski et al. 2007](#); [Wahle 2007](#); [Lebreton and Seraphin 2008](#)). Dis3/Rrp44 contient en sus un domaine PIN (PiIT N-terminal) qui lui confère une activité endonucléasique couplée à son activité exonucléasique 3'-5' ([Lebreton et al. 2008](#)). Ainsi, Dis3/Rrp44 dégrade des substrats qu'ils soient structurés ou non, tandis que Rrp6 catalyse la dégradation des substrats non-structurés uniquement. Cependant, les exonucléases Rrp6 et Dis3/Rrp44 coopèrent dans la dégradation de substrat ARN ([Dziembowski et al. 2007](#); [Lebreton et al. 2008](#)).

Des analyses *in vitro* ont montré que l'exosome présentait à lui-seul une faible activité exonucléasique ([Mitchell et al. 1997](#)). Pour cibler efficacement des substrats spécifiques, les protéines Dis3/Rrp44 et Rrp6 contiennent aussi des motifs nécessaires au recrutement de cofacteurs ([Allmang et al. 1999b](#); [Stead et al. 2007](#)).

a) L'activation de l'exosome

(1) Des cofacteurs séquence-indépendants

Il semblerait que le facteur nucléaire Rrp47/Lrp1 se fixe à l'ARN et interagisse directement avec Rrp6. Ainsi, il favorise l'activité catalytique de l'exonucléase Rrp6 et participe notamment à la maturation des sn/snoRNA (Mitchell et al. 2003; Stead et al. 2007).

Le premier cofacteur général ayant été identifié est Mtr4 : une ARN hélicase à boîte DEAD qui est indispensable à l'activation de l'exosome tant pour la maturation que pour la dégradation des ARNs (Mitchell et al. 1997; de la Cruz et al. 1998; Kadaba et al. 2004; Vanacova et al. 2005; Kadaba et al. 2006). Mtr4 facilite la progression de 3' vers 5' de l'exosome en déstabilisant des structures ARN et en déplaçant les protéines qui y sont fixées. Alternativement, Mtr4 assiste le recrutement de l'exosome à son substrat par des interactions directes protéine-ARN et protéine-protéine, et ce indépendamment de son activité hélicase (Lebreton and Seraphin 2008). Mtr4 est présent au sein du complexe de polyadénylation appelé TRAMP (Trf4/5-Air1/2-Mtr4 Polyadenylation complex) qui reconnaît spécifiquement les ARNs aberrants puis les polyadényle. Les facteurs Trf4 et Trf5 appartiennent à une nouvelle famille de poly(A) polymérase non-canoniques puisque les queues poly(A) qu'elles ajoutent sont plus courtes que celles synthétisées par Pap1 en 3' des ARNm (LaCava et al. 2005). La polyadénylation par le complexe TRAMP n'a aucun effet stabilisateur mais à l'opposé, elle permet la prise en charge du transcrit par l'exosome nucléaire, qui assure sa dégradation (Vanacova et al. 2005; Wyers et al. 2005; Houseley and Tollervey 2006) (Figure 13 page 28).

Introduction

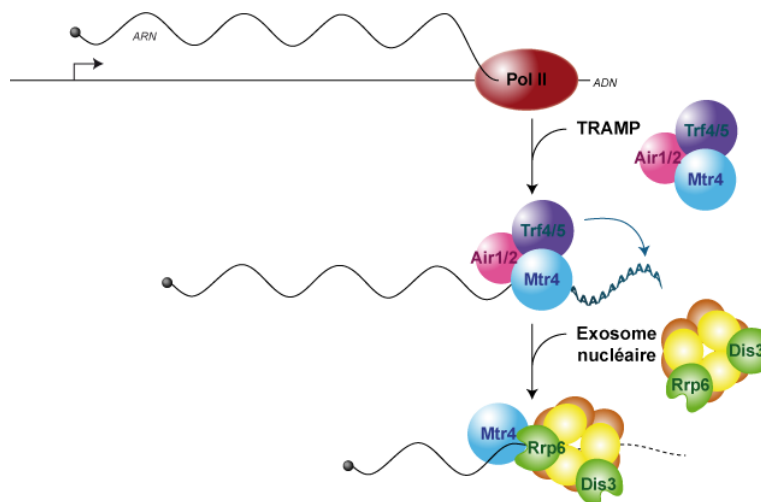


Figure 13 : Modèle de recrutement du complexe TRAMP et de l'exosome sur les transcrits aberrants (d'après <http://alicelebreton.free.fr>). Les ARNs défectueux sont rapidement détectés, polyadénylés par Trf4 ou Trf5, puis dégradés par les RNases de l'exosome à partir de leur extrémité 3'.

Notons que ce mécanisme rappelle un processus de recrutement du dégradosome bactérien pour les substrats polyadénylés (Dreyfus and Regnier 2002; Carpousis 2007). Les complexes TRAMP4 et TRAMP5, comprenant respectivement les poly(A) polymérases Trf4 et Trf5, présentent une affinité pour des substrats distincts *in vivo* mais la base de cette sélectivité reste ambiguë (Egecioglu et al. 2006; Houseley and Tollervey 2006). Les deux poly(A) polymérases sont associées à des protéines présentant des domaines putatifs de fixation à l'ARN (Air1 et Air2).

Le complexe TRAMP peut également interagir avec d'autres cofacteurs séquence-spécifiques. En effet, Trf4 et Air2 co-précipitent avec la protéine Nrd1 tandis que Mtr4 co-précipite avec la protéine Nab3 (Gavin et al. 2002; Vasiljeva and Buratowski 2006). Plusieurs évidences indiquent que l'activité de ces complexes est coopérative (Thiebaut et al. 2006; Vasiljeva and Buratowski 2006).

(2) Des cofacteurs séquence-spécifiques

Les protéines Nrd1 et Nab3 du complexe Nrd1c sont recrutées spécifiquement sur l'ARN néo-synthétisé au niveau de séquences définies. Une hypothèse propose que leur fixation à l'ARN permet le recrutement de la forme nucléaire de l'exosome (Vasiljeva and Buratowski 2006) (voir page 14-15).

Introduction

Dernièrement, l'équipe de Pruijn a découvert que la protéine Mpp6 (the human M-phase phosphoprotein 6) fixe préférentiellement des séquences d'ARN riche en pyrimidine. De plus, cette protéine participe à la maturation de l'ARNr 5.8S en facilitant le recrutement de l'exosome nucléaire (Schilders et al. 2005). Sa fonction de co-activateur de l'exosome a été confirmée grâce à un crible génétique à grande échelle. Cette analyse fonctionnelle a révélé les divers rôles de Mpp6 au cours de la biogénèse des ARNs : la surveillance des pré-ARNr et des pré-ARNm de même que la dégradation des CUTs (Milligan et al. 2008).

(3) *Un cofacteur structure-dépendant*

L'endonucléase Rnt1 permet de réguler l'expression de certains ARNm par clivage d'une structure ARN en tige-boucle (Chanfreau et al. 2000; Danin-Kreiselman et al. 2003; Ge et al. 2005). De plus, cette enzyme interagit *in vivo* avec Rrp6 et participe à la maturation des ARNr et des sn/snoRNA en générant un site d'entrée à l'exosome nucléaire (Abou Elela and Ares 1998; Chanfreau et al. 1998; Egecioglu et al. 2006; Vasiljeva and Buratowski 2006).

L'exosome nucléaire coordonne la rétention et la dégradation des ARNs aberrants puisque la délétion d'un des composants de l'exosome permet leur export (Hilleren et al. 2001; Libri et al. 2002; Jensen et al. 2004). Tout au long de la biogénèse des mRNPs, ce système de surveillance est actif (Schmid and Jensen 2008a). Les voies de dégradation des mRNPs sont donc en compétition cinétique avec les événements ponctuant la biogénèse (Doma and Parker 2007). En effet, la moindre défaillance d'une étape de couplage entre la maturation co-transcriptionnelle et l'export représente une fenêtre d'opportunité pour le mécanisme de contrôle qualité (Milligan et al. 2005; Schmid and Jensen 2008b). Dans les paragraphes suivants nous verrons quelles sont les erreurs en *cis* ou en *trans* qui induisent la rétention des mRNPs aberrants par le système de contrôle qualité.

b) Le contrôle qualité au cours de la biogénèse des mRNPs

Les investigations relatives au complexe de remodelage du transcrite TREX, ont illustré les processus de couplage entre les événements d'empaquetage, d'export et de contrôle qualité du transcrite (Jensen et al. 2001b; Strasser and Hurt 2001). En effet, l'expression d'un mutant de Sub2 ou de chacune des protéines constituantes du complexe THO, induit une réduction considérable de la quantité de certains transcrits et génère aussi deux phénotypes intéressants. L'un est relié à la présence de transcrits ayant une extrémité 3' tronquée, l'autre correspond à une séquestration des ARNs naissants dans les foyers associés au site de transcription (Libri et

Introduction

al. 2002; Thomsen et al. 2003). Ces phénotypes de rétention et de troncature des ARNm sont levés après délétion de l'exonucléase Rrp6 ou d'un composant du TRAMP. Ces résultats suggèrent que l'extrémité 3' des ARNm tronqués résulte d'une dégradation Rrp6-dépendante incomplète (Libri et al. 2002; Rougemaille et al. 2007). Toutefois, la nature exacte des transcrits aberrants séquestrés est évasive. Il semblerait que chez les mutants de Sub2 ou des protéines du complexe THO, les ARNs néo-synthétisés sont d'apparence quasi-normales : les transcrits sont entiers ou presque, polyadénylés (Libri et al. 2002; Strasser et al. 2002).

La mutation de certains facteurs de la machinerie de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm (notamment Rna14, Rna15 et Pap1) génère des ARNm défectueux. Ces transcrits aberrants, ayant une extrémité 3' plus longue ou dépourvue de queue poly(A), sont aussi dégradés par l'exosome nucléaire (Hilleren et al. 2001; Libri et al. 2002; Torchet et al. 2002; Milligan et al. 2005).

De même que chez certains mutants d'export, (tels que les récepteurs Mex67-Mtr2 ainsi que l'hélicase Dbp5) des transcrits présentant une queue poly(A) deux fois plus longue que la normale sont séquestrés puis dégradés par l'exosome nucléaire (Jensen et al. 2001a).

L'exosome nucléaire est donc capable de dégrader de multiples formes de transcrits aberrants : des transcrits entiers, tronqués, hyper ou hypo-polyadénylés. Mais jusqu'alors, nous ne savons pas par quel mécanisme l'ARN est reconnu comme étant aberrant.

(1) Mlp1-Mlp2 participent à la rétention des pré-ARNm aberrants

Il existe un second point de contrôle qualité, au niveau du NPC, qui n'entre pas en compétition avec la dégradation exosome-dépendante (Galy et al. 2004; Fasken and Corbett 2005; Vinciguerra et al. 2005; Villa et al. 2008). Celui-ci a été mis en évidence au laboratoire de Stutz, chez un mutant de Yra1. Ce mutant génère une diminution de la quantité de transcrit ainsi qu'une séquestration nucléaire d'ARNs polyadénylés, même après co-délétion de Rrp6. Toutefois, ce phénotype de rétention est levé après mutation des protéines Mlp1 et Mlp2 (Vinciguerra et al. 2005). Ainsi, les protéines Mlp1-Mlp2 sous forme dimérique constituent un système de surveillance distinct. En effet, elles favorisent la rétention des ARNm présentant des défauts transcriptionnels au niveau du NPC (Vinciguerra et al. 2005). Mlp1 et Mlp2 présentent un long domaine C-terminal qui permet leurs dimérisation. Ces protéines font la connexion entre la transcription et l'export puisqu'elles interagissent à la fois avec des protéines d'enveloppe nucléaire ainsi qu'avec plusieurs protéines composantes des mRNPs

(Figure 14) (Strambio-de-Castillia et al. 1999; Strasser et al. 2002; Green et al. 2003; Palancade et al. 2005).

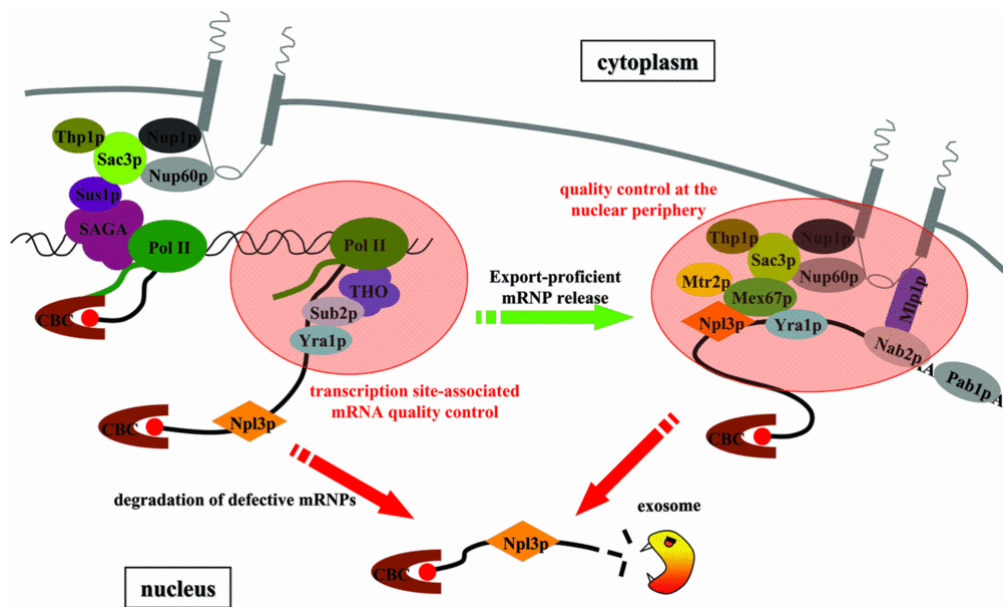


Figure 14 : Schématisation des facteurs impliqués dans l'assemblage et le contrôle qualité des mRNPs (d'après Rougemaille et al. 2008a). Les foyers de transcription actifs ont été localisés à la périphérie nucléaire grâce à l'interaction de SAGA avec les composants du complexe Thp1-Sac3-Sus1. Le premier niveau de contrôle qualité prend place dans le noyau lorsque le mRNP reste associé au site de transcription. Suite à un défaut de transcription ou d'assemblage, les ARNs sont dégradés par l'exosome. Puis un second niveau de contrôle qualité dépendant des protéines Mlp1-Mlp2 a lieu au niveau du pore nucléaire.

(2) *Swt1*, une endonucléase impliquée dans le contrôle qualité des mRNPs

Très récemment, l'implication de la protéine Swt1 dans l'initiation de la dégradation des mRNPs aberrants à la périphérie nucléaire a été démontrée. Il s'agit d'une protéine non-essentielle, à domaine PIN, qui a été identifiée au cours d'un crible de létalité synthétique avec un mutant *hpr1Δ* du complexe THO/TREX (Skruzny et al. 2009). Des études approfondies ont mis en évidence une interaction génétique entre un mutant *swt1Δ* et l'ensemble des mutants du complexe THO, TREX et TREX-2 ainsi qu'avec des mutants du contrôle périnucléaire dont *Mlp1Δ*. Par ailleurs, aucune interaction génétique n'a été révélée

avec des mutants de l'exosome, preuve de la spécificité d'interaction de Swt1, indépendamment de l'exosome ([Skruzny et al. 2009](#)).

Les connaissances actuelles sur l'interdépendance entre l'élongation de la transcription et la maturation ainsi que l'emballage, le contrôle qualité et l'export des mRNPs ont été rendus possible grâce à l'utilisation d'allèles mutants des composants du complexe TREX et de la machinerie de maturation de l'extrémité 3' des pré-ARNm. Cependant, la compréhension des mécanismes moléculaires de reconnaissance et de dégradation des mRNPs aberrants reste un défi primordial.

D. Etat de l'art et méthodologies

Bien que les processus de la biogénèse des mRNPs fassent l'objet de nombreuses investigations depuis plus d'une décennie, les interactions entre le complexe d'élongation de la transcription et les facteurs protéiques qui sont recrutés sur le transcrit émergent restent équivoques. En effet, des analyses génomiques et protéomiques prédictives suggèrent que de nombreux facteurs impliqués dans la formation et l'export des mRNPs restent encore à identifier ([Peng et al. 2003](#)). Plus de dix ans après le séquençage du génome de l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*, près de 1000 gènes ne sont toujours pas caractérisés, soit près de 20 % des ORFs de la levure ([Saccharomyces Genome Database/genome Snapshot](#)). De plus, quelques protéines déjà caractérisées peuvent détenir des fonctions multiples, aussi certaines pourraient être impliquées de manière fortuite dans le métabolisme des mRNPs.

1. Pourquoi 20% des ORFs de levures ne sont pas caractérisées ?

Parmi les gènes de fonction inconnue moins de 4% sont essentiels en raison notamment de la redondance fonctionnelle ([Fisk et al. 2006](#)). De plus, l'absence de phénotype rend difficile l'étude des protéines de fonction inconnue. Quelques connections ont été proposées, suite à des analyses génétiques systématiques par croisement, mais les fonctions de ces protéines inconnues restent cependant évasives. En effet, il est en général plus difficile de comprendre le mécanisme de base des interactions génétiques que des interactions physiques. De plus, nombre de protéines peuvent devenir essentielles en réponse à des changements environnementaux ou métaboliques qui ne sont pas reproduits au laboratoire ([Pena-Castillo and Hughes 2007](#)).

2. Intérêt d'une nouvelle approche

Grâce à l'émergence de nouvelles technologies telles que le SAGE, le 3'-long SAGE, le CAGE, la RNA-seq ou encore la ChIP-chip, l'analyse du transcriptome est plus accessible. En effet, ces techniques apportent de nombreuses réponses quant à l'expression quantitative des gènes, l'identification des extrémités 3' et des sites d'initiation des transcrits, l'estimation quantitative du transcriptome ainsi que la localisation des facteurs de transcription sur la séquence d'ADN (Berretta and Morillon 2009). Dernièrement, les études de l'interactome ont visé à caractériser des protéines constituantes des mRNPs par double hybride, co-immunoprécipitation ainsi qu'avec des techniques de purification biochimique par affinité couplées à la spectrométrie de masse (Gavin et al. 2002; Hieronymus et al. 2004; Burckin et al. 2005; McKee and Silver 2007). Ces dernières analyses présentent cependant quelques limites de détection pouvant être liées à une quantité restreinte de certaines protéines partenaires et inversement, à la détection de protéines contaminantes qui sont très abondantes *in vivo* (principalement les protéines ribosomales). De plus, les techniques de purification par affinité sont des méthodes pour lesquelles la probabilité de retrouver la protéine dans un complexe lors de deux purifications indépendantes est de 70 %, soit près de 30 % d'interactions douteuses (Gavin et al. 2002). En sus, les techniques de co-purification nécessitent au préalable l'étiquetage de la protéine d'intérêt, or cette étiquette peut interférer avec l'assemblage du complexe. Mais le biais le plus handicapant, notamment pour rechercher des protéines impliquées dans la formation des mRNPs, provient de la difficulté à détecter des interactions transitoires ou de faible affinité. Or, d'après le modèle de maturation co-transcriptionnelle des mRNPs, le chargement des différents facteurs sur le complexe d'élongation de transcription et les interactions entre les divers partenaires protéiques sont dynamiques et transitoires. Il est donc difficilement envisageable de découvrir de nouvelles protéines impliquées dans la biogénèse des mRNPs par les méthodologies actuelles. Pourtant plusieurs questions restent en suspens. En effet, nous ne connaissons pas l'ensemble des protéines intervenant dans la formation des mRNPs et nous ignorons s'il s'agit de facteurs généraux ou spécifiques de certains transcrits. Comment s'effectue le choix du système de terminaison ? Par quels mécanismes les ARNs aberrants sont-ils reconnus puis dégradés ?

Pour répondre à ces interrogations, nous avons élaboré un crible génétique original afin de découvrir les facteurs protéiques qui sont essentiels à la biogénèse des mRNPs. L'originalité du projet est basée sur l'utilisation d'un facteur exogène ayant la capacité

Introduction

d'interférer au niveau de plusieurs étapes de la biogénèse des mRNPs. Ce compétiteur, étudié depuis plusieurs années au laboratoire, est le facteur de terminaison de la transcription bactérienne, Rho.

II. Un facteur de terminaison de la transcription bactérienne : Rho pour étudier la biogénèse et le contrôle qualité des transcrits eucaryotes

Chez *Escherichia coli*, une seule forme d'ARNP est responsable de la synthèse de l'ensemble des ARNs cellulaires. A la différence des organismes eucaryotes, le processus de transcription est couplé à la traduction chez les procaryotes. Il débute lorsque l'ARNP s'associe à un facteur d'initiation de la famille sigma (σ) pour reconnaître spécifiquement la région promotrice (pour revue [deHaseth et al. 1998](#)). Puis l'ARNP incorpore les premiers nucléotides et quitte la phase d'initiation pour entrer dans la phase d'élongation. Cette conversion se caractérise notamment par la perte du facteur σ , le changement conformationnel de l'ARNP ainsi que la formation d'un complexe transcriptionnel sous une forme hautement stable et processive ([Hansen and McClure 1980](#); [Stackhouse et al. 1989](#); [Krummel and Chamberlin 1992](#)). Ainsi, le TEC est capable de synthétiser des transcrits extrêmement longs, permettant la transcription d'opérons entiers ([Roberts et al. 2008](#)).

Chez *E. coli*, il existe deux mécanismes de terminaison de la transcription bien distincts. La terminaison intrinsèque est initiée par une structure en tige-boucle suivie d'une répétition d'uraciles en 3' de l'ARN naissant ([Gusarov and Nudler 1999](#)). Le second mode de terminaison nécessite l'intervention d'un facteur protéique essentiel : Rho. Il serait impliqué dans près de 50 % des événements de terminaison des ARNm, bien que ce chiffre ait été revu à la baisse dernièrement (20%) ([Peters et al. 2009](#)).

A. Les rôles biologiques de Rho

Diverses classes de terminateurs sont dépendantes de Rho :

- Les terminateurs extragéniques définissent la fin de gènes ou d'opérons de façon à maintenir l'indépendance transcriptionnelle de séquences génomiques adjacentes.
- Les terminateurs intergéniques (positionnés entre deux gènes d'un même opéron) permettent la synthèse d'ARNs non-codants : petits ARNs, ARNr et ARNt ([Peters et al. 2009](#)). Certains terminateurs, appelés atténuateurs transcriptionnels, modulent le niveau relatif d'expression des différents gènes d'un même opéron.

Introduction

- Les terminateurs intragéniques (inclus dans les gènes) participent à la formation de l'extrémité 3' de petits ARNs antisens stables (Peters et al. 2009). D'autres sont latents dans les conditions normales d'expression et sont activés seulement lorsque la transcription et la traduction se retrouvent découplées (par une mutation non sens ou en cas de carence d'acide aminé). Ces derniers sont à l'origine du mécanisme dénommé la "polarité transcriptionnelle" (Stanssens et al. 1986; Richardson 1991).

Rho est nécessaire à l'inhibition de l'expression de gènes toxiques résultant d'un transfert horizontale (Cardinale et al. 2008). Notons qu'elle empêche aussi des processus délétères *in vivo* : les formations de R-loops (boucles-R : hétéroduplexes entre un ARN et un simple brin d'ADN), favorisées lorsque la transcription est découplée à la traduction (Harinarayanan and Gowrishankar 2003; Drolet 2006).

Les terminateurs Rho-dépendants ne présentent pas de séquence consensus clairement définie. Ils seraient composés de deux éléments distincts répartis dans une séquence ADN de 150 à 200 pb environ (Lau et al. 1983; Richardson 1990; Zalatan et al. 1993) : une séquence essentielle nommée *rut* (pour "Rho utilization") qui code pour le site d'entrée de Rho sur l'ARN et le site de terminaison proprement dit, où intervient le relargage du transcrit. Les séquences *rut* sont relativement riches en cytosine (C) et sont situées dans des régions dépourvues de ribosomes (Galluppi and Richardson 1980; Morgan et al. 1983; Schneider et al. 1993; Guerin et al. 1998; Richardson 2002). Certaines structures ARN en épingle à cheveux peuvent également être reconnues efficacement par Rho (Schwartz et al. 2007b). D'après des études cinétiques, le relargage de l'ARN survient au niveau de signaux de pause (motifs ARN en épingle à cheveux) de l'ARNP en cours d'élongation (Morgan et al. 1983; Lau et al. 1984; Guerin et al. 1998; Landick 2006).

B. Organisation structurale du facteur Rho.

La protéine Rho de 419 acides-aminés est fonctionnelle sous la forme d'un anneau homohexamérique (Geiselmann et al. 1992). Deux conformères de Rho, sous forme ouverte et fermée, ont été observés par cristallographie avec une prédominance de la forme fermée, favorisée en présence de ligands ARNs (Bear et al. 1988; Gogol et al. 1991; Yu et al. 2000; Skordalakes and Berger 2003, 2006). Dans ces structures quaternaires, le diamètre de l'anneau permet le passage d'un seul brin d'acide nucléique (Skordalakes and Berger 2003, 2006). D'après la dernière étude cristallographique du facteur Rho en interaction avec un

Introduction

oligonucléotide ARN, les six protomères de Rho constituent une structure en anneau organisée en « trimer de dimères » (Figure 15). Les Q-loops adoptent différentes conformations alternativement et peuvent être assimilés à un levier permettant la translocation séquentielle de Rho le long de la chaîne d'ARN (Skordalakes and Berger 2006).

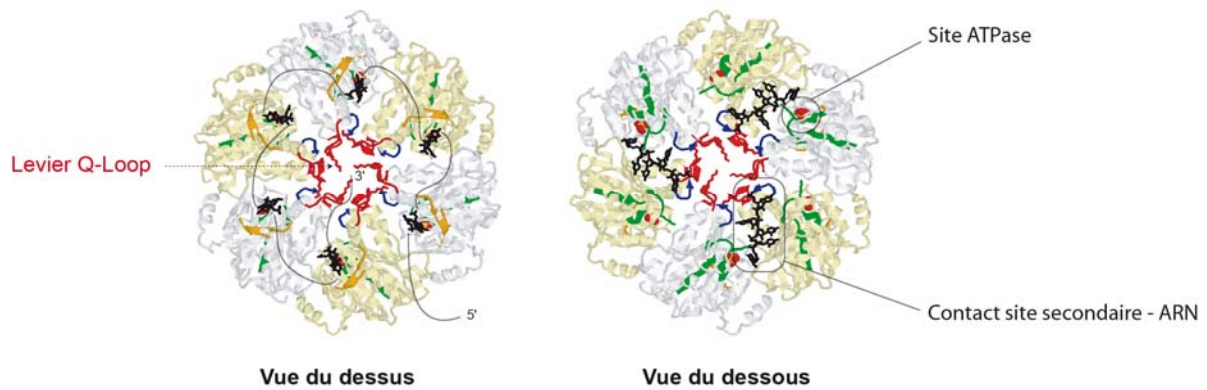


Figure 15 : Structure de l'hexamère Rho (d'après Boudvillain). Les monomères sont représentés en gris et jaune alternativement et la localisation des cofacteurs d'ATP est indiquée par des boules rouges. En noir est représenté l'ARN, tandis que les domaines de fixation à l'ARN, les motifs ATPase, de même que les Q et R-loops sont représentés respectivement en orange, vert, rouge et bleu.

Le site primaire de fixation de la protéine Rho à l'ARN correspond aux 130 premiers résidus N-terminaux de chaque monomère (Geiselman et al. 1992; Richardson and Richardson 1992). Ce dernier est constitué de motifs similaires aux signatures rencontrées chez certaines ribonucléoprotéines eucaryotes (Query et al. 1989). Seul le site secondaire, correspondant à un long domaine C-terminal (268 derniers résidus) comprenant les motifs de signature ATPase (Bear et al. 1985; Dombroski and Platt 1988), est exclusivement spécifique de l'ARN (Richardson 1982).

Les structures cristallines de Rho complexées à la bicyclomycine indiquent que cet inhibiteur non-compétitif interagissant avec Rho, au niveau d'une poche adjacente aux sites de fixation de l'ATP et de l'ARN, serait responsable du blocage de la translocation de Rho *in vitro* (Magyar et al. 1996). De plus, l'association de Rho à la bicyclomycine inhibe la fixation d'une molécule d'H₂O requise pour l'hydrolyse de l'ATP (Skordalakes et al. 2005). Ces études

suggèrent que le couplage entre la fixation de la molécule d'ARN, l'activation de l'hydrolyse d'ATP et la translocation de Rho est essentiel à son activité biologique.

C. Le modèle de terminaison Rho-dépendante

En cours de transcription, Rho reconnaît une séquence peu spécifique, riche en résidus C (Figure 16A). Cette reconnaissance se fait grâce à son site primaire d'interaction qui positionne l'ARN dans le centre de l'anneau afin de favoriser l'interaction de l'ARN avec son site secondaire. Cette seconde fixation, couplée à des changements conformationnels, entraîne l'hydrolyse séquentielle des trois molécules d'ATP (Stitt and Xu 1998). La transduction d'énergie chimique en énergie mécanique permet à Rho de se déplacer de 5' vers 3' le long du transcrit (Figure 16B). Quand Rho entre en contact avec l'ARNP arrêtée au niveau d'un site de pause (Figure 16C) il provoque la dissociation du complexe ternaire d'élongation (Figure 16D). Actuellement, cette dernière étape n'est pas caractérisée biochimiquement.

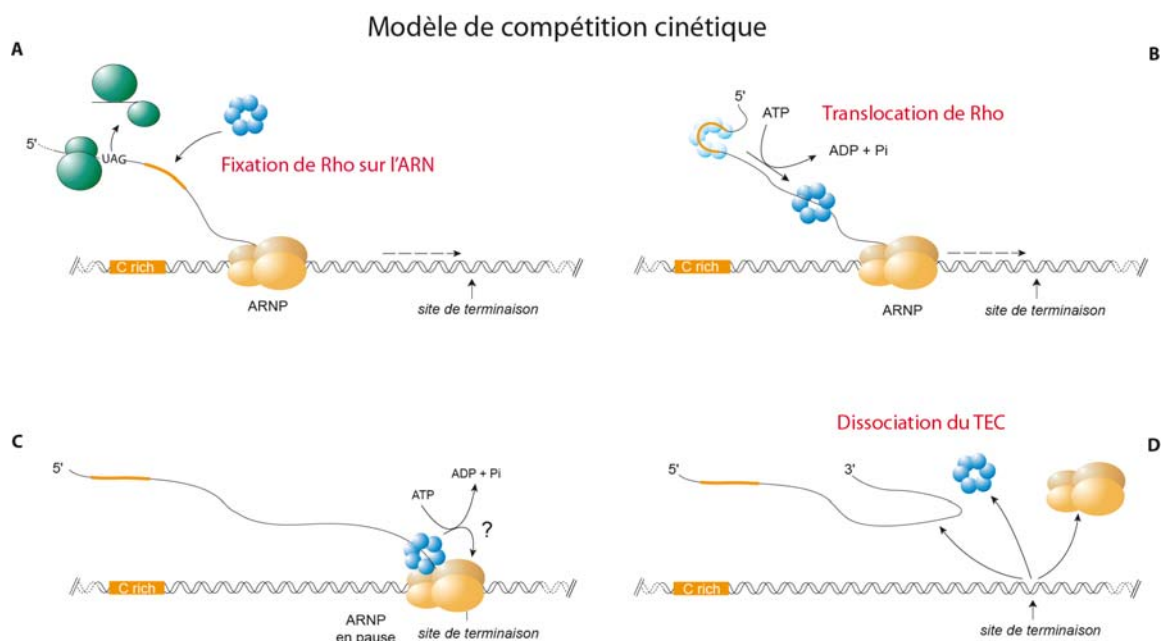


Figure 16 : Représentation schématique du mécanisme de terminaison Rho-dépendante chez *E. coli*. (A) Rho reconnaît et fixe une région du transcrit, puis transloque de 5' vers 3' (B), rejoint l'ARN polymérase arrêtée (ou déstabilisée) au niveau d'un site de pause et dissocie le complexe d'élongation (C) et (D).

Introduction

Le modèle actuel, dit de compétition cinétique, suggère que l'efficacité de terminaison Rho-dépendante découle directement de la capacité du « moteur moléculaire » Rho à rattraper le TEC en cours de transcription. Ce modèle de compétition cinétique repose essentiellement sur les travaux de Fisher et Yanosfky qui avaient constaté qu'un mutant de Rho possédant une vitesse de translocation ralentie peut induire une terminaison normale lorsque la vitesse d'élongation de l'ARNP est réduite ; soit *in vitro* par de faibles concentrations en nucléotides, soit *in vivo* par une mutation (Fisher and Yanofsky 1983; Jin et al. 1992). La caractérisation fonctionnelle d'un mutant ponctuel de Rho (Beckwith 1963), appelé *rhosuA1* ou encore *rho-KE*, corrobore le modèle de compétition cinétique. Ce mutant de Rho comporte une substitution d'un acide aminé qui affecte le site secondaire de fixation de l'enzyme à l'ARN conduisant à une faible activité ATPase/hélicase de Rho et une vitesse de translocation réduite (Pereira and Platt 1995). Par conséquent, ce mutant présente une efficacité de terminaison diminué *in vivo* (Richardson and Carey 1982). De la même manière, un mutant de l'ARNP qui est moins sensible aux sites de pause *in vitro*, a une efficacité de terminaison diminuée *in vivo* (Greenblatt and Li 1981). L'efficacité de la terminaison dépendrait donc du couplage cinétique entre la vitesse d'élongation de l'ARNP d'une part et la vitesse de translocation de Rho le long du transcrit d'autre part (Jin et al. 1992). Les facteurs capables de réguler ces vitesses devraient donc jouer un rôle prédominant pour déterminer la position des sites de relargage et l'efficacité de la terminaison au niveau de ces sites (Landick et al. 1987; Burns et al. 1998; Nudler and Gottesman 2002).

D. La translocation et la dissociation d'obstacles protéiques

La protéine Rho est capable d'outrepasser des structures ARN pendant sa progression le long du transcrit naissant (Harinarayanan and Gowrishankar 2003). De plus, il a récemment été montré que Rho était une puissante hélicase/translocase capable de perturber *in vitro* un assemblage nucléo-protéique hétérologue (Figure 17).

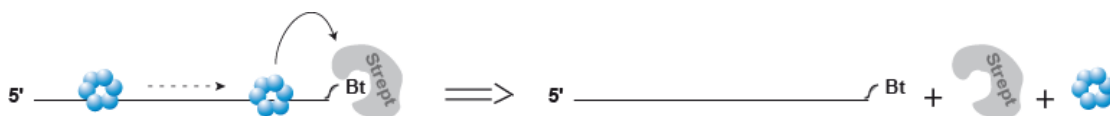


Figure 17 : Rho est un moteur moléculaire capable de perturber *in vitro* un assemblage nucléo-protéique hétérologue (d'après Schwartz et al. 2007a)

Introduction

Rho est capable de désagréger, de façon ATP-dépendante, un complexe streptavidine lié à un substrat ARN biotinylé. Rho est donc un puissant moteur moléculaire permettant la dissociation rapide et efficace de complexes protéiques constituant un obstacle à son déplacement (Walmacq et al. 2004, 2006). D'après des expériences de molécule unique, la force requise pour détacher l'ARN du TEC excède 30 pN (Dalal et al. 2006). Cependant, la dissociation Rho-dépendante de la streptavidine suggère que l'enzyme génère une force de plus de 200 pN (Moy et al. 1994; Wong et al. 1998). Ainsi, Rho se transloque de 5' en 3' le long du transcrit naissant et dissocie divers composants hétérologues qui sont fixés de façon non-covalente à l'ARN. A ce titre, Rho représente un outil biologique optimal pour étudier l'échange dynamique des partenaires protéiques qui interagissent avec le transcrit au cours de la formation et de l'export des mRNPs.

RESULTATS

III. Article I : « Expression of bacterial Rho factor in yeast identifies new factors involved in the functional interplay between transcription and mRNP biogenesis »

A. Introduction

Aucun homologue structural et fonctionnel de Rho n'a encore été découvert chez les eucaryotes (Banerjee et al. 2006). En 1998, Lang et ces collaborateurs ont conçu un modèle d'étude de dissociation Rho-dépendante du TEC eucaryote *in vitro*. Ce système artificiel de transcription est composé de sites de pause générés par des complexes nucléoprotéiques en amont d'un site RUT. Dans ce contexte et en absence de Rho, l'ARNP II de *Saccharomyces cerevisiae* génère, en cours d'élongation, des phénomènes de pause sans déstabilisation du TEC. En présence de Rho, ce moteur moléculaire dissocie l'ARNP II localisée au niveau des sites de pause, de façon ATP-dépendante (Lang et al. 1998). Ces résultats corroborent les études menées au laboratoire de Rahmouni qui indiquent que Rho est capable de dissocier un obstacle protéique hétérologue *in vitro* (Schwartz et al. 2007a).

Nous avons mis à profit les propriétés de Rho en l'utilisant chez un organisme eucaryote comme sonde de la biogénèse des mRNPs puisque les méthodologies de détection des facteurs protéiques interagissant transitoirement avec l'ARN et/ou l'ARNP II sont limitées. Ainsi, Rho pourrait entrer en compétition avec des facteurs de maturation et d'empaquetage du transcrit en déstabilisant des protéines fixées à l'ARN et/ou en les déplaçant lors de sa translocation le long de la molécule d'ARNm naissante.

L'étude réalisée dans l'article présenté ci-après révèle que l'expression conditionnelle de Rho chez *Saccharomyces cerevisiae* interfère avec la transcription des ARNm synthétisés par l'ARNP II en générant des transcrits aberrants qui sont dégradés par l'exosome. Phénotypiquement, l'expression hétérologue du facteur Rho conduit à un défaut de croissance dose-dépendant. Par conséquent, nous avons conçu un crible génétique reposant sur la recherche de suppresseurs du défaut de croissance Rho-dépendant dans des banques de surexpression des ORFs de levure. Ce crible a été validé par l'identification de facteurs impliqués dans la transcription, la maturation et l'export des mRNPs. Il permet de mieux comprendre les aspects dynamiques des interactions de ces facteurs avec le complexe

Résultats

transcriptionnel. Cette étude nous a aussi permis d'identifier des ORFs codants pour des protéines de fonction inconnue. Celles-ci comportent des signatures caractéristiques de certains facteurs de transcription et seraient potentiellement impliquées dans la biogénèse des mRNPs.

B. Article I

Expression of Bacterial Rho Factor in Yeast Identifies New Factors Involved in the Functional Interplay between Transcription and mRNP Biogenesis^{†‡}

Christine Mosrin-Huaman,[‡] Romy Honorine,[‡] and A. Rachid Rahmouni^{*}

Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 du CNRS Rue Charles Sadron, 45071 Orléans C dex 2, France

Received 2 March 2009/Returned for modification 30 March 2009/Accepted 12 May 2009

In eukaryotic cells, the nascent pre-mRNA molecule is coated sequentially with a large set of processing and binding proteins that mediate its transformation into an export-competent ribonucleoprotein particle (mRNP) that is ready for translation in the cytoplasm. We have implemented an original assay that monitors the dynamic interplay between transcription and mRNP biogenesis and that allows the screening for new factors linking mRNA synthesis to translation in *Saccharomyces cerevisiae*. The assay is based on the perturbation of gene expression induced by the bacterial Rho factor, an RNA-dependent helicase/translocase that acts as a competitor at one or several steps of mRNP biogenesis in yeast. We show that the expression of Rho in yeast leads to a dose-dependent growth defect that stems from its action on RNA polymerase II-mediated transcription. Rho expression induces the production of aberrant transcripts that are degraded by the nuclear exosome. A screen for dosage suppressors of the Rho-induced growth defect identified several genes that are involved in the different steps of mRNP biogenesis and export, as well as other genes with both known functions in transcription regulation and unknown functions. Our results provide evidence for an extensive cross talk between transcription, mRNP biogenesis, and export. They also uncover new factors that potentially are involved in these interconnected events.

The expression of protein-encoding genes in eukaryotic cells is a multistep process in which the genetic message is transcribed from DNA into a pre-mRNA molecule that undergoes 5'-end capping, splicing, 3'-end cleavage, and polyadenylation before being assembled into a ribonucleoprotein particle (mRNP) and exported to the cytoplasm for translation. Genetic and biochemical studies, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism in particular, suggest that the various mRNA processing and packaging events known as mRNP biogenesis are coupled physically and functionally to transcript elongation. The current view is that the nascent transcript emerging from the transcription elongation complex is coated sequentially with a variety of proteins that ensure its integrity and mediate its maturation and transport from the site of transcription to the nuclear pore for export (2, 29, 68). The cotranscriptional assembly of export-competent mRNPs seems to be facilitated by the C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II (RNAP II), which serves as a platform for the sequential recruitment of various factors. Among the general factors that are important for the production of export-competent mRNPs in yeast, the four-subunit THO complex (Hpr1p, Mft1p, Tho2p, and Thp1p) associates with RNAP II at early steps of transcription elongation and facilitates the loading onto the nascent transcript of two mRNP

export factors, Yra1p and Sub2p (1, 7, 71). The hexameric complex formed by THO, Yra1p, and Sub2p, termed the transcription and export complex (TREX) (64), recruits the heterodimeric export receptor Mex67p-Mtr2p, which guides mRNPs through the nuclear pore.

The production of mature export-competent transcripts also is under the surveillance of quality control steps that are interconnected with transcription and mRNP assembly (12, 15). Aberrant mRNA molecules resulting from inappropriate or inefficient processing and packaging reactions are detected readily by the surveillance mechanisms leading to their retention at the transcription sites, where they are degraded by the 3'-to-5' exonuclease activity of the nuclear exosome (51, 63, 67). The exosome-mediated mRNA surveillance was shown to accompany the transcription complex during elongation in *Drosophila melanogaster*, and a physical interaction between the exosome and the transcription elongation factors Spt6 and Spt5 was reported (3). This coupling between transcription and mRNA surveillance also was highlighted by a genetic interaction found between a component of the general transcription factor TFIID (Rad3p) and the exosome-mediated mRNA quality control in yeast (22). Further analyses of this genetic interaction have shown that the efficiency of nuclear mRNA surveillance is modulated by the rate of transcript elongation by RNAP II (21). Also, genetic and biochemical studies have revealed a functional link between the TREX complex and the exosome, especially its nucleus-specific subunit Rrp6p (21, 24, 33, 35, 71). The mutation of any component of the TREX complex leads to the inhibition of nuclear mRNA export and the sequestration of de novo-synthesized heat shock mRNAs at their site of transcription. Such mRNA nuclear retention and degradation can be suppressed by the loss of the nuclear exosome component Rrp6p.

^{*} Corresponding author. Mailing address: Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 du CNRS Rue Charles Sadron, 45071 Orléans C dex 2, France. Phone: (33) 2 38 25 76 08. Fax: (33) 2 38 63 15 17. E-mail: rahmouni@cnrs-orleans.fr.

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

[‡] These authors contributed equally to this work.

[ ] Published ahead of print on 18 May 2009.

A large part of our current knowledge of the interdependence between transcription elongation and mRNA processing, packaging, quality control, and export comes from the use of mutant alleles of some components of either the TREX complex or the mRNA 3'-end formation machinery (21, 24, 35, 38). These artificially induced defects in mRNP biogenesis have been widely exploited to decipher the precise role of the nuclear exosome in mRNA surveillance. Recently, such studies have led to the identification of a new complex, termed TRAMP, that cooperates with the nuclear exosome in the processing and degradation of aberrant mRNAs (50, 70). However, despite extensive investigations in the last decade, the elucidation of the molecular mechanisms that define the export competence of mRNPs as well as the understanding of the dynamic interactions between the transcription elongation complex and the protein factors that connect mRNA synthesis to translation remain a major challenge. Furthermore, although several factors that are implicated in the various steps of mRNP biogenesis and export have been identified and characterized, it is widely recognized that numerous others still await identification, either because they belong to the nearly 20% of yeast open reading frames (ORF) whose functions remain unknown or because they perform multiple functions inside the cell.

To address some of these fundamental questions, we sought to implement an original assay that monitors the interplay between RNAP II-dependent transcription and mRNP biogenesis in yeast. The assay is based on the perturbation of gene expression induced by a heterologous RNA processing factor that was expected to act as a competitor at one or several steps of mRNP biogenesis. An interesting protein that fulfills this commitment is the bacterial Rho factor. Rho protein, which has no known functional homolog in eukaryotes, belongs to the family of ring-shaped hexameric helicases and is involved in 50% of the transcription termination events in *Escherichia coli* (8, 44, 45). The mechanism by which Rho induces transcription termination involves a primary interaction of the protein with a naked portion of the nascent transcript, followed by ATP-driven translocation and the disruption of the transcription elongation complex at downstream sites. Previous *in vitro* and *in vivo* studies in our laboratory have shown that a well-defined Rho-dependent terminator is not an absolute prerequisite for Rho activity; any RNA sequence with adequately spaced C residues or certain RNA structures such as hairpins can serve as efficient loading sites for Rho (18, 58). Also, Rho is able to compete with other proteins for binding to a transcript, a process used in prokaryotic gene regulation (66). Upon productive interaction, Rho functions as a powerful molecular motor that tracks along an RNA chain and can melt nucleic acid base pairs or disrupt RNA-protein complexes present on its path (57, 69). Given these functional features, we surmised that, once in the yeast nucleus, Rho could bind to nascent transcripts by competing with the endogenous mRNA processing and packaging factors and even displace them during its translocation. Such action could lead to the production of prematurely terminated transcripts, aberrantly processed mRNAs, or export-incompetent mRNPs that are depleted of some crucial packaging proteins.

Our results show that the conditional expression of Rho in *S. cerevisiae* leads to a dose-dependent growth defect phe-

notype that can be modulated by mutations in RNAP II that increase or decrease the rate of RNA synthesis. By a combination of genetic and molecular analyses, we have demonstrated that Rho expression induces the production of aberrant mRNA transcripts that are degraded through the exosome-mediated nuclear quality control system. Guided by these findings, we have conducted a screen for dosage suppressors of the Rho-induced growth defect. The hunt revealed several genes whose functions cover a large spectrum of mRNP biogenesis and export, as well as other ORFs with both known functions in transcription regulation and unknown functions.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and media. The yeast strains used in this study are listed in Table S1 in the supplemental material. The *rrp6Δ* strain was created by using standard procedures of PCR-based gene deletion and modification in *S. cerevisiae* (34). The *RRP6* ORF was amplified from strain BMA41α and replaced with the *E. coli* kanamycin resistance (*Kan^r*) gene by using primers RRP6-Kan1 (5'-GATAGA CGAAATAGGAACAACAACAGCTTATAAGCACCCAATAAGTGGCGTT CCGGCCAGCGACATGGAGGCCAG) and RRP6-Kan2 (5'-GCCTTGG TCATTACTATCGCTAGATGATGGGTCGGAATCTCCTTTCCGAAATCG ACAGCAGTATAGCGACCAGGCT) (*RRP6* sequences are underlined). To construct the RNAP II mutant strains, the plasmids pRP212, pRP2-10, and pRP2-7 (see Table S2 in the supplemental material) were extracted from strains CKY 289, CKY 374, and CKY 379, respectively, and used individually to transform strain DDT-ct2 (*rrp62Δ::kanMX4* and pRP2-4L). The pRP2-4L plasmid was ejected from the transformants by nonselective growth to create the strains CMY 289, CMY 374, and CMY 379. Strains were grown on YEP plates (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% agar) or synthetic complete medium (SC) with bases and amino acids omitted as necessary. Media were supplemented with an appropriate carbon source (2% glucose or 1.95% galactose–0.05% glucose). Bicyclomycin was kindly provided by Fujisawa Pharmaceuticals Co., Osaka, Japan.

Plasmids. The plasmids used in the study are listed in Table S2 in the supplemental material. The Rho-nuclear localization signal (Rho-NLS) coding sequence was obtained by PCR amplification from pCB111 (generously provided by J. Richardson) with oligonucleotides Rho3 (5'-GAAGGAGATATACCCAT GGTCTTACC3-'; the *Nco*I site is underlined, and the Rho sequence is in boldface) and Rho2 (5'-CCITTAITCAGTTAGCTAGCTTAGCGCAACCTTTCT CTCTTCTTTGGTGGTGGAGCGTTTCATCATTTCCGAAG-3'; the *Nhe*I site is underlined, simian virus 40 NLS sequence is in italics, and Rho sequence is in boldface). The DNA fragment was cloned behind the *GAL1* promoter of pYX243 at the *Nco*I and *Nhe*I sites (Research and Development Systems). The resulting plasmid was manipulated to restore the *Asn* at position 2 in the Rho protein. Subsequent hydrolysis with *Bst*III and *Bsa*I was performed to clone the *GAL1*-Rho-NLS sequence into the pRS415 vector (61), creating pYCM8. The K352E amino acid substitution in *rho* was generated by PCR using the oligonucleotides Rho6 (5'-CTCCATCACTCGTCTGGCGCGCTTACAACACCG-3'; +795 to +829 in the Rho coding sequence; the *Bst*III site is underlined) and Rho7 (5'-GTAGTCGATAGCCGGGAAGACCGCTTCTTCAG-3'; +1080 to +1049 in the Rho coding sequence; the *Mlu*I site is underlined). This Rho-KE fragment was cloned into pYCM8 that had been hydrolyzed by *Mlu*I and *Bst*III, generating pYCM8-Rho-KE. To express Rho-NLS or Rho-KE-NLS under the tetracycline promoter, the coding sequence of each allele was amplified from pYCM8 or pYCM8-Rho-KE with primers Rho18 (5'-GGAGAAAAACCCC GGATCGCGCCGACCATG-3'; the *Not*I site is underlined) and Rho22 (5'-CGTTCATTGTTCTTATTCAGGCGCGCCCTTAGGCAACC-3'; the *Not*I site is underlined). Following *Not*I hydrolysis, the PCR fragments were cloned into the pCM185 and pCM188 vectors to create pCM185-Rho-NLS, pCM185-Rho-KE-NLS, pCM188-Rho-NLS, and pCM188-Rho-KE-NLS. The NLS of pCM188-Rho-NLS was deleted by the amplification of the Rho gene with primers Rho18 and Rho23 (5'-GGCAACCTTCTCTTCGCGCGCTTATGAGC GTTTCATCATTTCCG-3'; the *Not*I site is underlined, and the Rho sequence is in boldface). The amplified DNA fragment was hydrolyzed with *Not*I and cloned into the *Not*I site of pCM188, generating pCM188-Rho-ΔNLS.

To construct the pHR81-X plasmids, the different ORFs were amplified from strain BMA41α with appropriate primers containing the *Bam*HI or *Sac*I restriction site. After the hydrolysis of the PCR fragment with *Bam*HI or *Sac*I, the

DNA was cloned into pHR81. The pAG425GPD-ORF constructs were realized by Gateway cloning using pDONR plasmids from Harvard (<http://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/>). To construct plasmid pRS413-*RPB9*, the *RPB9* gene was amplified from BMA41α genomic DNA with primers Rpb9 reverse (5'-CCAGATAGAAGAAGATCTCTCGCTAGAATTCGTAAGGAC-3') and Rpb9 forward (5'-CATCTTTCTTCATTAATTTGGATCCGTAACATATACGCAT-3') containing the EcoRI and BamHI restriction sites (underlined), respectively. The PCR fragment was hydrolyzed by EcoRI and BamHI and cloned into pRS413.

Dosage suppressor screen. The BMA41 strain harboring the Rho expression plasmid (pCM185-Rho-NLS) was transformed with the yeast genomic DNA library (39) (see Table S2 in the supplemental material), and the cells were plated onto selective agar medium containing 1 µg/ml doxycycline (Dox). After 3 days at 25°C, the transformants were toothpicked individually onto selective Dox-free medium. The surviving colonies were replica-plated onto selective medium containing 5-fluorouracil (5-FOA) to discard nonplasmidic suppressors of Rho-induced lethality. Eventually, the episomal plasmid from the colonies growing on Dox-free medium was extracted, amplified in *E. coli*, and analyzed by restriction mapping and sequencing. The ORF conferring the suppressing activity was recovered after the subcloning of the individual ORFs from the genomic insert into pHR81 or pAG425GPD-ccdB vector as described above. The yeast BMA41 cotransformants harboring pCM185-Rho-NLS and either pHR81-ORF or pAG425GPD-ORF were analyzed as described in Results.

RNA isolation and analysis. BMA41 cells transformed with the appropriate plasmids were grown at 25°C to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6 to 0.8, and then total RNAs were extracted by the hot phenol method (56). For Northern blot analysis, RNA samples were fractionated by electrophoresis through a 1.2% agarose-formaldehyde gel (48). The separated RNAs were blotted by capillarity and UV cross-linked to the membrane at 0.120 J/cm² (BIO-LINK-BLX; Fisher Bioblock Scientific). RNAs were detected sequentially using either 5'-end-labeled probes or a PMA1 random-primed probe (see Table S3 in the supplemental material). To perform a second hybridization, the radioactive probe was stripped off from the membrane by incubation at 75°C for 1 h in 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5).

RNAse H mapping was carried out as described previously (53). Briefly, 10 µg of total RNAs was annealed with 300 ng of oligonucleotide N1 (between positions 3059 and 3082 of the *PMA1* ORF) and 300 ng of oligo(dT)₁₈ whenever necessary. Upon incubation with RNase H, RNAs were resolved on a 6% polyacrylamide-7 M urea gel, blotted onto a membrane by semidry blotting using a Bio-Rad Trans-Blot SD apparatus, and UV cross-linked. To detect the *PMA1* 3' ends, the membrane was probed with radiolabeled oligonucleotide N2 (between positions 3117 and 3140 of the *PMA1* ORF). The amount of *PMA1* mRNA in each lane was normalized using 5.8S rRNA as a control. Hybridization signals were quantified with a Storm 860 PhosphorImager (Molecular Dynamics), and the data were processed with Imagequant software, version 2005.

Western blotting. BMA41 cells transformed with Rho-expressing plasmid were grown at 25°C to an OD₆₀₀ of 1 in liquid medium containing various Dox concentrations. Proteins in whole-cell extract were resolved on SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis gels along with a purified bacterial Rho protein (kindly provided by M. Boudvillain) and analyzed by Western blotting according to standard procedures (54). The Rho protein was detected with anti-Rho antibodies (a custom preparation from Eurogentec) and visualized by chemiluminescence (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate; Pierce) according to standard procedures.

RESULTS

Expression of *E. coli* Rho factor is toxic in *Saccharomyces cerevisiae*. To study the effects of the bacterial termination factor under the dynamic conditions of transcription in living eukaryotic cells, we have expressed the *E. coli* Rho protein in the yeast nucleus under the control of a Dox-regulated TetO₂ promoter within a centromeric plasmid harboring the constitutively expressed transactivator tTA. The gene encoding *E. coli* wild-type Rho was cloned by PCR amplification using appropriate primers that were devised to add an NLS at the C terminus of the protein. The growth of *S. cerevisiae* strain BMA41 containing the empty vector or the Rho expression construct (Rho-NLS) was studied by serial dilutions on selective agar plates in the presence (noninduced) or in the absence

(induced) of the effector, Dox. In the effector-containing medium, cells harboring either plasmid grew equally well, whereas in the absence of Dox the growth of cells containing the Rho expression plasmid was inhibited (Fig. 1A). These results indicate that the expression of Rho protein in yeast is toxic and that the extent of Rho expression in our plasmid system can be lowered to a subtoxic level or switched off by Dox addition at an appropriate concentration (1 µg/ml). The tight regulation of the expression system and the toxic effect of Rho were revealed further by monitoring yeast growth in liquid medium containing different concentrations of the effector. As shown in Fig. 1B, the gradual activation of the Tet promoter by decreasing the Dox concentration in the medium from 1 to 0.02 µg/ml progressively slowed the growth of yeast cells harboring the Rho expression plasmid. The growth inhibition trend parallels the amount of Rho protein produced in the yeast cells, as revealed by Western blot experiments (Fig. 1C).

Conceivably, there are several possible mechanisms by which the heterologous expression of Rho could have generated a dose-dependent toxic effect in yeast. In an attempt to exclude any effect unrelated to the functional features of the termination factor, we performed growth measurements in the presence of the Rho-specific inhibitor bicyclomycin. This antibiotic is known to inhibit Rho-dependent transcription termination in bacteria by binding to the functional hexameric form of the Rho factor and interfering with its ATPase activity (44, 62, 72). As shown in Fig. 1D, the addition of bicyclomycin to the yeast culture fully relieved the growth defect of the strain expressing Rho and did not have any noticeable effect on the growth of the strain under repressing conditions or on that of the strain harboring the control vector. We next examined whether Rho-induced toxicity stems from a metabolic process arising within the nucleus, which is expected if Rho factor interferes with transcription. To this end, the DNA sequence encoding the NLS was deleted from the Rho expression plasmid, and the newly created construct (Rho-ΔNLS) was introduced into the BMA41 yeast strain. The transformant spotted on agar plates recovered a full capacity to grow under inducing conditions (Fig. 1A). Taken together, these results indicate that Rho-induced toxicity in yeast relies on the nuclear localization of the protein and presumably is linked to its functional characteristics in the bacterial transcription termination process.

Rho-induced toxicity in yeast parallels its functional integrity as a transcription termination factor in bacteria. Among the various Rho mutants defective in bacterial transcription termination, the replacement of lysine 352 by glutamic acid in the *rho*suA1 allele was shown to decrease the secondary-site RNA binding activity of hexameric Rho in vitro, leading to a defect in its ATPase and helicase activities (42, 46). Consistently with this, *Rho*suA1 has a reduced ability to terminate transcription in vitro and in vivo, presumably because its translocation along the RNA transcript is partially impaired. To evaluate whether Rho factor could function in yeast by a mechanism reminiscent of the Rho-dependent transcription termination process in bacteria, we tested whether the K352E replacement could diminish or suppress Rho toxicity. The wild-type *rho* allele in the Rho-NLS construct was replaced by the *rho*suA1 allele (referred to as *rho-KE*), yielding the plasmid Rho-KE-NLS, which was introduced into the BMA41 strain. The growth test on selective agar plates was performed with

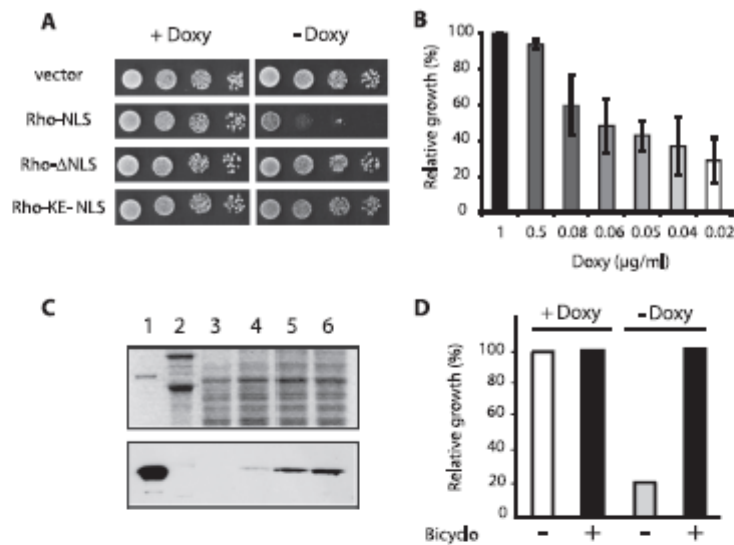


FIG. 1. Rho expression in the nucleus of yeast cells induces a dose-dependent growth defect. (A) Nuclear expression of Rho causes a growth defect in yeast. Strain BMA41 was transformed with the empty vector (pCM188) or the Rho expression constructs harboring the Rho gene fused with or deleted of the NLS (pCM188-Rho-NLS or pCM188-Rho-ΔNLS) and the Rho mutant variant (pCM188-Rho-KE-NLS). Tenfold serial dilutions of transformants grown selectively in liquid medium at 25°C with 1 μg/ml Dox (noninduced conditions) were spotted on Rho-repressing (+Doxy) or Rho-inducing (-Doxy) plates. The plates were photographed after 3 days at 25°C. (B) Rho-induced toxicity is dose dependent. BMA41 cells transformed with pCM188-Rho-NLS were grown selectively at 25°C overnight in liquid medium with Dox concentrations ranging from 1 to 0.02 μg/ml for the progressive induction of Rho. Relative growth, which was set arbitrarily to 100 for the sample under Rho-repressing conditions, corresponds to the OD₆₀₀ measured after 16 h of growth. (C) Rho production as a function of Dox concentration. BMA41 cells transformed with pCM185-Rho-NLS were grown at 25°C overnight in liquid medium. Proteins were extracted in lysis buffer, and the same amount of extract was resolved on each of two gels; one was stained with Coomassie blue, and the other one was analyzed by Western blotting. Lane 1, purified bacterial Rho protein; lane 2, low-molecular-weight-SDS marker (Amersham). Lanes 3 to 6 correspond to the yeast protein extracts from cells grown with 1, 0.08, 0.04, and 0.02 μg/ml Dox, respectively. (D) The Rho-specific inhibitor bicyclomycin (bicyclo) relieves Rho-induced growth defect in yeast. BMA41 cells containing the pCM188-Rho-NLS expression vector were grown at 25°C with 1 μg/ml Dox to an OD₆₀₀ of 0.6. Cells were washed, and equal amounts of cells were resuspended in repressive (+Doxy) or inducible (-Doxy) liquid medium containing (+) or lacking (-) bicyclomycin at a final concentration of 60 μg/ml. Relative growth, arbitrarily set to 100, corresponds to the OD₆₀₀ measured after 12 h of growth under repressing conditions in medium lacking bicyclomycin.

this newly created plasmid in parallel with the two control plasmids (empty vector and the plasmid expressing wild-type Rho). As shown in Fig. 1A, inducing the expression of Rho-KE protein in the yeast cells no longer was toxic compared to the expression of wild-type Rho, yet the growth was not fully restored compared to that of the empty vector. This intermediate effect (the mild growth defect phenotype) induced by the *rho-KE* allele was reproduced by monitoring cell growth in liquid medium at different concentrations of Dox. Moreover, as for wild-type Rho, Western blot analyses revealed a correlation between the observed growth lag and the amount of Rho-KE protein produced in the yeast cells. Additional Rho mutants with no marked effects on transcription termination in bacteria also were tested. The results indicated that the mutations that do not impair Rho activity in bacteria do not alleviate its toxic effect in yeast (data not shown).

Rho expression in yeast affects steady-state mRNA levels. The ability of Rho factor to dissociate paused RNAP II ternary complexes in vitro (31) and the fact that the toxic effect induced by the expression of the protein in yeast requires its nuclear localization suggested that Rho toxicity is linked to its action on the transcription of one or several essential genes. To evaluate this hypothesis, we measured the steady-state abun-

dance of different RNAs produced in cells harboring the Rho expression plasmid and grown at different concentrations of Dox (from 1 to 0.02 μg/ml). The levels of a set of RNA species were examined by Northern blot analyses (Fig. 2). The steady-state levels of RNAP I-transcribed rRNAs (18S and 5.8S) remained stable even when maximal Rho induction was achieved (0.02 μg/ml Dox), which is consistent with the lack of Rho effect during in vitro transcription with RNAP I (31). Similarly, the amounts of RNAs synthesized by RNAP III (scr1, 5S, and tRNA^{Met}) were unchanged under Rho expression conditions. We note, however, that these steady-state measurements cannot exclude a small effect of Rho on transcription driven by RNAP I and RNAP III due to the high stability of the corresponding RNAs. In contrast, the steady-state levels of transcripts synthesized by RNAP II clearly were affected by increasing the extent of Rho expression. The greatest effect of Rho expression on the accumulation of RNAP II-dependent transcripts varied between a 60% reduction in the case of PMA1 transcript and a 30 to 40% reduction for the three other mRNAs tested (ACT1, PGK1, and FBA1). These observations lend support to our hypothesis that the toxic effect of Rho in yeast stems from its action on the expression of some essential genes transcribed by RNAP II. However, so

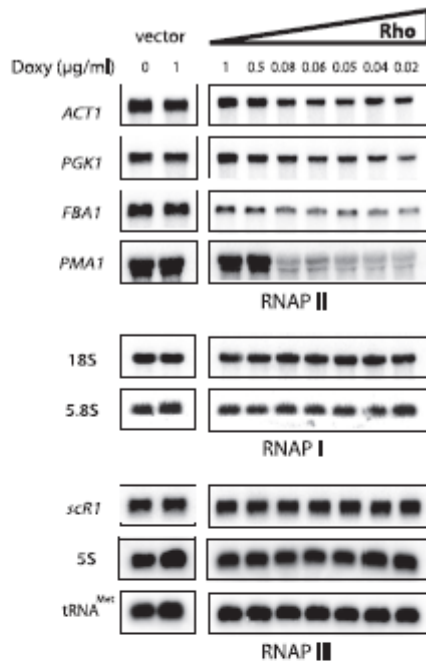


FIG. 2. Toxic effect of Rho is linked to its action on RNAP II-dependent transcription. Northern blot analyses of total RNAs extracted from cultures of BMA41 cells transformed with the empty vector or the Rho expression plasmid grown with various concentrations of Dox. Samples of total RNAs (6 µg) were fractionated on an agarose gel and transferred to a membrane, and the steady-state levels of specific RNAs were detected sequentially using the 5'-end-labeled probes ACT1, PGK1, FBA1, 18S, 5.8S, scR1, 5S, and tRNA^{Met} or a PMA1 random-primed probe (see Table S3 in the supplemental material).

far these results do not allow us to distinguish between a direct action of Rho on the transcription elongation complex that would lead to the premature termination of the transcripts and an effect of Rho associated with the production of defective mRNPs that subsequently would be identified and eliminated by the mRNA quality control system (see below).

Rho-KE expression in yeast phenocopies hypersensitivity of transcription elongation mutants to nucleotide-depleting drugs. Mutations within RNAP II or transcription factors that cause transcript elongation defects can be revealed in yeast by growing the cells in the presence of nucleotide-depleting drugs such as mycophenolic acid (MPA) or 6-azauracil (6-AU). The reduction of cellular nucleotide pools leads to a decrease in both the rate and the processivity of RNA synthesis, which exacerbates transcription elongation defects (14, 37, 60).

We hypothesized that if the growth defect induced by Rho in yeast results from its action on RNAP II-dependent transcript elongation, this effect should be aggravated in the presence of nucleotide-depleting drugs. The effect of the drugs was tested in a strain expressing the plasmidic *rho-KE* allele. This allele is particularly convenient for that purpose, since its intermediate effect (the mild growth defect phenotype) allows us to monitor cell growth by searching for synergistic sensitivity effects. To

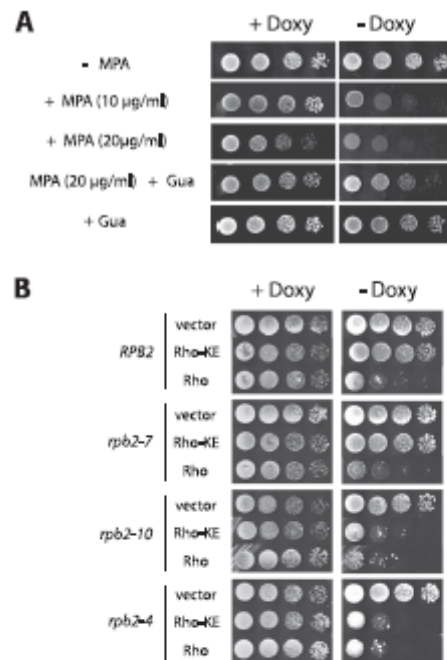


FIG. 3. Rho-induced growth defect is aggravated in a slow RNAP II background. (A) The *rho-KE* allele phenocopies the MPA sensitivity of elongation mutants. The BMA41 strain transformed with the plasmid expressing the *rho-KE* allele was grown under repressing conditions until an OD₆₀₀ of 0.6. Tenfold serial dilutions were spotted for growth at 25°C under repressing (+Doxy) or inducing (-Doxy) conditions with 0, 10, or 20 µg/ml MPA. When necessary, guanine (Gua) was added at 100 µg/ml. Plates were incubated for 2 days (-MPA) or for 4 days (+MPA) at 25°C. (B) The mild growth defect induced by the *rho-KE* allele is exacerbated in slow RNAP II elongation mutants. Yeast cells harboring the wild-type isogenic strain and *rpb2* mutant alleles were transformed with plasmids carrying the *rho* allele, the *rho-KE* allele, or the empty vector. The cells grown selectively under repressing conditions were serially diluted and spotted for growth at 25°C under inducing (-Doxy) or repressing (+Doxy) conditions for 3 days.

determine the effect of reducing nucleotides pools in cells expressing the *rho-KE* allele under the TetO₂ promoter, a culture of transformed strain BMA41 was spotted on agar plates in the presence or absence of Dox and containing 0, 10, or 20 µg/ml MPA. Under Rho-KE expression conditions, an increased sensitivity to the nucleotide-depleting drug was observed, as evidenced by the inhibition of cell growth in the presence of MPA even at the lowest concentration tested (10 µg/ml) (Fig. 3A). Interestingly, the growth defect was alleviated significantly by the addition of guanine to the MPA-containing medium, confirming that the *rho-KE* allele renders the cells hypersensitive to the nucleotide-depleting drug through a transcription-related process. Similar results were obtained when the growth tests were performed with 6-AU at a concentration of 75 µg/ml (data not shown). These data show that the *rho-KE* allele in yeast phenocopies the MPA and 6-AU hypersensitivity of mutants with transcription elongation defects.

RNAP II mutants defective in transcription elongation exacerbate the Rho-KE-induced mild growth defect. If the hypersensitivity to MPA and 6-AU observed with the expression of Rho-KE protein is reminiscent of a deficiency in transcription elongation, then combining this mild growth defect allele with an RNAP II mutant defective in elongation should produce a synergistic severe growth defect phenotype similar to the phenotype observed with the expression of wild-type Rho. This idea was tested with a set of three isogenic mutant strains (*rpb2-7*, *rpb2-10*, and *rpb2-4*) having single-amino-acid substitutions in the second largest subunit of RNAP II and that have been well characterized in vitro and in vivo (9, 32, 37, 43). The *rpb2-10* and *rpb2-4* alleles encode catalytically slow forms of RNAP II that are characterized by an approximately twofold decrease in the elongation rate, low processivity, and an increase in transcriptional pausing. Conversely, no marked elongation defects were found for the *rpb2-7* allele, suggesting that this mutation affects other steps in the transcription cycle, such as initiation (43). The growth tests depicted in Fig. 3B confirmed our hypothesis. As for the isogenic yeast cells harboring the wild-type *RPB2* allele, the three mutant strains were sensitive to the expression of wild-type Rho protein. Interestingly, the growth of the catalytically deficient *rpb2-10* and *rpb2-4* mutants expressing the Rho-KE protein was severely impaired, whereas under the same conditions, no growth impairment was observed for both the wild-type *RPB2* and the mutant *rpb2-7* strains. These results indicate that the mild growth defect induced by the expression of Rho-KE is aggravated in a slow RNAP II mutant, leading to a synergistic severe growth defect phenotype. To exclude the possibility that the observed synergistic sensitivity is linked exclusively to mutations within the *RPB2* subunit, we tested the mutant *rpb1-N488D*, which has an amino acid substitution in the largest subunit of RNAP II that leads to a decrease in the rate of RNA synthesis in vitro (36). Again, we found that the mild growth defect induced by the expression of Rho-KE is aggravated in this slow RNAP II mutant (results not shown).

Increasing the elongation rate of RNAP II or decreasing its pausing propensity alleviates Rho-induced toxicity. Because the data described above indicate that the mild growth defect of the *rho-KE* allele is aggravated in a strain with a decreased RNAP II elongation rate, we reasoned that an increase in the elongation rate and/or a reduction in the pausing efficiency of the enzyme should circumvent Rho toxicity. To address this question, we tested two different yeast strains that have distinct mutations but similar phenotypes (i.e., fast RNAP II).

A mutation in the gene encoding the largest subunit of RNAP II that significantly increases the RNA polymerization rate of the enzyme in vitro has been isolated recently in two independent screens (26, 36). This mutation (*rpb1-E1103G*) affects a residue located within the G loop, a highly conserved region close to the active center of the enzyme. Cells were transformed with plasmids expressing both the *Rho* and the *rho-KE* alleles under the galactose-dependent Gal1 promoter (the Gal system was used for selection convenience). As shown in Fig. 4A, the expression of the Rho-KE protein did not induce any marked growth defect in the fast RNAP II mutant and the isogenic wild-type strains. Most importantly, the more severe growth defect resulting from the expression of the wild-type Rho protein in the wild-type yeast cells (*RPB1*) is partially

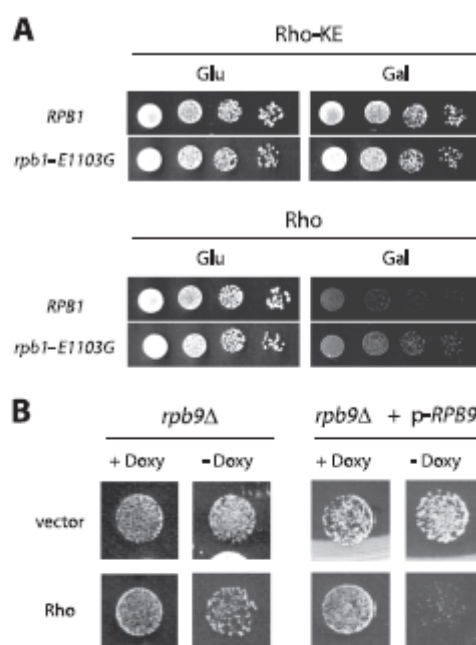


FIG. 4. Rho-induced growth defect is alleviated in fast RNAP II mutants. (A) The fast RNAP II mutant (GRY 3028) and the isogenic wild-type strain (GRY 3020) were transformed with plasmids expressing Rho or the Rho-KE variant under the GAL1 promoter. The transformants were grown selectively under repressing conditions (glucose [Glu]), serially diluted, and spotted for growth at 25°C under inducing (galactose [Gal]) or repressing (glucose) conditions for 5 days. (B) The *rpb9Δ* strain was cotransformed with either the p-*RPB9* plasmid or the parental vector pRS413 and the Rho expression plasmid or the empty vector. Growth conditions were the same as those described in the legend to Fig. 1A, except that the spots with the *rpb9Δ* strain were photographed after 7 days of growth at 25°C due to the slow-growth phenotype of the Rpb9p-depleted cells.

relieved in the *rpb1-E1103G* genetic background, which indicates that this fast RNAP II is less sensitive to Rho action than the wild-type enzyme (Fig. 4A).

The second fast mutant tested is a strain lacking Rpb9p, a nonessential RNAP II subunit that was implicated in transcription elongation and transcriptional fidelity in vivo (19, 40). In vitro transcription experiments have shown that Rpb9-deficient RNAP II synthesizes RNA at the same velocity as the wild-type enzyme but stops less frequently at DNA sequences that promote the pausing of the transcription complex. This lower efficiency of pausing by Rpb9-deficient RNAP II leads to an increase of the overall rate of elongation by the polymerase (4).

The plasmid expressing the wild-type *Rho* allele driven by the TetO₂ promoter as well as the empty vector were transformed into an *rpb9Δ* strain, and growth tests were performed on selective agar plates under noninducing and inducing conditions. The results clearly show that, in the absence of the Rpb9p subunit, the expression of the bacterial Rho factor no longer is toxic to the yeast cells (Fig. 4B). Moreover, the complementation of the *rpb9Δ* strain with a centromeric plas-

mid expressing the *RPB9* gene under its own promoter severely reduced cell growth under Rho expression conditions, which is expected if Rho factor interferes with transcript elongation by the fully reconstituted RNAP II (Fig. 4B).

Depletion of the nuclear exosome component Rrp6p relieves Rho-induced toxicity and restores the steady-state abundance of mRNAs to normal levels. If the reduction in the amount of full-length mRNA species observed for the four representative RNAP II-dependent transcripts (Fig. 2) results from Rho-induced premature transcription termination, this should be accompanied by the production of truncated mRNAs. However, we repeatedly failed to detect any prematurely terminated mRNAs by Northern blotting, even when using probes that cover the most 5'-proximal parts of the transcripts. Moreover, the extent of full-length mRNA reduction observed for the representative transcripts was similar whether the blots were hybridized with a 5'-proximal or a 3'-proximal probe (results not shown). A possible explanation for these results could be that truncated transcripts do not accumulate because they are targeted by exosome-mediated degradation. In an attempt to stabilize the putative truncated transcripts, we expressed Rho protein in a yeast strain in which the gene encoding the nuclear exosome component Rrp6p was deleted. Surprisingly, growth test experiments revealed that Rho expression in yeast cells lacking Rrp6p is no longer toxic (Fig. 5A). Western blot analyses indicated that the amount of Rho protein produced in the cells was unaffected by the Rrp6p depletion (results not shown), which excludes the possibility that the relief of the growth defect induced by the *RRP6* knockout is linked to a decrease in Rho expression. Furthermore, as shown for one representative transcript (*PMA1*), the steady-state abundance of full-length mRNA in the *rrp6Δ* strain expressing Rho was restored to more than 95% of the normal level (Fig. 5B). Numerous studies have shown that aberrantly processed transcripts are targets for nuclear exosome-mediated degradation (see Introduction and reference 67). In light of these previous findings, our results imply that the toxic effect of Rho in yeast stems from its interference in some mRNA processing and/or packaging events, leading to the production of defective mRNPs that are targeted and degraded by the nuclear quality control system. In support of this conclusion, the deletion of both *AIR1* and *AIR2* genes, which encode two components of the exosome-activating complex (TRAMP), likewise leads to relief of the Rho-induced growth defect as well as a complete restoration of *PMA1* steady-state mRNA abundance (Fig. 5A and B).

The Rho-induced decrease of the *PMA1* steady-state mRNA level and its restoration in the *rrp6Δ* strain also was assessed by RNA 3'-end examination following RNase H cleavage (Fig. 5C). As expected, the analysis revealed that in the steady-state pool of mRNAs, a fraction still is polyadenylated with apparent size heterogeneity in the poly(A) tails. Interestingly, the poly(A) tails of mRNAs extracted from the *rrp6Δ* strain grown under Rho expression conditions appear to have a more pronounced heterogeneity, with a slight shift toward longer tails (Fig. 5C, compare lanes 4 and 5). Given that a portion of the transcripts in the pool actually is defective but has not been degraded by the compromised exosome, this trend may reflect the Rho-induced mRNA aberrancies previously observed in the case of the TREX mutants (24, 33). The

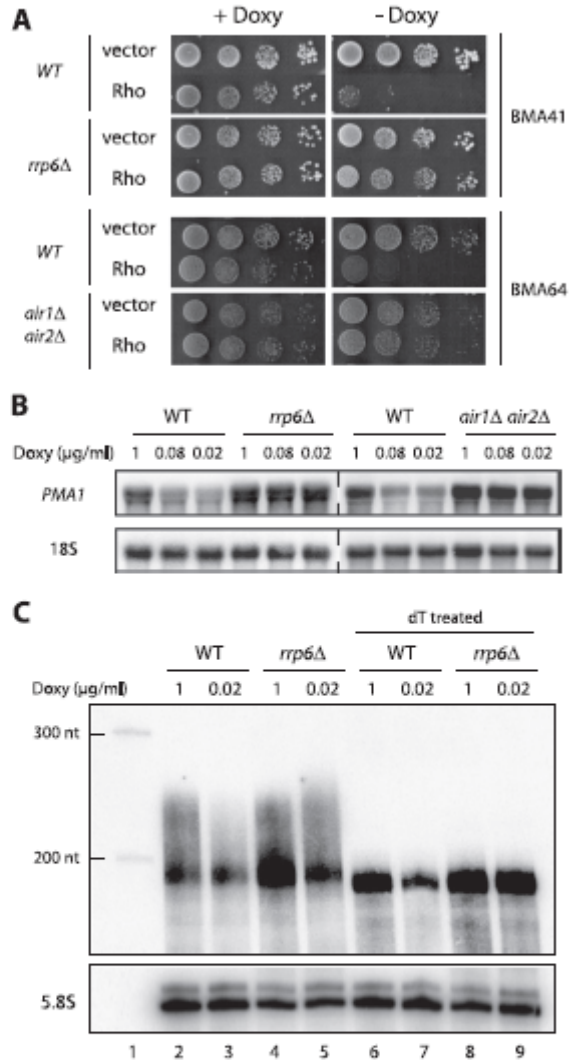


FIG. 5. Depletion of exosome components Rrp6p or Air1p and Air2p alleviates the Rho-induced growth defect and restores the level of steady-state *PMA1* mRNA. (A) The *rrp6Δ* and *air1Δ air2Δ* mutants and the corresponding wild-type (WT) isogenic strains were transformed with the empty vector or the Rho expression plasmid. Growth tests were carried out as described in the legend to Fig. 1A. (B) Northern blot analyses were performed as described in the legend to Fig. 2, with 10 μ g of total RNAs extracted from the cells harboring the Rho expression plasmid and grown in the presence of 1, 0.08, and 0.02 μ g/ml Dox. The membrane was hybridized sequentially with a *PMA1* random-primed probe and a 5'-end-labeled oligonucleotide for 18S rRNA, which serves as an internal control. (C) For the analysis of *PMA1* mRNA 3' ends, total RNAs were annealed with oligonucleotide N1, which is specific to the *PMA1* gene, and then treated with RNase H. Where specified, oligo(dT) was included to remove the poly(A) tails. After fractionation on a 6% polyacrylamide gel and transfer onto a nylon membrane, *PMA1* mRNAs were visualized using radiolabeled oligonucleotide N2. nt, nucleotide.

TABLE 1. Dosage suppressors of the Rho-induced growth defect^a

Gene name and type of suppressor	Systematic name	Suppression phenotype	Rescue of PMA1 mRNA	Molecular function
Factors involved in transcription regulation, mRNA processing, and export				
TAF14	YPL129w	+++	+++	Subunit of TFIID, TFIIF, and mediator
RAD3	YER171w	+	–	DNA helicase involved in nucleotide excision repair and transcription
RAD26	YJR035w	+	–	Involved in transcription-coupled repair
RNA14	YMR061w	++	++	Component of CFIA
PCF11	YDR228c	++	++	Essential component of CFIA
SUB2	YDL084w	++	+	Component of the TREX complex required for nuclear mRNA export
MEX67	YPL169c	++	+++	RNA binding protein involved in nuclear mRNA export
MTR2	YKL186c	+	–	Mtr2p and Mex67p form a mRNA export complex that binds to RNA
MLP2	YIL149c	+++	+	Myosin-like protein associated with the nuclear envelope
CTL1 ^b	YMR180c	+	+	mRNA triphosphatase-like capping enzyme
SXM1	YDR395w	++	+	Suppressor of mRNA export mutant
RNA1	YMR235c	++	++	GTPase-activating protein for Gsp1p, involved in nuclear transport
TIF3	YPR163c	++	+	Translation initiation factor eIF4B
Proteins with ill-defined or unknown molecular functions				
CCT7	YJL111w	++	–	Chaperone involved in de novo protein folding
RAX1	YOR301w	++	–	Protein involved in bud site selection during bipolar budding
KIN3	YAR018c	++	–	Protein kinase
PEX30	YLR324w	++	++	Peroxisomal membrane protein
ORF1	YDR520c	++	++	Putative transcription factor; contains the Zn(II)2Cys6 motif
ORF2	YIL152w	++	–	Q-rich domain protein

^a +, ++, and +++ indicate the extent (weak, medium, and strong, respectively) of Rho-induced growth defect suppression. The symbols also pertain to the strength of PMA1 mRNA restoration; – indicates faint or absent PMA1 mRNA restoration. The effects were evaluated under stringent conditions of Rho expression (i.e., the TetO₂ promoter).

^b Isolated twice during the screen.

quantification of the steady-state abundance of the mRNAs obtained after poly(A) ablation [oligo(dT) treated] is in agreement with the Northern blot analysis of the full-length transcripts (Fig. 5C, lanes 6 to 9).

Screen for dosage suppressors of Rho-induced growth defect identifies numerous factors involved in transcription regulation, mRNA processing, and export. We reasoned that if Rho-induced toxicity in yeast results from its interference in mRNA processing and/or packaging events through a competition with the participating factors, the overexpression of some of these factors should alleviate the growth defect. To evaluate this idea, a yeast genomic library made within a high-copy-number plasmid was transformed into a yeast strain harboring the Dox-regulated Rho expression system. To increase the stringency of the screen, the Rho gene was driven by the strong TetO₇ promoter instead of the TetO₂ promoter. The transformed cells first were plated on Dox-containing medium (repressing conditions) to select for transformants, then replicated to Dox-free plates (inducing conditions) and screened for surviving colonies. Approximately 40,000 colonies were screened manually, and a total of 20 positive candidates were isolated, including one candidate that was isolated twice. The candidates were investigated by rescuing the plasmids in *E. coli* and analyzing the inserted genomic DNA. Subsequently, the

ORFs contained within the suppressing genomic DNA fragments were cloned and tested individually for the dosage suppression of the Rho-induced growth defect in yeast. Based on the extent of growth defect alleviation, the 19 positive ORFs were categorized as strong, medium, and weak suppressors (Table 1). As shown with representative examples in Fig. 6, relief of the Rho-induced growth defect by the suppressors is accompanied by a partial restoration of the PMA1 steady-state mRNA abundance. The data obtained with the full set of suppressors are depicted in Fig. S1 in the supplemental material. In most cases, the extent of PMA1 mRNA restoration parallels the strength of the growth defect suppression. However, for a few suppressors, only faint or no significant mRNA restoration was observed even when the stringency of the assay was decreased by expressing Rho from a TetO₂ promoter (see Fig. S1 in the supplemental material). The mRNA restoration by the suppressors was not evaluated systematically for the other transcripts (ACT1, PGK1, and FBA1). The amounts of Rho protein produced by the yeast cells harboring the dosage suppressor genes were analyzed by Western blotting, and the results excluded the possibility of a direct effect of the suppressors on Rho expression that would lead to growth defect mitigation.

Remarkably, the hunt revealed 13 suppressor genes whose

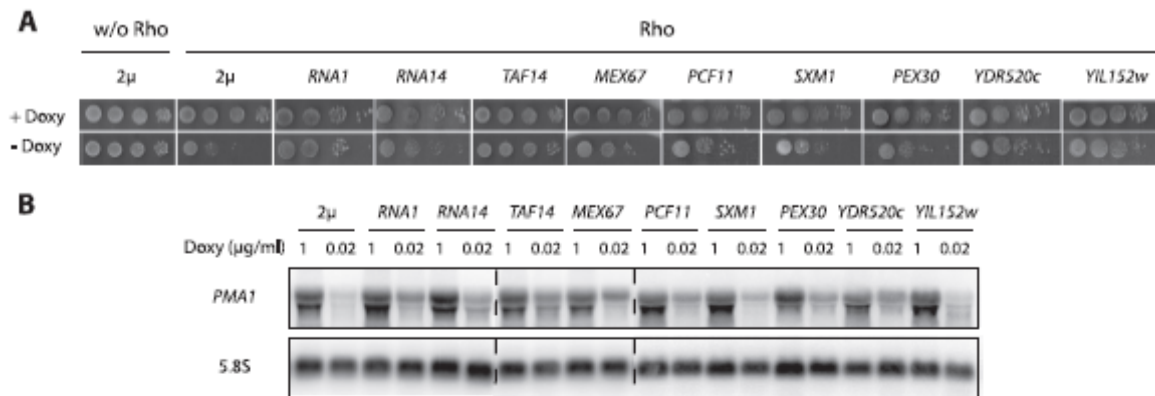


FIG. 6. Growth defect relief and partial PMA1 mRNA restoration by nine representative dosage suppressors. (A) The Rho-induced growth defect is relieved in strains that overexpress RNA1, RNA14, TAF14, MEX67, PCF11, SXM1, PEX30, YDR520c, and YIL152w ORFs. BMA41 strains cotransformed with pCM185-Rho-NLS and the episomal plasmids bearing the indicated ORFs were grown selectively under repressing conditions and spotted for growth as described in the legend to Fig. 1A, w/o, without. (B) Overexpression of the ORFs induces a partial restoration of the steady-state level of PMA1 mRNA. Northern blot analyses made with 10 µg of total RNAs extracted from the above-described cotransformants grown selectively with 0.02 or 1 µg/ml Dox were carried out as described in the legend to Fig. 2.

proteins have relatively well-known or predicted molecular functions that cover a broad spectrum of mRNA metabolism, ranging from transcription regulation to mRNA processing, packaging, and export. *TAF14* is among the strongest suppressors. It encodes a protein that is a component of a number of different complexes involved in transcription regulation (TFIID, TFIIF, and mediator) as well as chromatin remodeling and modification (NuA3 and SWI/SNF). Two other genes (*RAD3* and *RAD26*), with weak suppressing phenotypes and a faint restoration of PMA1 mRNA, encode proteins that also are involved in processes linked to transcription (transcription regulation and transcription-coupled repair). Two genes having medium suppressing phenotypes (*RNA14* and *PCF11*) are involved in mRNA 3'-end processing and transcription termination, and they encode two subunits of cleavage and polyadenylation factor I (CFIA). Four suppressor genes (*SUB2*, *MEX67*, *MTR2*, and *MLP2*) encode well-known components of mRNP nuclear export complexes that connect mRNA synthesis to translation. Whereas *SUB2*, *MEX67*, and *MLP2* exhibit medium to strong suppressing phenotypes with significant PMA1 mRNA restoration, *MTR2* is a weak suppressor. In addition, three other suppressor genes (*CTL1*, *SXM1*, and *RNA1*) are predicted to play a role in mRNA export from the nucleus. *CTL1* encodes a nonessential 5'-triphosphatase related to mRNA capping enzyme that previously was isolated in a two-hybrid screen and suspected to have a nuclear export activity (23, 47). The protein encoded by *SXM1* was found to be concentrated in the nucleus and the nuclear envelope, and its overproduction relieves the defects of mRNA export mutants (59). *RNA1* encodes an activator of the small GTPase (Gsp1p) that is involved in nucleocytoplasmic transport, and its mutation was shown to cause the accumulation of poly(A) RNA in the nucleus (5). Finally, *TIF3* encodes the yeast homologue of mammalian translation initiation factor eIF4B, which was shown to have an RNA annealing activity in vitro (41).

The screen reveals new factors with ill-defined or unknown molecular functions. The Rho-based screen also identified six suppressor genes whose products are listed in the *S. cerevisiae* Genome Data Base as proteins with putative functions that are unrelated to mRNA metabolism or proteins with unknown molecular functions. *CCT7* encodes a component of a multi-subunit complex that mediates protein folding and that recently was found to interact with components of the nuclear pore complex (10). *RAX1* encodes a predicted integral membrane protein involved in bud site selection (25). *KIN3* encodes a nonessential protein kinase with an unknown cellular role. Although these three suppressors (*CCT7*, *RAX1*, and *KIN3*) show medium suppressing phenotypes, the PMA1 mRNA restoration was hardly observed. *PEX30* encodes a peroxisomal integral membrane protein with unknown molecular function. This medium suppressor induces a significant restoration of PMA1 mRNA. In addition, two uncharacterized ORFs with medium suppression phenotypes were revealed by the screen. YDR520c and YIL152w are supposed to encode putative transcription factors based on the predicted presence of a zinc cluster domain and a glutamine-rich domain, respectively. Although the two ORFs exhibit similar suppression phenotypes, they differ by the extent of PMA1 mRNA restoration. Whereas a significant amount of PMA1 mRNA was restored by YDR520c, only a faint amount was observed in the case of YIL152w.

DISCUSSION

In this study, we show that the conditional expression of Rho protein in the nucleus of *S. cerevisiae* leads to a dose-dependent growth defect phenotype. The growth defect is modulated by mutations in RNAP II that increase or decrease the rate of RNA synthesis, and it is suppressed when the Rho-specific inhibitor bicyclomycin is added to the yeast culture or when the NLS is removed from the protein. Moreover, a point mutation

in Rho that impairs its helicase/translocase activities and consequently reduces its termination efficiency in bacteria (the *rho-KE* allele) mitigates the growth defect in yeast. Taken together, our findings indicate that the defect induced by the heterologous expression of Rho in yeast stems from its action on RNAP II-mediated transcription and is associated with its functional characteristics in the bacterial transcription termination process, which include binding to a nascent transcript, followed by 5'-to-3' translocation along the RNA chain to reach and disrupt transcription elongation complexes located at downstream sites.

Our initial expectation was that Rho action in yeast would produce predominantly truncated transcripts by inducing the premature dissociation of transcription elongation complexes, as occurs in bacteria. However, although minor Rho-dependent premature termination events that would generate short-lived truncated transcripts cannot be excluded, the molecular analyses of the steady-state abundance of representative RNAs support an alternative outcome in which Rho activity affects the integrity of seemingly complete transcripts, leading to their degradation by the nuclear exosome. This is revealed by the fact that the loss of full-length mRNAs observed in the presence of Rho factor is totally offset in yeast strains having compromised nuclear exosome activity (the *mp6Δ* mutant or *air1Δ air2Δ* double mutant). The precise molecular features that make mRNAs targets for exosome-mediated degradation in the presence of Rho activity presently are unclear. Nevertheless, based on the functional characteristics of the bacterial factor, it is likely that the loading of Rho onto nascent transcripts and its subsequent tracking along the RNA chains out-compete the deposition of the endogenous processing and packaging factors. This should lead to the production of mRNPs that are improperly processed or depleted of some crucial proteins, and that will be recognized as export incompetent and eliminated by the exosome-mediated nuclear mRNA quality control system. Interestingly, the effects induced by Rho expression closely resemble those reported for yeast strains with defects in mRNA 3'-end cleavage and polyadenylation or mRNP assembly and export machineries in which RNAP II-dependent transcription produces full-length, yet export-incompetent, transcripts that are targeted and degraded by the nuclear mRNA quality control system (21, 33, 38, 50). Recent studies of such mutant strains suggest that the recognition of defective transcripts by the quality control system is triggered by inefficient polyadenylation, a step preceding the commitment to nuclear export at which kinetic competition between mRNA 3'-end processing and degradation will favor the removal of aberrant transcripts (49, 52). Whether a similar mechanism applies for the Rho-induced exosome sensitivity of the transcripts remains to be determined. In effect, our examination of the 3' ends of the PMA1 steady-state mRNA pool did not allow us to draw a clear conclusion as to a possible involvement of inefficient polyadenylation in the targeting of Rho-induced aberrant transcripts by the quality control system. Similar inconclusive results also were obtained in analyses of steady-state pools of the other mRNAs tested. A more conclusive study will require the use of a model transcription unit having an inducible promoter for closer analyses of the poly(A) tails within de novo-synthesized transcripts.

Our experiments with RNAP II mutants and nucleotide-

depleting drugs show a correlation between the rate of RNA synthesis and the severity of a Rho-induced growth defect. Slower-transcribing RNAP II complexes are more easily targeted by Rho, whereas faster-transcribing complexes seem to escape Rho action. The first implication of these results is that Rho action that leads to the production of exosome-sensitive mRNPs obviously is taking place during transcript elongation, which supports the current view of physical and functional interconnections between transcription elongation and mRNP biogenesis. This also indicates that there is probably a time window within which Rho can load onto a nascent transcript, and which is dependent on the overall speed of the transcribing polymerase. Notably, the relief of the Rho-induced growth defect in an *mp6Δ* strain, in which transcribing RNAP II is known to have a lesser propensity to dwell at intrinsic pause sites, suggests that the time window for Rho loading is connected with the pausing of the transcription elongation complex. Candidates for such pausing events that may allow efficient Rho loading are the two well-documented transitions experienced by the transcription complex at the 5' end and the 3' end of the genes, where a dynamic exchange of factors around the nascent transcript occurs (6, 17, 55). Pausing at the promoter-proximal region serves to ensure the correct capping of the emerging transcript and the recruitment of the early mRNP assembly proteins, whereas pausing at the 3' end of the genes is required to recruit the termination and polyadenylation factors (27, 28, 30). The initial binding of Rho to the transcript may constitute the first interference in the mRNA processing and packaging events by a direct competition with the participating factors. However, a full interference in the mRNP biogenesis process requires the tracking of the protein along the RNA chain, as suggested by the growth defect mitigation induced by a point mutation in Rho that impairs somewhat its helicase/translocase activities (the *rho-KE* allele).

How does Rho action affect cell growth? Since Rho has a fairly loose sequence requirement for its loading onto a transcript (see Introduction), it is expected to target a large spectrum of mRNAs. Indeed, a genome-wide survey of the yeast transcriptome by DNA microarray did not reveal any specific genes or a subset of genes as hotspots of the Rho-mediated effect (unpublished results). Apparently, Rho acts as a global disturber of gene expression in yeast. In this view, each Rho-induced interference that produces a defective mRNP will hinder the corresponding metabolic pathway, adding an extra impairment to normal cell physiology. The cumulative effect of all Rho-induced interferences should produce a growth defect phenotype that is modulated by varying the extent of Rho expression. This reasoning led us to screen a yeast genomic library for dosage suppressors of the Rho-induced growth defect, with the idea that the overproduction of a protein partner for which an mRNP was defective could shift its competition with Rho and thus provide a partial relief of the growth defect. The rationale of this Rho-based screen was largely validated by the fact that almost 50% of the suppressor genes identified (9 out of 19) encode proteins involved in mRNA 3'-end formation or mRNP assembly and export. In effect, two suppressors (*RNA14* and *PCF11*) are important components of the cleavage factor CFI_A that are known to be recruited to the transcript at the 3' end of the genes. Four other suppressors (*SUB2*, *MEX67*, *MTR2*, and *MLP2*) are well-known factors

that interact with the transcript and participate in the network of proteins linking mRNA synthesis to translation. Three additional suppressors (*CTL1*, *SXMI*, and *RNAI*) have been predicted by genetic and biochemical screens to play a role in mRNP nuclear export (5, 23, 47, 59). A common action of these suppressors could be to increase the speed at which the mRNPs are transported into the cytoplasm for translation. Such action would help defective mRNPs escape degradation by the nuclear quality control system.

In addition to a direct validation of the assay, the Rho-based screen revealed three suppressors (*TAF14*, *RAD3*, and *RAD26*) that are known to be involved directly or indirectly in transcription regulation. The most robust suppressor, *TAF14*, encodes a subunit of the initiation factors TFIID, TFIIF, and mediator, and we speculate that its suppressing effect stems from a significant increase of both the transcription rate and the number of transcription events within the targeted genes. According to the model of cooperation between RNAP molecules transcribing in tandem (13), increasing the number of initiation events will decrease pausing efficiency and duration, and this will reduce the opportunity for Rho to load onto nascent transcripts. This anti-pausing effect of *TAF14* also could be explained by its known participation in chromatin remodeling complexes. Although it has only a modest suppressing phenotype, *RAD3* may act by a similar mechanism, as it encodes a subunit of the transcription factor TFIIF, and its genetic interaction with components of the mRNP assembly machinery was reported previously (21, 22). *RAD26* encodes a DNA helicase that is involved in transcription-coupled repair, and its deletion results in a synthetic growth defect with the deletion of the exosome component gene *RRP6*, which suggests its connection with mRNA metabolism (20). This connection of transcription-coupled repair with mRNP biogenesis and export also was highlighted by a recent study (16).

The Rho-based screen also revealed suppressors with ill-defined or unknown molecular functions. Three genes seem to encode integral membrane proteins (*RAX1* and *PEX30*) or a protein interacting with the nuclear pore complex (*CCT7*). These intriguing findings could be explained within the framework of the emerging view that gene transcription and the concomitant mRNP biogenesis and export are linked physically to the nuclear envelope and the nuclear pore complex (11, 65). One possibility is that the overproduction of such suppressors helps the export of a subset of Rho-induced defective mRNPs that are otherwise translatable and thus will partake in the growth defect relief. The functions of two uncharacterized ORFs (*YDR520c* and *YIL152w*) identified by the screen remain to be determined. However, based on the prediction that they encode putative transcription factors, it is possible that their suppressing effect results from a mechanism similar to the one discussed for *TAF14*.

In summary, our study shows that the use of bacterial Rho factor in yeast represents a valuable approach to examine the interplay between transcription, mRNP biogenesis, and export. The results clearly support the idea of functional and physical interconnections between the different activities of mRNA synthesis, processing, packaging, and export, and they provide a proof of principle of an assay that can be used to screen for new factors involved in these integrated processes. The Rho-based screen also provides a new tool to dissect the in vivo

dynamics of known mRNA processing and binding proteins around the transcript, which will help us to comprehend the contributions of each factor in the network of interactions within an mRNP.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the following people for generous gifts of strains, plasmids, and a yeast library: S. Hermann, D. Libri, F. Malagon, J. Richardson, H. Ronne, P. Thuriaux, and F. Winston. We are grateful to M. Boudvillain and D. Libri for stimulating discussions and to H. Bénédetti for help in strain construction.

The work was supported in part by the FRM (Loiret), la Ligue contre le Cancer (Région Centre), and the CNRS (program PEPS).

REFERENCES

1. Abruzzi, K. C., S. Lacadie, and M. Roshash. 2004. Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *EMBO J.* 23:2620–2631.
2. Aguilera, A. 2005. Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:242–250.
3. Andralis, E. D., J. Werner, A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and J. T. Lis. 2002. The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in *Drosophila*. *Nature* 420:837–841.
4. Awrey, D. E., R. G. Weilbaecher, S. A. Hemming, S. M. Orlicky, C. M. Kane, and A. M. Edwards. 1997. Transcription elongation through DNA arrest sites. A multistep process involving both RNA polymerase II subunit RPB9 and TFIIS. *J. Biol. Chem.* 272:14747–14754.
5. Brodsky, A. S., and P. A. Silver. 2000. Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. *RNA* 6:1737–1749.
6. Buratowski, S. 2005. Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:257–261.
7. Chávez, S., T. Beilharz, A. G. Rondon, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Q. Svejstrup, T. Lithgow, and A. Aguilera. 2000. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mfl1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19:5824–5834.
8. Ciampi, M. S. 2006. Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* 152:2515–2528.
9. Cui, Y., and C. L. Denis. 2003. In vivo evidence that defects in the transcriptional elongation factors RPB2, TFIIS, and SPT5 enhance upstream poly(A) site utilization. *Mol. Cell. Biol.* 23:7887–7901.
10. Dekker, C., P. C. Stirling, E. A. McCormack, H. Filmore, A. Paul, R. L. Brost, M. Costanzo, C. Boone, M. R. Leroux, and K. R. Willison. 2008. The interaction network of the chaperonin CCT. *EMBO J.* 27:1827–1839.
11. Diepkins, G., N. Iglesias, and F. Stutz. 2006. Cotranscriptional recruitment to the mRNA export receptor Mex67p contributes to nuclear pore anchoring of activated genes. *Mol. Cell. Biol.* 26:7858–7870.
12. Doma, M. K., and R. Parker. 2007. RNA quality control in eukaryotes. *Cell* 131:660–668.
13. Epstein, V., F. Toulme, A. R. Rahmouni, S. Borukhov, and E. Nudler. 2003. Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *EMBO J.* 22:4719–4727.
14. Exinger, F., and F. Lacroute. 1992. 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 22:9–11.
15. Fasken, M. B., and A. H. Corbett. 2005. Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:482–488.
16. Gaillard, H., R. E. Wellinger, and A. Aguilera. 2007. A new connection of mRNP biogenesis and export with transcription-coupled repair. *Nucleic Acids Res.* 35:3893–3906.
17. Glover-Cutter, K., S. Kim, J. Espinosa, and D. L. Bentley. 2008. RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:71–78.
18. Guérin, M., N. Robichon, J. Geiselmann, and A. R. Rahmouni. 1998. A simple polypyrimidine repeat acts as an artificial Rho-dependent terminator in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res.* 26:4895–4900.
19. Hemming, S. A., D. B. Jansma, P. F. Macgregor, A. Goryachev, J. D. Friesen, and A. M. Edwards. 2000. RNA polymerase II subunit Rpb9 regulates transcription elongation in vivo. *J. Biol. Chem.* 275:35506–35511.
20. Hieronymus, H., M. C. Yu, and P. A. Silver. 2004. Genome-wide mRNA surveillance is coupled to mRNA export. *Genes Dev.* 18:2652–2662.
21. Jensen, T. H., J. Boulay, J. R. Olesen, J. Colin, M. Weyler, and D. Libri. 2004. Modulation of transcription affects mRNP quality. *Mol. Cell* 16:235–244.
22. Jensen, T. H., J. Boulay, M. Roshash, and D. Libri. 2001. The DEC1D box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. *Curr. Biol.* 11:1711–1715.
23. Jensen, T. H., M. Neville, J. C. Rain, T. McCarthy, P. Legrain, and M. Roshash. 2000. Identification of novel *Saccharomyces cerevisiae* proteins with

nuclear export activity: cell cycle-regulated transcription factor acc2p shows cell cycle-independent nucleocytoplasmic shuttling. *Mol. Cell. Biol.* **20**:8047–8058.

24. Jensen, T. H., K. Patricio, T. McCarthy, and M. Rosbash. 2001. A block to mRNA nuclear export in *S. cerevisiae* leads to hyperadenylation of transcripts that accumulate at the site of transcription. *Mol. Cell* **7**:887–898.

25. Kang, P. J., E. Angerman, K. Nakashima, J. R. Pringle, and H. O. Park. 2004. Interactions among Rax1p, Rax2p, Bud5p, and Bud9p in marking cortical sites for bipolar bud-site selection in yeast. *Mol. Biol. Cell* **15**:5145–5157.

26. Kaplan, C. D., K. M. Larsson, and R. D. Kornberg. 2008. The RNA polymerase II trigger loop functions in substrate selection and is directly targeted by alpha-amanitin. *Mol. Cell* **30**:547–556.

27. Kim, H. J., S. H. Jeong, J. H. Heo, S. J. Jeong, S. T. Kim, H. D. Youn, J. W. Han, H. W. Lee, and E. J. Cho. 2004. mRNA capping enzyme activity is coupled to an early transcription elongation. *Mol. Cell. Biol.* **24**:6184–6193.

28. Kim, M., S. H. Ahn, N. J. Krogan, J. F. Greenblatt, and S. Buratowski. 2004. Transitions in RNA polymerase II elongation complexes at the 3' ends of genes. *EMBO J.* **23**:354–364.

29. Köhler, A., and E. Hurt. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:761–773.

30. Komarnitsky, P., E. J. Cho, and S. Buratowski. 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.* **14**:2452–2460.

31. Lang, W. H., T. Platt, and R. H. Reeder. 1998. *Escherichia coli* rho factor induces release of yeast RNA polymerase II but not polymerase I or III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:4900–4905.

32. Lennon, J. C., III, M. Wind, L. Saunders, M. B. Hock, and D. Reines. 1998. Mutations in RNA polymerase II and elongation factor SII severely reduce mRNA levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5771–5779.

33. Libri, D., K. Dower, J. Boulay, R. Thomsen, M. Rosbash, and T. H. Jensen. 2002. Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol. Cell. Biol.* **22**:8254–8266.

34. Longine, M. S., A. McKenzie, III, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J. R. Pringle. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:953–961.

35. Luna, R., S. Jimeno, M. Marin, P. Huertas, M. Garcia-Rubio, and A. Aguilera. 2005. Interdependence between transcription and mRNA processing and export, and its impact on genetic stability. *Mol. Cell* **18**:711–722.

36. Malagon, F., M. L. Kireeva, B. K. Shafer, L. Lubkowska, M. Kashlev, and J. N. Strathern. 2006. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* RPB1 gene conferring hypersensitivity to 6-azauracil. *Genetics* **172**:2201–2209.

37. Mason, P. B., and K. Struhl. 2005. Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Mol. Cell* **17**:831–840.

38. Milligan, L., C. Torchet, C. Allmang, T. Shipman, and D. Tollervey. 2005. A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **25**:9996–10004.

39. Nehlin, J. O., M. Carlberg, and H. Ronne. 1989. Yeast galactose permease is related to yeast and mammalian glucose transporters. *Gene* **85**:313–319.

40. Nesser, N. K., D. O. Peterson, and D. K. Hawley. 2006. RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:3268–3273.

41. Niederberger, N., H. Trachsel, and M. Altmann. 1998. The RNA recognition motif of yeast translation initiation factor Tif3/eIF4B is required but not sufficient for RNA strand-exchange and translational activity. *RNA* **4**:1259–1267.

42. Pereira, S., and T. Platt. 1995. Analysis of *E. coli* rho factor: mutations affecting secondary-site interactions. *J. Mol. Biol.* **251**:30–40.

43. Powell, W., and D. Reines. 1996. Mutations in the second largest subunit of RNA polymerase II cause 6-azauracil sensitivity in yeast and increased transcriptional arrest in vitro. *J. Biol. Chem.* **271**:6866–6873.

44. Richardson, J. P. 2003. Loading Rho to terminate transcription. *Cell* **114**:157–159.

45. Richardson, J. P. 2002. Rho-dependent termination and ATPases in transcription termination. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**:251–260.

46. Richardson, J. P., and J. L. Carey, III. 1982. rho Factors from polarity suppressor mutants with defects in their RNA interactions. *J. Biol. Chem.* **257**:5767–5771.

47. Rodriguez, C. R., T. Takagi, E. J. Cho, and S. Buratowski. 1999. A *Saccharomyces cerevisiae* RNA 5'-triphosphatase related to mRNA capping enzyme. *Nucleic Acids Res.* **27**:2181–2188.

48. Rosen, K. M., E. D. Lamperti, and I. Villa-Komaroff. 1990. Optimizing the northern blot procedure. *BioTechniques* **8**:398–403.

49. Rougemaille, M., G. Dieppois, E. Kisseleva-Romanova, R. K. Gudipati, S. Lemoine, C. Blugeon, J. Boulay, T. H. Jensen, F. Stutz, F. Devaux, and D. Libri. 2008. THO/Sub2p functions to coordinate 3'-end processing with gene-nuclear pore association. *Cell* **135**:308–321.

50. Rougemaille, M., R. K. Gudipati, J. R. Olesen, R. Thomsen, B. Seraphin, D. Libri, and T. H. Jensen. 2007. Dissecting mechanisms of nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 complex mutants. *EMBO J.* **26**:2317–2326.

51. Sagnez, C., J. R. Olesen, and T. H. Jensen. 2005. Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**:287–293.

52. Sagnez, C., M. Schmid, J. R. Olesen, M. A. Ghazy, X. Qu, M. B. Poulsen, T. Nasser, C. Moore, and T. H. Jensen. 2008. Nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 mutants is triggered by inefficient polyadenylation. *Mol. Cell* **31**:91–103.

53. Sallés, F. J., W. G. Richards, and S. Strickland. 1999. Assaying the polyadenylation state of mRNAs. *Methods* **17**:38–45.

54. Sambrook, J., and D. W. Russel (ed.). 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

55. Saunders, A., L. J. Core, and J. T. Lis. 2006. Breaking barriers to transcription elongation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:557–567.

56. Schmitt, M. E., T. A. Brown, and B. L. Trumpower. 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**:3091–3092.

57. Schwartz, A., E. Margeat, A. R. Rahmouni, and M. Boudvillain. 2007. Transcription termination factor rho can displace streptavidin from biotinylated RNA. *J. Biol. Chem.* **282**:31469–31476.

58. Schwartz, A., C. Walmaçq, A. R. Rahmouni, and M. Boudvillain. 2007. Noncanonical interactions in the management of RNA structural blocks by the transcription termination rho helicase. *Biochemistry* **46**:9366–9379.

59. Seedorf, M., and P. A. Silver. 1997. Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:8590–8595.

60. Shaw, R. J., and D. Reines. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* transcription elongation mutants are defective in PUR5 induction in response to nucleotide depletion. *Mol. Cell. Biol.* **20**:7427–7437.

61. Sikorski, R. S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19–27.

62. Skordalakes, E., A. P. Brogan, B. S. Park, H. Kohn, and J. M. Berger. 2005. Structural mechanism of inhibition of the Rho transcription termination factor by the antibiotic bicyclomycin. *Structure* **13**:99–109.

63. Sommer, P., and U. Nehrbass. 2005. Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**:294–301.

64. Strässer, K., S. Masuda, P. Mason, J. Pfannstiel, M. Oppizzi, S. Rodriguez-Navarro, A. G. Rondon, A. Aguilera, K. Struhl, R. Reed, and E. Hurt. 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**:304–308.

65. Taddel, A. 2007. Active genes at the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**:305–310.

66. Vien, E., and A. R. Rahmouni. 2004. Dual role of boxB RNA motif in the mechanisms of termination/antitermination at the lambda trl1 terminator revealed in vivo. *J. Mol. Biol.* **339**:1077–1087.

67. Villa, T., M. Rougemaille, and D. Libri. 2008. Nuclear quality control of RNA polymerase II ribonucleoproteins in yeast: tilting the balance to shape the transcriptome. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**:524–531.

68. Vinciguerra, P., and F. Stutz. 2004. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**:285–292.

69. Walmaçq, C., A. R. Rahmouni, and M. Boudvillain. 2006. Testing the steric exclusion model for hexameric helicases: substrate features that alter RNA-DNA unwinding by the transcription termination factor Rho. *Biochemistry* **45**:5885–5895.

70. Wyers, F., M. Rougemaille, G. Badis, J. C. Rousselle, M. E. Dufour, J. Boulay, B. Regnault, F. Devaux, A. Namane, B. Seraphin, D. Libri, and A. Jacquier. 2005. Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* **121**:725–737.

71. Zenklusen, D., P. Vinciguerra, J. C. Wyss, and F. Stutz. 2002. Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol. Cell. Biol.* **22**:8241–8253.

72. Zwiefka, A., H. Kohn, and W. R. Widger. 1993. Transcription termination factor rho: the site of bicyclomycin inhibition in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**:3564–3570.

Résultats

Table S1- *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study

Strains	Genotypes	sources
BMA41	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100</i>	Baudin-Baillieu et al. (1997)
BMA41	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100</i>	Baudin-Baillieu et al. (1997)
<i>rrp6Δ</i>	as BMA41 <i>MATa</i> with <i>rrp6Δ::kanMX4</i>	This study
BMA64	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100</i>	Baudin-Baillieu et al. (1997)
<i>air1Δ air2Δ</i>	as BMA64 with <i>air1Δ::HIS3 air2Δ::kanMX4</i>	D. Libri laboratory
YVV9	<i>MATα ade2-1 ura3-52 leu2-3,112 his3Δ200 trp1Δ63 lys2 rpb9-Δ1::HIS3</i>	Van Müllem et al. (2002)
GRY3020	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 trp1Δ::hisG lys2Δ0 met15Δ0 URA3::CMV-tTA RPB1</i>	Malagon et al. (2006)
GRY3027	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 trp1Δ::hisG lys2Δ0 met15Δ0 URA3::CMV-tTA rpb1-N488D</i>	Malagon et al. (2006)
GRY3028	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 trp1Δ::hisG lys2Δ0 met15Δ0 URA3::CMV-tTA rpb1-E1103G</i>	Malagon et al. (2006)
DDT-ct2	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1Δ63 lys2 met15Δ0 rpb2Δ::kanMX4 (pRP2-4L rpb2-4 CEN LEU2)</i>	P. Thuriaux laboratory
CMY 289	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1Δ63 lys2 met15Δ0 rpb2Δ::kanMX4 (pRP212 RPB2 CEN URA3)</i>	This study
CMY 374	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1Δ63 lys2 met15Δ0 rpb2Δ::kanMX4 (pRP2-10 rpb2-10 CEN URA3)</i>	This study
CMY 379	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1Δ63 lys2 met15Δ0 rpb2Δ::kanMX4 (pRP2-7 rpb2-7 CEN URA3)</i>	This study
CKY289	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 or Δ0 trp1Δ63 met15Δ0 lys2-128δ gal10Δ56 rpb2Δ::CLONATMX RPB3::TAP::KlacTRP1 (pRP212 RPB2 CEN URA3)</i>	Kaplan et al., 2005
CKY374	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 or Δ0 trp1Δ63 met15Δ0 lys2-128δ gal10Δ56 rpb2Δ::CLONATMX RPB3::TAP::KlacTRP1 (pRP2-10 rpb2-10 CEN URA3)</i>	Kaplan et al., 2005
CKY379	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 or Δ0 trp1Δ63 met15Δ0 lys2-128δ gal10Δ56 rpb2Δ::CLONATMX RPB3::TAP::KlacTRP1 (pRP2-7 rpb2-7 CEN URA3)</i>	Kaplan et al., 2005

Résultats

Table S2 - Plasmids used in this study

Plasmids	Yeast genes	Rho expression	Backbone vectors	Sources
pYCM8	CEN <i>LEU2</i>	GAL1:: <i>Rho-NLS</i>	pRS415 (a)	This study
pYCM8-Rho-KE	CEN <i>LEU2</i>	GAL1:: <i>Rho-KE-NLS</i>	pRS415 (a)	This study
pCM188-Rho-NLS	CEN <i>URA3</i>	pTet0 ₂ :: <i>Rho-NLS</i>	pCM188 (b)	This study
pCM188-Rho-KE-NLS	CEN <i>URA3</i>	pTet0 ₂ :: <i>Rho-KE-NLS</i>	pCM188 (b)	This study
pCM188-Rho-ΔNLS	CEN <i>URA3</i>	pTet0 ₂ :: <i>Rho-ΔNLS</i>	pCM188 (b)	This study
pCM185-Rho-NLS	CEN <i>TRP1</i>	pTet0 ₇ :: <i>Rho-NLS</i>	pCM185 (b)	This study
pCM185-Rho-KE-NLS	CEN <i>TRP1</i>	pTet0 ₇ :: <i>Rho-KE-NLS</i>	pCM185 (b)	This study
pCB111	none		pET-3a (c)	J. Richardson
pRS413- <i>RPB9</i>	CEN <i>HIS3 RPB9</i>		pRS413 (a)	This study
pHR81	2μ <i>URA3</i>			Nehlin et al., 1989
pAG425GPD-RNA1	2μ <i>LEU2 RNA1</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-RNA14	2μ <i>LEU2 RNA14</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-SXM1	2μ <i>LEU2 SXM1</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-KIN3	2μ <i>LEU2 KIN3</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-RAX1	2μ <i>LEU2 RAX1</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-CCT7	2μ <i>LEU2 CCT7</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-YIL152w	2μ <i>LEU2 YIL152w</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-MLP2	2μ <i>LEU2 MLP2</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-PCF11	2μ <i>LEU2 PCF11</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-PEX30	2μ <i>LEU2 PEX30</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-YDR520c	2μ <i>LEU2 YDR520c</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-TIF3	2μ <i>LEU2 TIF3</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-SUB2	2μ <i>LEU2 SUB2</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-RAD26	2μ <i>LEU2 RAD26</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-RAD3	2μ <i>LEU2 RAD3</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-MTR2	2μ <i>LEU2 MTR2</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pAG425GPD-CTL1	2μ <i>LEU2 CTL1</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
pHR81-TAF14	2μ <i>URA3 TAF14</i>		pHR81	This study
pHR81-MEX67	2μ <i>URA3 MEX67</i>		pHR81	This study

(a) Sikorski and Hieter 1989 Genetics, (b) Euroscarf, (c) Novagen, (d) Addgene

Résultats

Table S3 - Oligonucleotides and amplicons used for Northern blot analyses

Targets	Amplicons, bp	Oligonucleotide sequences	
<i>ACT1</i>	NA	5'-TGAAGAAGATTGAGCAGCGGTTTG	
<i>FBA1</i>	NA	5'-CTAACCATTGGTCCATAGCGGCC	
<i>PGK1</i>	NA	5'-CCTTACCGAAGTACTTCAATTCC	
<i>scR1</i>	NA	5'-TATTAGGTCCAGCCTAACTGCTTAACCAAA	
tRNA ^{MET}	NA	5'-TGCTCCAGGGGAGGTTCGAACTCTCGACC	
5S	NA	5'-TCGCGTATGGTCACCCACTACACTACTCGG	
18S	NA	5'-GGTTAAGGTCTCGTT	
5.8S	NA	5'-TTTCGCTGCGTTCTTCATC	
		Forward	Reverse
<i>PMA1</i>	631	5'-GATGGTCGTATTGTCACTGAAGAC	5'-CAATAGCATCCAAACCCCTTCTTC

NA, data not available

Résultats

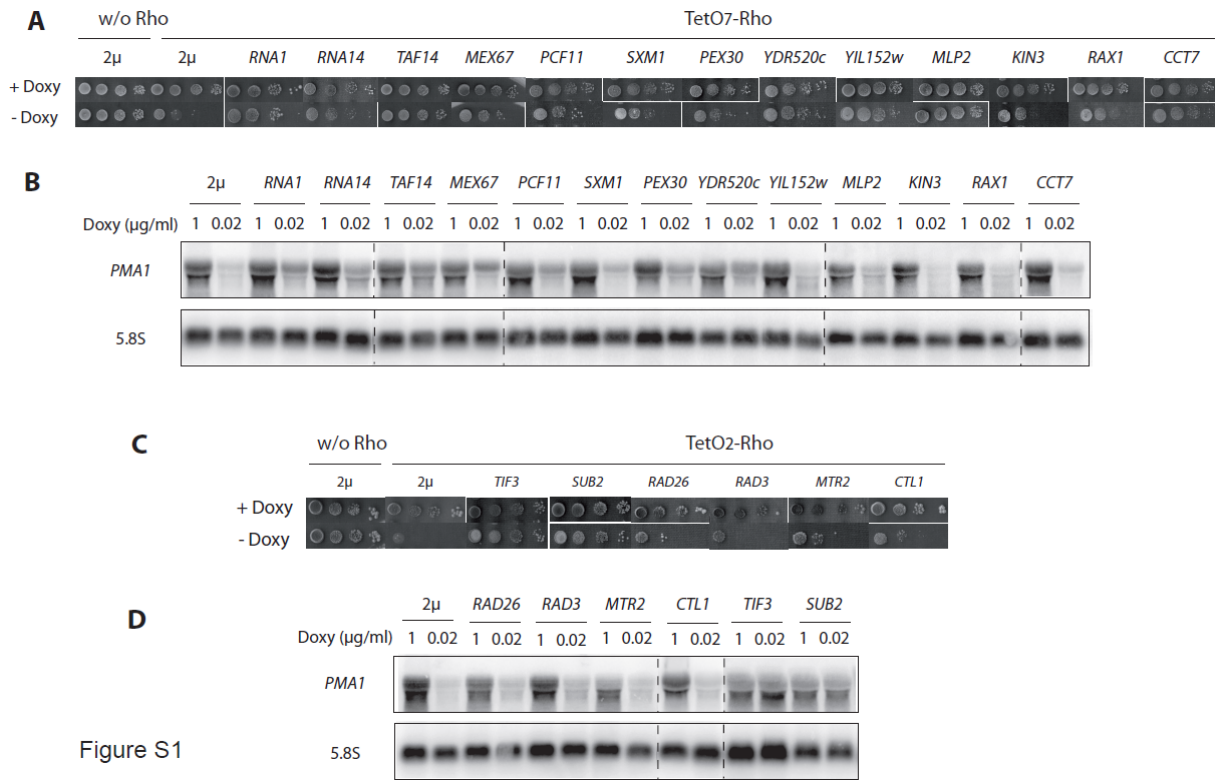


Figure S1

IV. Article II : « Nuclear mRNP quality control mechanism is mediated by a stimulation of Nrd1 co-transcriptional recruitment »

A. Introduction

Les mécanismes de surveillance de la biogénèse des mRNPs permettent d'éviter l'export d'ARNs non-fonctionnels. Ce processus a été caractérisé chez des mutants du complexe TREX ainsi que des mutants de la machinerie de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm. Les mutations de chacun des facteurs constitutifs de ces complexes génèrent de multiples classes de transcrits aberrants : des transcrits entiers ou tronqués, non-polyadénylés ou hyper-polyadénylés. Leurs points communs en sont la dégradation par le système de surveillance Rrp6-dépendant ([Burkard and Butler 2000](#); [Hilleren et al. 2001](#); [Libri et al. 2002](#); [Milligan et al. 2005](#)). La diversité des transcrits aberrants nous amène à nous interroger sur les modalités de détection de ces transcrits par le système de surveillance? Une marque sur le transcrit aberrant pourrait être à l'origine de sa reconnaissance par le système de contrôle qualité.

Lorsque le CTD de l'ARNP II est phosphorylé en Ser5, les domaines Nab3 et CID du facteur Nrd1 contribuent au recrutement co-transcriptionnel du complexe Nrd1c, impliqué, entre autres, dans la terminaison d'ARNm courts ([Vasiljeva et al. 2008](#)). En revanche, la phosphorylation du CTD en Ser2, favorise le recrutement de la protéine Pcf11 du complexe CPF-CF impliqué également dans la terminaison des ARNm ([Gudipati et al. 2008](#)). Dotés de CID homologue, les facteurs Nrd1 et Pcf11 sont aussi capables d'interagir *in vitro* avec le CTD doublement phosphorylé en Ser5/Ser2 ([Vasiljeva et al. 2008](#)). Par conséquent, leur recrutement respectif dépend de la position de l'ARNP II par rapport au site d'initiation de la transcription. Ce modèle suggère une compétition entre la terminaison Nrd1 et CPF-CF-dépendante (figure 18 page 60) ([Gudipati et al. 2008](#)).

Résultats

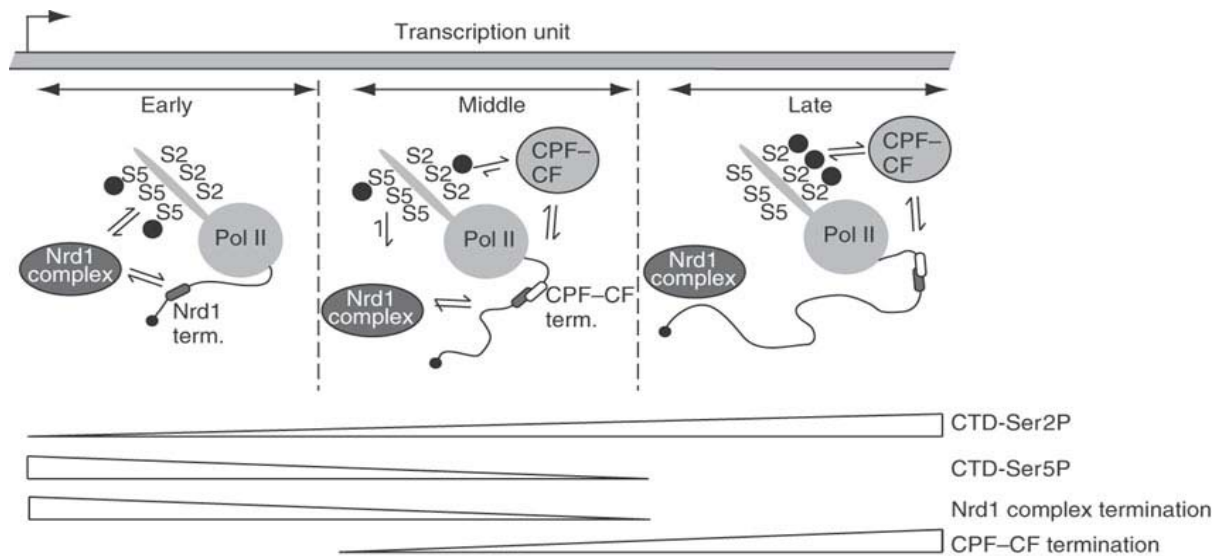


Figure 18 : Modèle illustrant le mode de terminaison Nrd1 ou CPF-CF- dépendante en fonction de la position de l'ARNP II (d'après [Gudipati et al. 2008](#)).

Sachant que Nrd1 est capable d'interagir avec l'exosome nucléaire pour stimuler la dégradation de certaines classes d'ARNs ([Vasiljeva and Buratowski 2006](#)), cette protéine influencerait-elle la dégradation de transcrits aberrants en défaveur d'une terminaison CPF-CF-dépendante ?

Pour répondre à cette question nous avons évalué l'influence des facteurs Nrd1 et Pcf11 sur le contrôle qualité des transcrits aberrants Rho-dépendants. D'après cette étude présentée dans l'article suivant, la surexpression du CID de Pcf11 et la troncature du CTD permettent de restaurer le défaut de croissance Rho-dépendant ainsi que la quantité de certains ARNm. De façon surprenante, la délétion du CID de Nrd1 génère un phénotype similaire. Ces résultats suggèrent que le CTD et le recrutement du facteur Nrd1 sont indispensables à la reconnaissance des transcrits aberrants. Ainsi, la signalisation des transcrits aberrants pourraient être contrôlée par une compétition entre Nrd1 et Pcf11. Des analyses complémentaires indiquent que l'expression de Rho génère un recrutement accru de la protéine Nrd1, le long des séquences codantes des gènes *PMA1* et *PGK1*. L'ensemble de ces résultats converge vers un recrutement majoritaire de Nrd1 par rapport à Pcf11 afin de favoriser la reconnaissance des transcrits aberrants par l'exosome nucléaire. Ainsi, nous

Résultats

proposons un modèle où Nrd1 entrerait en compétition avec Pcf11 pour stimuler les mécanismes de contrôle qualité Rrp6-dépendant.

B. Article II

(à soumettre pour publication)

Nuclear mRNA quality control in yeast is mediated by Nrd1 co-transcriptional recruitment

Romy Honorine^{1, #}, Christine Mosrin-Huaman^{1, #}, Nadège Hervouet-Coste¹, Domenico Libri² and A. Rachid Rahmouni^{1, *}

¹Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 du CNRS
Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France.

²Centre de Génétique Moléculaire, FRE 3144 du CNRS
Avenue de la Terrasse, 91190 Gif sur Yvette, France

ABSTRACT

The production of mature export-competent transcripts is under the surveillance of quality control steps where aberrant mRNP molecules resulting from inappropriate or inefficient processing and packaging reactions are subject to exosome-mediated degradation. The heterologous expression of bacterial Rho factor in yeast interferes in normal mRNP biogenesis leading to the production of full-length yet aberrant transcripts that are degraded by the nuclear exosome with ensuing growth defect. We took advantage of this new tool to investigate the molecular mechanisms by which an integrated system recognizes aberrancies at each step of mRNP formation and targets the defective molecules for destruction. We show that the targeting and degradation of Rho-induced aberrant transcripts is associated with a large increase of Nrd1 recruitment to the transcription complex via its CID and RRM domains and a concomitant enrichment of exosome component Rrp6 association. The targeting and degradation of the aberrant transcripts is suppressed by the overproduction of Pcf11 or its isolated CID domain, through a competition with Nrd1 for recruitment by the transcription complex. Altogether, our results support a model in which a stimulation of Nrd1 co-transcriptional recruitment coordinates the recognition and removal of aberrant transcripts by promoting the attachment of the nuclear mRNA degradation machinery.

INTRODUCTION

During transcription elongation in the eukaryotic nucleus, the nascent mRNA molecule is sequentially coated with a variety of processing and binding proteins that mediate its transformation into an export-competent ribonucleoprotein particle (mRNP) ready for translation in the cytoplasm (Aguilera 2005; Luna et al. 2008). The co-transcriptional maturation and assembly of export-competent mRNPs is facilitated by the C-terminal domain (CTD) of the largest subunit of RNA polymerase II (RNAP II) that serves as a platform for sequential recruitment of the various factors (Perales and Bentley 2009). The CTD is formed by a tandem repetition of a heptapeptide motif (Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7) where a dynamic phosphorylation and dephosphorylation of Ser5 and Ser2 over the course of gene transcription adjusts the sequential recruitment of acting factors (Komarnitsky et al. 2000; Phatnani and Greenleaf 2006; Buratowski 2009).

The production of export-competent transcripts is also under the surveillance of quality control steps that are interconnected with transcription elongation and mRNP biogenesis. Aberrant mRNP molecules resulting from inappropriate or inefficient processing and packaging reactions are targeted by the surveillance mechanisms leading to their retention at the transcription sites where they are degraded by the 3'-to-5' exonuclease activity of the nuclear exosome (Fasken and Corbett, 2005; Saguez et al., 2005; Doma and Parker, 2007; Villa et al., 2008). Insights into this process have come from studies of the budding yeast *S. cerevisiae* mutant strains with defects in mRNA 3'end formation or mRNP assembly and export machineries (Hilleren et al., 2001; Zenklusen et al., 2002; Luna et al., 2005; Milligan et al., 2005). It was shown that deletion or mutation of some components of the THO/Sub2 complex, which loads onto the nascent transcript and connects transcription to export, leads to a decrease in steady-state levels of several mRNAs. The normal levels of mRNAs can be recovered by inactivation of the nucleus-specific exosome component Rrp6 or components of the exosome-activating complex TRAMP (Libri et al., 2002; Rougemaille et al., 2007). This Rrp6-dependent loss of mRNAs is also observed in strains carrying mutations in the mRNA 3'end processing factors

These authors contributed equally to this work

* Corresponding author

Telephone : (33) 2 38 25 76 08

Fax : (33) 2 38 63 15 17

E-mail : rahmouni@cnrs-orleans.fr

Rna14 and Rna15 (Torchet et al., 2002; Milligan et al., 2005).

The molecular mechanisms by which an integrated system recognizes aberrancies at each step of mRNP biogenesis and targets the defective molecules for destruction are still largely unknown. However, several lines of evidence point to a model in which the surveillance apparatus is recruited directly to the transcription complex, a position from which it can scrutinize all mRNP processing and packaging reactions looking for faulty events. For instance, components of *Drosophila* nuclear exosome have been shown to accompany transcribing RNAP II upon recruitment by transcription elongation factors (Andrulis et al., 2002; Hessele et al., 2009). In yeast, genome-wide analyses indicated that the localization of some nuclear exosome subunits correlates with actively transcribed genes (Hieronymus et al., 2004). Also, co-immunoprecipitation experiments in yeast suggested that components of both the exosome and TRAMP interact physically with the transcription complex. This interaction seems to be mediated by Nrd1, a protein involved in transcription termination of a subset of RNAs (Vasiljeva and Buratowski, 2006).

Two main pathways of terminating RNAP II-dependent transcripts have been described in yeast. Termination of poly(A)-containing mRNAs relies on the co-transcriptional recruitment and assembly of a large cleavage and polyadenylation complex that recognizes the termination signal and triggers the cleavage of the nascent transcript with subsequent addition of a poly(A) tail at the 3' end (Nedea et al., 2003; Proudfoot, 2004; Buratowski, 2005; Rosonina et al., 2006; Richard and Manley, 2009). The highly conserved factor, Pcf11, is a prominent component of this complex that interacts with RNA as well as RNAP II via a CTD interacting domain (CID) (Amrani et al., 1997; Barilla et al., 2001; Licatalosi et al., 2002; Sadowski et al., 2003; Zhang et al., 2005). The second termination pathway, used by RNAP II in transcription of the small non-coding snRNAs and snoRNAs, is directed by another CID-containing protein, Nrd1, which binds RNA in a sequence-specific manner (Steinmetz and Brow, 1998; Steinmetz et al., 2001; Kim et al., 2006). Nrd1 is recruited to the transcription complex in association with another sequence-specific RNA binding protein, Nab3. Recently, the Nrd1-Nab3 complex was also implicated in termination and fast decay of Cryptic Unstable Transcripts (CUTs); short non-coding RNAs that were first detected by genome-wide microarray analyses in strains defective for nuclear RNA degradation (Wyers et al., 2005; Arigo et al., 2006; Thiebaut et al., 2006). The co-transcriptional loading of Nrd1-Nab3 complex mediates the recruitment of the exosome and TRAMP which in the case of snRNAs and snoRNAs couples termination to maturation by trimming the 3' ends of precursor RNAs until the encounter of a block formed by stable

RNA structures or RNA-bound Nrd1-Nab3 (Kim et al., 2006; Vasiljeva and Buratowski, 2006). It was suggested that the absence of such structural features in the case of the short-lived CUTs leads to their complete degradation following termination (Arigo et al., 2006; Thiebaut et al., 2006).

Recent studies ascribed the choice between the two termination modes to the stage of CTD phosphorylation which is dependent on the distance traveled by RNAP II from the promoter. Termination of short transcripts (non-coding RNAs and CUTs) appears to be associated with Ser5 phosphorylation and preferential recruitment of Nrd1 (Gudipati et al., 2008; Vasiljeva et al., 2008), whereas termination of longer transcripts relies on the subsequent phosphorylation at Ser2 sites that mediates recruitment of Pcf11 (Nedea et al., 2003; Ahn et al., 2004). However, Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments show clearly that Nrd1 cross-linking is not limited to the early transcribed region of a gene. Nrd1 recruitment within the body of the gene and at its 3' end is only slightly decreased as compared to the 5' part (Nedea et al., 2003; Vasiljeva et al., 2008). Furthermore, a recent reevaluation indicates that the level of Ser5 phosphorylation, necessary for Nrd1 recruitment, persists throughout elongation (Kim et al., 2009; Rondon et al., 2009). These results suggest that Nrd1 could play a pivotal role in the mRNP surveillance mechanism as a part of a protein network that travels with the transcription complex along the transcription unit.

Previously, we have implemented an assay in which mRNP biogenesis in yeast is disturbed by the heterologous expression of the bacterial transcription termination factor Rho. The expression of this RNA-dependent helicase/translocase induces the production of full-length yet aberrant transcripts that are targeted by the surveillance mechanisms leading to their destruction by the nuclear exosome (Mosrin-Huaman et al., 2009). Here, we took advantage of this new assay to explore the involvement of Nrd1 in the nuclear quality control system. We show that Nrd1 recruitment by the transcription complex via its CID and RRM domains is required for the targeting and degradation of the Rho-induced defective transcripts. Remarkably, overexpression of Pcf11 or its isolated CID domain suppresses the targeting and degradation of the Rho-induced aberrant transcripts through a competition with Nrd1 for recruitment by the transcription complex. Altogether, our results provide genetic and molecular evidence indicating that the recognition and targeting of aberrant transcripts is mediated by a large increase in Nrd1 co-transcriptional recruitment which helps to tether the nuclear mRNA degradation machinery.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and Plasmids

The yeast strains used in this study are listed in Supplemental Table S1. Similarly, all the plasmids are listed in Supplemental Table S2. The various overexpression plasmids with N- and C-terminal truncations in the *PCF11* and *NRD1* genes were constructed by amplification of genomic DNA with the gateway primers described in Supplemental Table S3. The M1, M2 and M3 mutations in *pcf11* 1-145 were introduced by overlapping PCR mutagenesis with the primers described in Supplemental Table S3. The deletion of the Nrd1-RRM domain was done by PCR with two sets of partially overlapping primers designed to amplify the DNA sequence corresponding either to the first 339 amino acids or the last 165 amino acids of the Nrd1 protein. The two PCR products were re-amplified with the 5'-end and 3'-end "NRD1" gateway primers described in Supplemental Table S3 to create the Δ RRM plasmid.

RNA Extraction and Northern Blotting

Yeast cells transformed with the appropriate plasmids were grown at 25°C to an OD₆₀₀ of 0.6, then total RNAs were extracted by the hot phenol method (Schmitt et al., 1990). Northern blot and hybridization were described previously (Mosrin-Huaman et al., 2009). Formaldehyde-containing 1.2% agarose gel was used to analyze PMA1 and PGK1 mRNAs and the 5.8S or 18S rRNAs which were detected sequentially using either a PMA1 random-primed probe or 5' end labeled probes (see Supplemental Table S4). Hybridization signals were quantified with a Storm 860 phosphorimager (Molecular Dynamics) and the data were processed with Imagequant software version 2005.

Chromatin Immunoprecipitation

Preparations of chromatin were performed essentially as described by (Kuras and Struhl, 1999). The *NRD1*-TAP (DLY1124) or *RRP6*-TAP (DLY269) strains were co-transformed with the empty vector (pCM185) or the Rho expression plasmid (pCM185-Rho) and either the pAG425GPD vector, the Nrd1 (1-448) or the Pcf11 (1-300) constructs. The «no TAG» control strain is W303 transformed with pAG425GPD vector and either the pCM185 or the pCM185-Rho plasmids. 200 ml of cells grown for approximately 20 hours without doxycycline (OD₆₀₀ ~ 0.6) were fixed with 1% formaldehyde for 20 min. After glycine addition to stop the reaction, the cells were washed and lysed with glass beads to isolate chromatin. The cross-linked chromatin was sheared by sonication to reduce average fragment size to ~ 500 bp. Immunoprecipitation of 800 μ l of chromatin fractions was performed with 37 μ l of IgG sepharose (GE healthcare) overnight at 4°C. After washing beads and chromatin elution, the eluted supernatants and the input controls were incubated with pronase (Sigma, 0.8 mg/ml final concentration) for 1h at 37°C followed by 5h at 65°C to reverse cross-linked DNA complexes. DNA was extracted using the Qiagen PCR-clean up columns. The immunoprecipitated DNAs (output) were quantitated by real time PCR (LightCycler 480 from Roche with the products and instructions recommended by the supplier) using three sets of primers located along the *PMA1* or *PGK1* coding sequence (described in Supplemental Table S5) and normalized to a 1/200 dilution of input DNA. Amplifications were done in duplicate for each sample, averages and standard deviations were calculated based on three independent experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Seraphin and C. Saguez for helpful discussions and also J. Mouaikel and F. Jacquinet for technical assistance. We are indebted to P. Thuriaux and F. Lacroute for generous gifts of yeast strains. This work was supported in part by the

FRM (Loiret), la Ligue contre le Cancer (Grand Ouest) and the CNRS (program PEPS). R. Honorine was a recipient of a fellowship from the Ecole Doctorale Sciences et Technologies, Université d'Orléans.

RESULTS

Bacterial Rho factor induces the production of aberrant transcripts in yeast

In a recent study (Mosrin-Huaman et al., 2009), we reported that the conditional expression of the bacterial Rho factor in the yeast nucleus leads to a dose-dependent growth defect phenotype that stems from its interference in mRNP biogenesis. Rho helicase/translocase action induces the production of full-length but aberrant transcripts that are targeted and degraded by the nuclear exosome. This effect is illustrated in Figure 1 where the growth of yeast cells expressing Rho under the control of a Doxy-regulated TetO₇ promoter within a centromeric plasmid is severely reduced under inducing conditions (-Doxy). Northern blot analysis of the steady-state abundance of a representative mRNA (PMA1) shows almost complete disappearance of the transcript under Rho expression conditions (Figure 1B). However, in a strain lacking the nuclear exosome component Rrp6, the Rho-induced growth defect is totally relieved (Figure 1A) and the steady-state abundance of PMA1 mRNA is restored to more than 80% of the normal level (Figure 1B), indicating that Rho-induced defective mRNPs had been eliminated in the presence of active nuclear RNA degradation machinery. Restoration of the PMA1 mRNA was also obtained upon depletion of two components of the TRAMP complex, Air1 and Air2 (results not shown and Mosrin-Huaman et al., 2009). A similar trend was observed when the steady-state level of another mRNA (PGK1) was monitored (Figure 1B). Note, however, that the effect of Rho on PGK1 expression is less pronounced than for PMA1, as reported previously (Mosrin-Huaman et al., 2009).

Our previous genetic and molecular analyses provided indirect evidence implying that the loading of Rho onto nascent transcripts and its subsequent translocation along the RNA chains counteract the deposition of the endogenous processing and packaging factors. This interference causes the production of mRNPs that are improperly processed or depleted of some crucial proteins and which will be recognized as export-incompetent and eliminated by the exosome-mediated nuclear quality control system. This conclusion led us to screen a yeast genomic library searching for dosage-suppressors of the Rho-induced growth defect, with the idea that the overproduction of a protein partner important for mRNP integrity could shift its competition with Rho and thus rescue the transcript from degradation with the ensuing relief of the growth defect. The rationale of this Rho-based screen was validated by the identification of numerous dosage-suppressor genes

Résultats

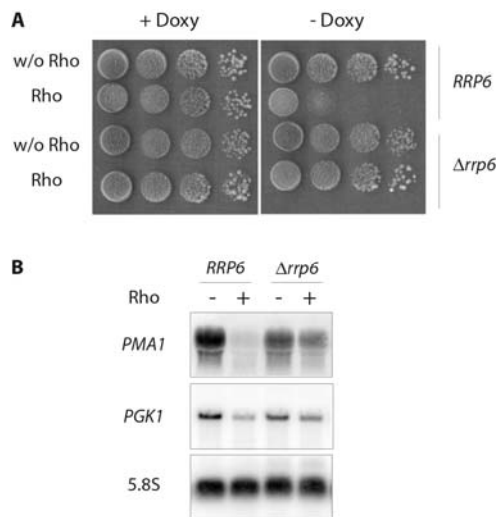


Figure 1: Depletion of the exosome component Rrp6 alleviates Rho-induced growth defect and restores the steady-state levels of mRNAs. **(A)** The *rrp6Δ* mutant and the corresponding BMA41 wild type isogenic strain (*RRP6*) were transformed with the empty vector (pCM185) or the Rho-expression construct harboring the Rho gene under the control of a Doxy-regulated TetO₇ promoter (pCM185-Rho). Ten fold serial dilutions of transformants grown selectively in liquid medium at 25°C with 1 μg/ml Doxy (non-induced conditions) were spotted on Rho-repressing (+ Doxy) or Rho-inducing (- Doxy) plates. The plates were photographed after 3 days at 25°C. **(B)** Northern blot analyses of total RNAs extracted from cultures of cells transformed with the Rho-expression plasmid (pCM185-Rho) and grown with Doxy at a concentration of 1 μg/ml (- Rho) or 0.02 μg/ml (+ Rho). Samples of total RNAs (12 μg) were fractionated on agarose gel, transferred to a membrane and the steady-state levels of specific RNAs were detected sequentially using a *PMA1* random-primed probe or 5'-end labelled probes against *PGK1* mRNA and 5.8S rRNA which serves as loading control (see Supplemental Table S4).

that encode proteins involved in mRNA 3'end formation or mRNP assembly and export (Mosrin-Huaman et al., 2009).

The suppression of Rho-induced defect by Pcf11 overproduction is mediated by its CID

Among the dosage-suppressors found in the Rho-based screen, Pcf11 is a prominent component of the cleavage factor CF1A that is recruited to the nascent transcript through the interaction of its well characterized CID with the CTD of RNAP II (Amrani et al., 1997; Barilla et al., 2001; Sadowski et al., 2003). To gain more insights into the mechanism by which the overproduction of Pcf11 suppresses the Rho-induced defect, we constructed a set of deletion mutants based on the known domain organization of the protein (Figure 2A and Barilla et al., 2001; Sadowski et al., 2003). The constructs expressed from a 2μ vector were transformed into yeast cells harboring the Doxy-regulated Rho expression system and yeast growth was monitored by serial dilutions on

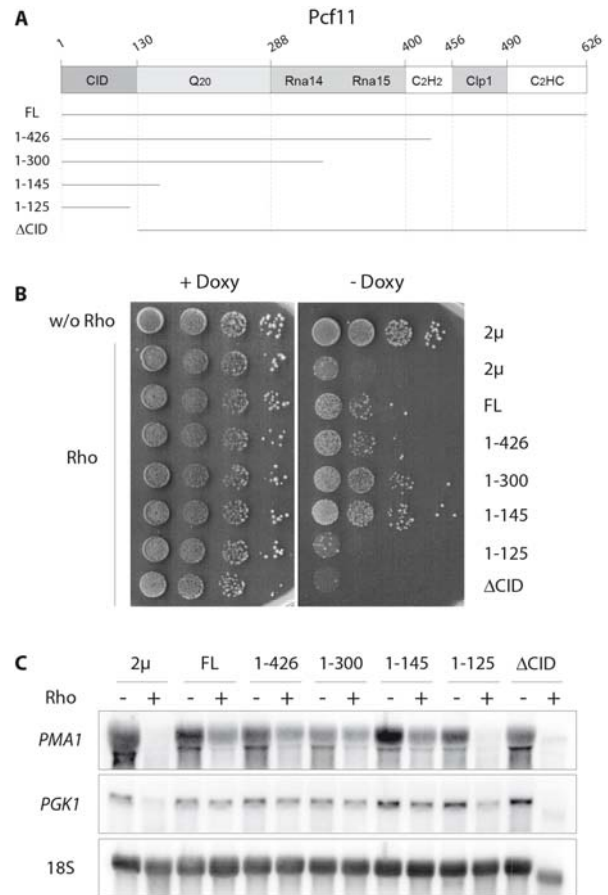


Figure 2: Overexpression of the CID of Pcf11 is sufficient to suppress Rho-induced defect. **(A)** Schematic representation of the structural motifs of Pcf11. This diagram indicates the CID, the Q-rich segment (Q₂₀), the Rna14/Rna15 and Clp1 interaction domains, and the two zinc-finger motifs. The numbers correspond to the amino acid sequence of Pcf11 and the black horizontal lines represent the protein fragments that were expressed from the 2μ plasmid. **(B)** The two control strains were done by co-transformation of the 2μ plasmid with either the empty vector (pCM185) or the plasmid expressing Rho (pCM185-Rho) into the BMA41 wild type strain. BMA41 harboring the Rho expression vector (pCM185-Rho) was co-transformed with a 2μ plasmid overexpressing the full-length Pcf11 (FL) or the various deletion variants represented in A. Strains grown selectively under repressing conditions were spotted for growth as described in Figure 1A. **(C)** Northern blot analyses were made as in Figure 1B and the membrane was hybridized sequentially with a *PMA1* random-primed probe or 5'-end labeled oligonucleotides for *PGK1* mRNA and 18S rRNA which serves as loading control.

agar plates. Remarkably, the suppressing effect of the Pcf11 variants increased significantly as the C-terminal part of the protein was gradually trimmed (Figure 2B). The strongest suppressing phenotype was obtained with a protein fragment containing the 145 N-terminal amino acids corresponding to the CID domain of Pcf11. A construct with a further truncation into the CID domain up to the last 125 N-terminal amino acids failed to suppress the Rho-induced growth defect. A similar failure to suppress the Rho-induced defect was also observed with the

Résultats

deletion variant in which only the CID domain was removed from Pcf11 (Δ CID). These growth results were substantiated by Northern blot analyses showing a correlation between the restoration of the steady-state abundance of PMA1 mRNA and the growth defect suppression (Figure 2C). A similar correlation was also observed when the steady-state level of another mRNA (PGK1) was monitored (Figure 2C). Taken together, these results indicate that Pcf11 is a dosage-suppressor of the Rho-induced defect owing to the presence of its CID domain which is sufficient on its own to abrogate the defect. Moreover, the fact that the CID fragment is a better suppressor than full-length Pcf11 suggests that the dosage-suppression process is mediated by saturable physical interaction with the CTD. In effect, this interaction has been shown by two-hybrid experiments to be stronger when the CID is in isolation (Sadowski et al., 2003).

Both CTD and RNA contacts within the CID of Pcf11 are required for dosage-suppression of Rho-induced defect

The ability of the isolated CID of Pcf11 to suppress the Rho-induced defect on its own led us to focus our investigations on this protein fragment (construct 1-145). Amino acid mutations within a highly conserved region of the CID (between positions 66 and 70; Figure 3A) that impair correct transcript termination by Pcf11 have been characterized *in vivo* (Sadowski et al., 2003). These mutations were also studied *in vitro* in isolated CID to define their relative contributions to the interactions with the CTD and RNA (Zhang et al., 2005). The CID-M3 mutant which has three consecutive amino acids substituted by alanines (D68A, S69A and I70A) lacks both CTD and RNA binding activities. The CID-M2 variant (D68A, S69A) has a slightly reduced CTD binding ability but retains full RNA binding activity. The third mutant, CID-M1 (A66D), has a full ability to interact with CTD but lacks RNA binding capacity. The constructs overproducing the CID variants were transformed into yeast cells harboring the Rho expression system and growth was monitored by serial dilutions on agar plates. As shown in Figure 3B, both M1 and M3 mutants have lost the ability to suppress the Rho-induced growth defect, whereas the M2 variant has a similar suppressing phenotype than the wild-type CID. The Northern blot analyses are consistent with the growth results with a significant restoration of PMA1 mRNA abundance in the case of M2 overproduction as compared to M1 and M3 (Figure 3C). These results indicate that the relief of Rho-induced defect by overexpression of the CID domain of Pcf11 requires both CTD and RNA binding activities of the protein fragment.

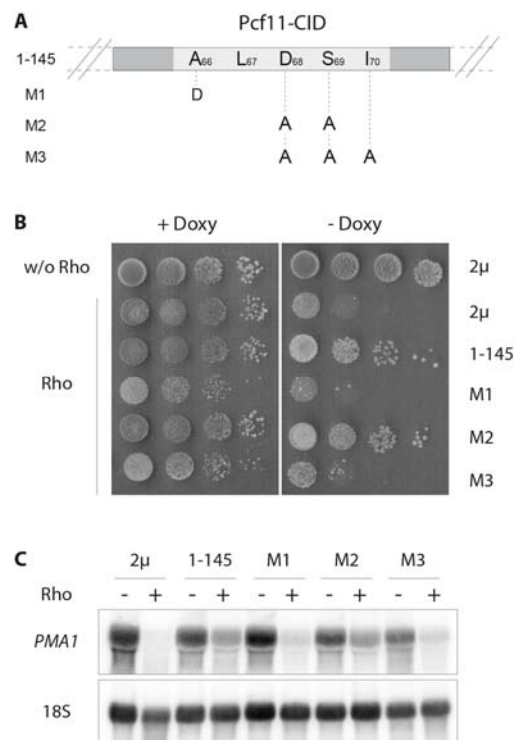


Figure 3: The CTD and RNA binding activities of Pcf11-CID are required for dosage-suppression of the Rho-induced defect. **(A)** Schematic representation of the amino acid substitutions introduced within the CID of Pcf11. **(B)** BMA41 strains were co-transformed with pCM185-Rho and one of the 2 μ plasmids overproducing one of the Pcf11-CID domain (1-145) variants. Growth tests were carried out as described in Figure 1A. **(C)** Northern blots were performed as in Figure 1B.

The Rho-induced defect is aggravated in yeast cells with defective Pcf11

The results described above suggest that the suppression of Rho-induced defect by overproduction of Pcf11 or its CID domain could be mediated by a competition with a factor recruited to the transcription complex that orchestrates the targeting of aberrant transcripts with the ensuing growth defect. If such competition is already taking place under physiological expression of Pcf11, then a deficiency in its CID that impairs its CTD and RNA binding activities should exacerbate the Rho-induced defect. To evaluate this assumption, we tested the sensitivity to Rho expression of a yeast strain carrying the *pcf11-13* allele which has a defect in the CID corresponding to the M3 mutation described above (Sadowski et al., 2003). The sensitivity to the bacterial factor was monitored by expressing both the wild-type Rho and the Rho-KE variant which has a point mutation that reduces its helicase/translocase activity producing a mild growth defect phenotype in yeast (Mosrin-Huaman et al., 2009). This intermediate effect of Rho-KE in yeast is particularly convenient to monitor synergistic sensitivity effects. As shown in Figure 4A, a similar growth inhibition was observed for *PCF11* and *pcf11-13* cells upon expression of wild-type Rho.

Résultats

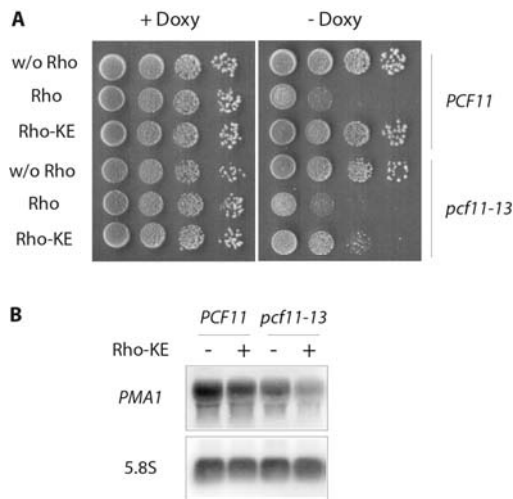


Figure 4: A Pcf11 mutant strain with a defective CID due to impaired CTD and RNA binding activities is Rho hypersensitive. **(A)** The *pcf11-13* mutant (DLY915) and the wild type isogenic strain (DLY913) were transformed with an empty vector (pCM189) or a plasmid expressing Rho (pCM189-Rho) or the Rho-KE variant (pCM189-Rho-KE). Growth tests were carried out as described in Figure 1A. **(B)** Northern blot analyses of total RNAs from the DLY915 and DLY913 transformed strains expressing (+) or not (-) the Rho-KE variant were performed as described in Figure 1B.

In contrast, the expression of Rho-KE, which had virtually no effect on the growth of wild-type *PCF11* cells under the present conditions, induced a significant growth defect for cells harboring the *pcf11-13* allele. This different sensitivity of the two isogenic strains to Rho-KE expression was substantiated by Northern blot analysis of PMA1 mRNA where the steady-state level was clearly affected by Rho-KE expression in *pcf11-13* cells (Figure 4B). As a control, we tested the mutant allele *pcf11-2* which is also defective in transcript cleavage and polyadenylation and in which the mutations are located exclusively outside the CID with no effect on CTD binding (Amrani et al., 1997; Sadowski et al., 2003). In this case, the sensitivity to Rho and Rho-KE expression was similar to the wild-type strain (results not shown). These results support the idea that the recruitment of a factor that mediates the targeting and degradation of Rho-induced aberrant transcripts is favored in the presence of Pcf11 with defective CTD and RNA binding activities.

The Rho-induced defect is suppressed in yeast cells with defective Nrd1 or Nab3 as well as a shortened CTD

Nrd1 is known to interact both with the CTD through its CID domain which is homologous to that of Pcf11 association with Nab3 (Steinmetz and Brow, 1998; Conrad et al., 2000). The Nrd1 complex was also shown to interact with the exosome and TRAMP (Vasiljeva and Buratowski, 2006).

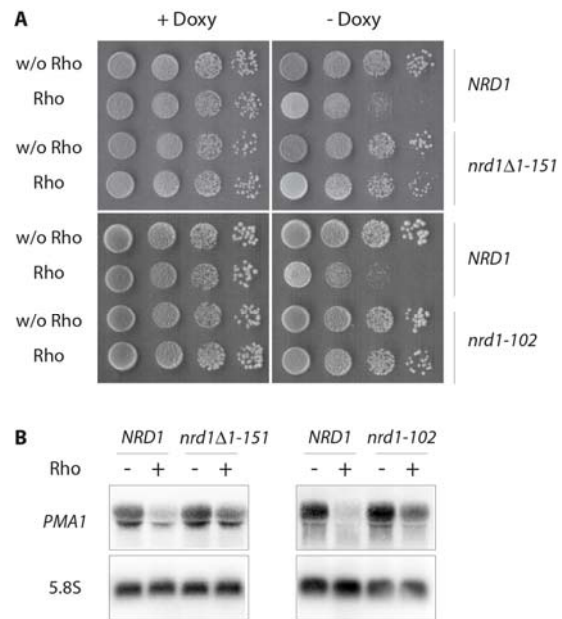


Figure 5: Nrd1 mutant strains with deletion of the CID or mutation in the RRM are less sensitive to Rho. **(A)** The two Nrd1 mutant alleles, *nrd1Δ1-151* (YNH026) and *nrd1-102* (DLY1146), and the corresponding wild-type isogenic strains (NH001 and DLY1144, respectively) were transformed with the empty vector (pCM185) or the plasmid expressing Rho (pCM185-Rho). Cell cultures were spotted for growth tests as described in Figure 1A. **(B)** Northern blot analyses were performed as in Figure 1B.

These properties led us to suspect Nrd1 as the possible factor that mediates the targeting and degradation of Rho-induced aberrant transcripts upon its recruitment to the transcription complex. As a first step to examine this prediction, we tested the sensitivity to Rho expression of a yeast strain harboring a CID deletion allele of *NRD1* (*nrd1Δ1-151*). Previously, the Nrd1ΔCID protein was reported to have low affinity for binding RNAP II in cell extracts and its recruitment to two mRNA genes (including *PMA1*) was shown by ChIP experiments to be significantly reduced (Vasiljeva et al., 2008). The *nrd1Δ1-151* strain was transformed with the Rho expression plasmid and the growth was monitored in parallel with an isogenic wild-type strain as a control. The transformant spotted on agar plates recovered a full capacity to grow under Rho inducing conditions (Figure 5A). In agreement with the growth results, the level of PMA1 mRNA in the presence of Rho was restored to more than 80% of the normal level (Figure 5B), indicating that Nrd1 recruitment to the transcription complex is required for the targeting and degradation of aberrant transcripts generated by Rho action. This assertion was further verified by analyzing the sensitivity to Rho expression of the strain *nrd1-102* which has a single-point mutation in the RNA Recognition Motif (RRM) leading to a deficiency in snRNA termination as a result of a

Résultats

reduced RNA binding activity (Conrad et al., 2000). Consistently, the Rho-induced growth defect was readily suppressed by the *nrd1-102* mutation with the accompanying rescue of the PMA1 steady-state mRNA level (Figure 5). These results suggest that both CTD and RNA binding activities of Nrd1 are required to mediate the targeting and degradation of Rho-induced aberrant transcripts.

To test further the involvement of the Nrd1 complex in the targeting and degradation of Rho-induced aberrant transcripts, we examined the effect of alterations in two important partners (Nab3 and CTD) that contribute to Nrd1 recruitment. Nab3 forms a heterodimer with Nrd1 and binds to a specific RNA motif via its RRM domain (Carroll et al., 2007). The effect of Rho expression was tested in the *nab3-11* allele which has two point-mutations within the RRM region (Conrad et al., 2000). As shown in Figure 6, a slight but significant relief of Rho-induced growth defect as well as a corresponding rescue of PMA1 mRNA was observed for the cells harboring the *nab3-11* allele as compared to the isogenic wild-type strain. The growth defect suppression and rescue of PMA1 mRNA were even more pronounced in a yeast strain in which the CTD of RNAP II was truncated from 26 (wild-type) to 11 heptapeptide repeats (Figure 6), emphasizing the importance of the CTD as a platform for Nrd1 recruitment. Altogether, these results indicate that alterations in the different factors known to contribute to the co-transcriptional recruitment of Nrd1 counteract the targeting and degradation of Rho-induced aberrant transcripts, implying that the nuclear mRNA surveillance mechanism relies on efficient association of Nrd1 with the transcription machinery.

The Rho-induced defect is suppressed by overproduction of Nrd1 deletion mutants but not the full-length protein

If the mRNA surveillance mechanism relies on Nrd1 recruitment to the transcription machinery, then the overproduction of a mutant variant of the protein, that is functionally defective but still able to be recruited, should exert a dominant-negative effect by outcompeting the functional Nrd1 leading to a suppression of the Rho-induced defect. To test this hypothesis, we constructed a set of deletion mutants of Nrd1 based on the known domain organization (Figure 7A and Conrad et al., 2000). The constructs made within a high copy number 2 μ plasmid were transformed into yeast cells harboring the Rho expression system. As shown in Figure 7B, the overproduction of a protein fragment containing the 151 N-terminal amino acids of Nrd1 corresponding to its CID domain (construct 1-151) was unable to suppress the Rho-induced defect, indicating that additional contacts are probably needed for efficient competitive recruitment by the CTD. The Rho-induced defect was partially relieved with a longer

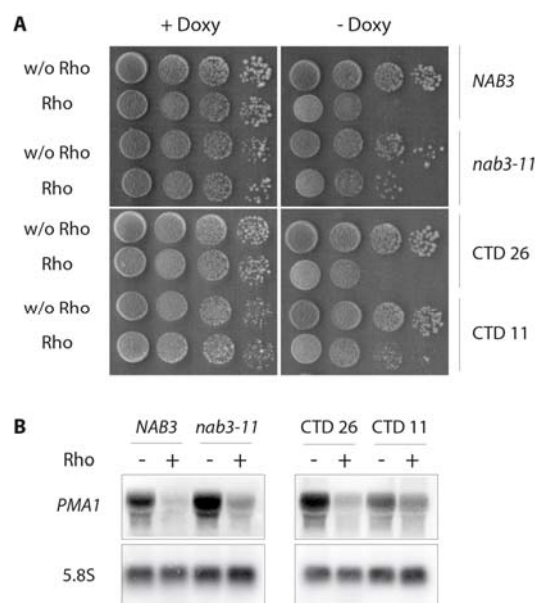


Figure 6: Cells with a defective Nab3 protein or a truncated CTD become less sensitive to Rho expression. (A) The *nab3-11* mutant (YPN102), the CTD 11 mutant (*rpo21- Δ 104*) which lays eleven repetitions of the heptapeptide and the corresponding W303 wild type isogenic strains (NAB3 and CTD 26, respectively) were transformed with the empty vector (pCM185) or the plasmid expressing Rho (pCM185-Rho). Growth tests were carried out as described in Figure 1A. (B) Northern blot and hybridization were performed as in Figure 1B.

protein fragment that includes half of the Nab3 interacting region (construct 1-178). The protein fragment encompassing the CID, the Nab3 interacting domain and a small portion of the RRM (construct 1-369) was able to fully suppress the Rho-induced growth defect. A similar suppressing phenotype was observed with the deletion mutant containing the whole RRM region (construct 1-448). These results suggest that Nab3 association with the mutant Nrd1 increases its competing efficiency, whereas the presence of the RRM region appears to be dispensable for an efficient competition. Consistent with this, the Nrd1 variant lacking only the RRM region (construct Δ RRM) was able to compete with functional Nrd1 leading to robust suppression of the Rho-induced defect. Conversely, the overexpression of Nrd1 protein lacking the CID domain (Nrd1 Δ 1-151) failed to suppress the Rho-induced defect, reflecting the importance of CTD interactions for the competition process (results not shown). As expected, the overproduction of the full-length Nrd1 protein did not show any suppressing phenotype. Indeed, in this case, the competing plasmid-born protein is functionally competent to mediate the targeting and degradation of Rho-induced aberrant transcripts leading to the growth defect. Northern blot measurements of the steady-state abundance of PMA1 mRNA and PGK1 mRNA (Figure 7C) corroborated the growth results.

Résultats

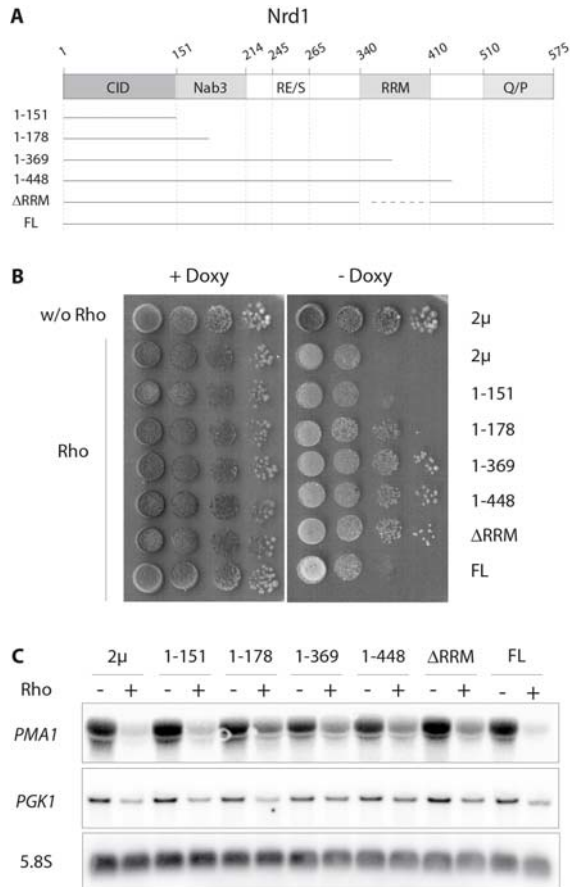


Figure 7: Rho-induced defect is alleviated by overexpression of truncated forms of Nrd1. (A) Schematic representation of the domain organization of Nrd1. This diagram indicates the CID, the Nab3 interaction domain, the arginine-glutamine and arginine-serine rich region (RE/RS), the RNA Recognition Motif (RRM) and the proline- and glutamine-rich region (P/Q), respectively. The numbers correspond to the amino acid sequence of Nrd1 and the horizontal lines represent the protein regions which were expressed from the 2μ vector. (B) The control strains were done as in Figure 2. The other strains were co-transformed with the Rho-expression vector (pCM185-Rho) and one of the 2μ plasmids overexpressing the full-length Nrd1 (FL) or a truncated variant as indicated in A. Growth tests were carried out as described in Figure 1A. (C) Northern blot analyses were made as in Figure 1B.

We conclude that Nrd1 recruitment to the transcription machinery coordinates the recognition and removal of the Rho-induced aberrant transcripts, probably by promoting the tethering of the exosome-mediated degradation apparatus (see below).

Rho expression stimulates the co-transcriptional recruitment of Nrd1 and Rrp6

Previous chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments have shown Nrd1 cross-linking across the *PMA1* gene with a slight enrichment towards the 5' and 3' regions of the locus (Nedeia et al., 2003; Vasiljeva et al., 2008; Rondon et al., 2009).

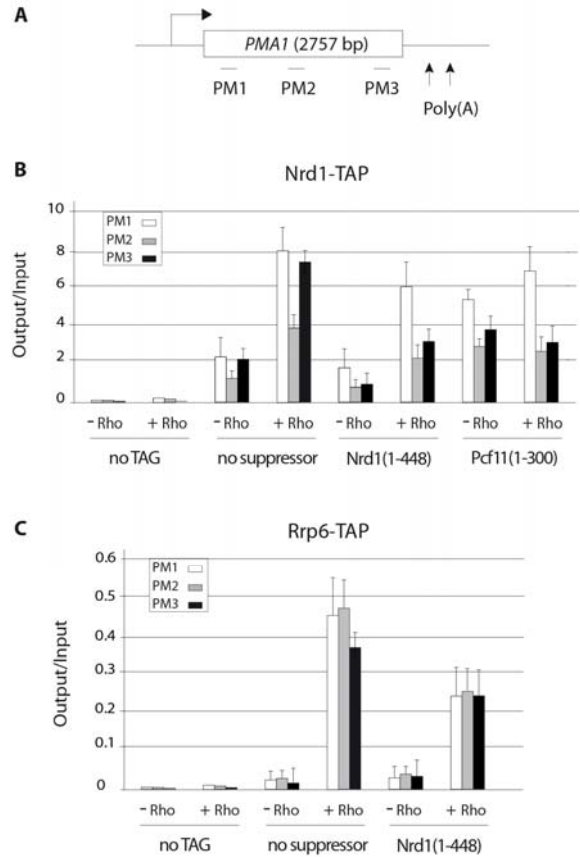


Figure 8: Rho action stimulates Nrd1 and Rrp6 recruitment across the *PMA1* gene. (A) Schematic representation of the *PMA1* gene with the horizontal bars denoting the positions of the PCR products used in the ChIP analyses. (B) Quantifications of the fold enrichment for *PMA1* DNA in Nrd1-TAP immunoprecipitates from cells expressing Rho (+Rho) or not (- Rho) and co-transformed with either the pAG425GPD vector for the assays without suppressor or the plasmids over-expressing the suppressors Nrd1 (1-448) or Pcf11 (1-300). Immunoprecipitated samples (output) were normalized to input. The average of three independent experiments is shown with error bars representing standard deviations. (C) Quantifications of the fold enrichment for *PMA1* DNA in Rrp6-TAP immunoprecipitates carried out as in B.

We wanted to see whether Rho action would lead to an increase of Nrd1 recruitment or a change in its cross-linking profile. We therefore analyzed the distribution of TAP-tagged Nrd1 along the *PMA1* gene under Rho inducing or repressing conditions and in the absence or presence of competing suppressors. The Nrd1 occupancy was assessed by quantitative PCR (qPCR) using three primer-pairs that cover the 5', the middle, and the 3' regions of the gene (Figure 8A). As shown in Figure 8B, the ChIP signals in the absence of Rho are consistent with previous reports (Nedeia et al., 2003; Vasiljeva et al., 2008; Rondon et al., 2009) with occupancy slightly higher in the 5' and 3' regions as compared to the body of the gene. Remarkably, the expression of Rho leads to a four

fold increase of Nrd1 recruitment across the entire locus with a similar enrichment towards both ends. Moreover, this Rho-induced stimulation of Nrd1 recruitment to the *PMA1* gene is attenuated significantly by overexpression of competing-suppressors such as the Nrd1 (1-448) or Pcf11 (1-300) protein fragments (Figure 8B), reflecting the competition for interaction with the transcription complex. ChIP experiments conducted in parallel revealed that Rho expression induces a 15% decrease of RNAP II cross-linking along the *PMA1* locus (results not shown). This is presumably due to a low level of premature Rho-dependent termination which is consistent with the fraction of full length transcripts that is not rescued upon inactivation of the RNA degradation machinery (*rrp6Δ* in Figure 1). A similar trend was observed when Nrd1 recruitment across the *PGK1* gene was monitored (supplemental Figure S1). Again, these results provide a strong support for the involvement of Nrd1 in the targeting of Rho-induced aberrant transcripts through its association with the transcription machinery.

We next asked whether the anchoring of Nrd1 to the transcription machinery promotes the association of the exosome-mediated degradation apparatus. We therefore performed ChIP experiments with a strain harboring TAP-tagged nuclear-specific exosome component Rrp6. As shown in Figure 8C, a large increase of ChIP signals across the *PMA1* locus is observed under Rho inducing conditions and this stimulation of Rrp6 recruitment is also readily reversed by overexpression of a competing-suppressor such as Nrd1 (1-448) protein fragment. Clearly, these results highlight a direct link between Nrd1 and Rrp6 recruitments to the transcription machinery upon Rho action. Interestingly, additional experiments using TAP-tagged core exosomal components Rrp4 and Rrp41 did not show any significant ChIP signals (results not shown), suggesting either a loose interaction between the anchored Rrp6 and the exosome or the possibility that Rrp6 may act independently from core exosome to target and degrade aberrant transcripts (see discussion).

DISCUSSION

Eukaryotic cells have evolved an mRNP quality control system by which aberrant transcripts with processing and assembly defects are recognized as export-incompetent triggering their degradation by the nuclear exosome. Previous studies have suggested the interconnection of this surveillance process with transcription elongation and mRNP biogenesis. However, the molecular mechanisms by which a surveillance apparatus recognizes aberrancies at each step of mRNP formation and targets the defective molecules for destruction remained unknown. To address this question, we took advantage of a new

assay in which the heterologous expression of a bacterial RNA-dependent helicase/translocase (transcription termination factor Rho) in yeast induces the production of full-length yet aberrant transcripts that are targeted and degraded by the nuclear exosome, causing a growth defect phenotype (Mosrin-Huaman et al., 2009). *In vitro*, Rho functions as a powerful molecular motor that tracks along the RNA chain and can melt nucleic acid base pairs or disrupt RNA-protein complexes present on its path (Walmacq et al., 2006; Schwartz et al., 2007; Schwartz et al., 2009). We have postulated that Rho loading and subsequent translocation along nascent transcripts in yeast cells could antagonize the normal deposition of processing and packaging factors, yielding stripped mRNPs that are recognized as defective. This assumption was supported by the identification of several mRNP processing and packaging factors in a screen for dosage-suppressors of the Rho-induced defect, suggesting that an overload of these RNA-interacting proteins can counteract the denuding effect of the bacterial helicase or neutralize the detection of the aberrant transcripts by the surveillance mechanisms. Among the dosage-suppressors found in the screen, Pcf11 is an essential factor for transcription termination of poly(A)-containing RNAs which is known to interact with the nascent transcript upon co-transcriptional recruitment by the CTD of RNAP II (Amrani et al., 1997; Barilla et al., 2001; Licatalosi et al., 2002; Sadowski et al., 2003; Zhang et al., 2005). These functional features incited us to use the Pcf11 suppressing ability as a starting point to investigate the mechanisms by which Rho-induced aberrant transcripts are recognized and targeted for destruction.

A systematic deletion analysis of Pcf11 indicates that the rescue of Rho-induced aberrant transcripts and the accompanying relief of growth defect by overproduction of the protein stems from a physical interaction of its CID domain with the transcription complex. The interaction requires both CTD and RNA contacts and is more efficient with isolated CID fragment than the full-length protein. Similar rescue of Rho-induced aberrant transcripts and relief of growth defect were obtained when endogenous Nrd1, the other CID-containing protein involved in transcription termination of small non-coding RNAs, was altered in its CTD and RNA binding determinants by deletion of its CID or mutations within its RRM. Thus, overproduced Pcf11 or its CID-containing fragments exert their suppressing effect by outcompeting Nrd1 for recruitment by the transcription complex. Consistent with this conclusion, a similar competition-mediated suppression of Rho-induced defect is achieved by overproduction of functionally-deficient CID-containing Nrd1 fragments. Together, these results show clearly that the recognition and targeting for destruction of Rho-induced aberrant transcripts is

Résultats

mediated by Nrd1 association with the transcription complex, a fact that was substantiated further with the direct evaluation of Nrd1 occupancy by ChIP experiments. Indeed, Nrd1 recruitment across two representative genes, *PMA1* and *PGK1* (Figure 8 and supplemental Figure S1), is shown to increase dramatically in the presence of Rho expression and this trend is alleviated by overproduction of competing suppressors.

What makes the transcription complex so attractive for Nrd1 association in the presence of Rho helicase/translocase activity? Co-transcriptional recruitment of Nrd1 was shown to be predominant at promoter-proximal regions matching the high level of CTD Ser5 phosphorylation. This was taken to explain the preferential involvement of Nrd1 complex in termination of short transcripts such as non-coding RNAs and CUTs (Gudipati et al., 2008; Vasiljeva et al., 2008). However, as detected with our ChIP experiments in the absence of Rho, recent data indicate that a basal level of Nrd1 association with transcribing RNAP II persists throughout elongation, apparently due to the persistence of a certain level of phosphorylated Ser5 residues (Kim et al., 2009; Rondon et al., 2009). Moreover, this basal level of Nrd1 recruitment was shown to increase substantially and provoke termination at a site located more than 1.5 kb from a promoter when poly(A)-dependent termination is impaired (Rondon et al., 2009). These results along with others suggest that the choice between the two termination modes is governed by a continuous competition between the two termination machineries for recruitment by the transcription complex, with the CID-containing proteins Nrd1 and Pcf11 being the prominent components of the two machineries (Gudipati et al., 2008; Vasiljeva et al., 2008).

We propose that a similar competition process, but in a biased way, is taking place for the recognition and targeting of Rho-induced aberrant transcripts. In effect, stripping of nascent transcripts from processing and packaging factors by Rho action should uncover specific RNA-binding sites promoting preferential recruitment of Nrd1 (supplemental Figure S2). For instance, this is well illustrated by our results with the CID-defective *pcf11-13* strain in which the Rho-induced defect is aggravated, reflecting the unbalance in the competition for recruitment between mutant Pcf11-13 and Nrd1. Conversely, the competition is counterbalanced at the expense of Nrd1 in the case of Pcf11 overproduction. In this biased competition model, Nrd1 might be weakly anchored to the transcription complex through interaction of its CID with the CTD, then the interaction is further stabilized by binding to specific RNA segments uncovered by Rho action. In this regard, our results suggest that Nab3 association with Nrd1 plays a key role in the stabilization process. First, a rescue of Rho-induced aberrant transcripts with accompanying relief of growth defect is

observed in a strain with a defect in Nab3 RNA-binding domain (*nab3-11*). Second, the dominant-negative effect induced by overexpression of Nrd1 deletion mutants is more robust when the protein fragments include the Nab3 interacting domain in addition to the CID. We note also that the transcripts derived from the two representative genes studied in this work (*PMA1* and *PGK1*) contain much more Nab3 (UCUU) than Nrd1 (GUAA/G) binding sites (27 and 15 compared to 2 and 5, respectively) which should expend the opportunity for RNA stabilizing interactions and thus the recognition of a wide range of aberrant transcripts. These considerations are consistent with previous reports in which the formation of Nrd1-Nab3 heterodimer was shown to be the primary specificity determinant for transcription termination of small non-coding RNAs and CUTs. For instance, a CUT terminator containing only Nab3 binding sites functions efficiently in wild-type cells but does not function in the *nab3-11* mutant strain, indicating that the Nab3 interaction with the transcript is sufficient to stabilize the recruitment of the heterodimer (Arigo et al., 2006; Carroll et al., 2007).

Previous co-immunoprecipitation studies have detected physical interactions between the exosome-TRAMP complex and Nrd1 (Vasiljeva and Buratowski, 2006). This was taken to suggest that co-transcriptional recruitment of Nrd1 could help to tether the exosome-dependent degradation machinery to the transcription complex. Our ChIP results provide direct evidence for such suggestion by showing a correlation between the Rho-induced large increase of Nrd1 recruitment and the enrichment of nuclear-specific exosome component Rrp6 across the *PMA1* gene. A general belief for nuclear mRNA surveillance is that Rrp6 exoribonuclease activity acts in concert with the core exosome through physical interactions. However, our ChIP experiments using tagged Rrp4 and Rrp41 did not reveal any association of these core exosomal subunits with the tethered surveillance machinery. This could be due to the fact that the core exosome does not have close contacts with RNA and DNA within the transcription complex and thus is less efficiently cross-linked to chromatin. A second possibility could be that the interactions of the core exosome with Nrd1 and Rrp6 are rather weak, which may explain the fact that in the Nrd1 co-immunoprecipitates, the core exosome components were significantly underrepresented as compared to Nab3, Rrp6 or the TRAMP component Air2 (Vasiljeva and Buratowski, 2006). A third possibility, which we favor, could be that co-transcriptional recruitment and RNA binding of Nrd1 followed by Rrp6 tethering constitutes the first step at which a defect is detected and the transcript is labeled as aberrant. Subsequently, the labeled transcript would be prevented from export then directed for destruction by facilitating a close coupling of Rrp6 with the core exosomal scaffold (supplemental Figure S2). This

Résultats

second step is probably achieved upon transcription completion since exoribonuclease degradation by the exosome-Rrp6 complex will require exposed RNA 3' end. However, an alternative scenario of this last model could be that Rrp6 exoribonuclease activity acts independently from core exosome to degrade aberrant transcripts. This scenario is supported by recent findings in which Rrp6 was found to carry out some of its exoribonuclease functions without physical association with the core exosome and to be stimulated by the TRAMP complex (Callahan and Butler, 2008, 2010). Whatever the precise mechanism, this Nrd1-Rrp6-tagging model could explain how a general quality control system recognizes various aberrancies arising at different steps of mRNP biogenesis such as splicing, termination and 3' end formation or assembly and export then directs the defective molecules to the same outcome, destruction.

REFERENCES

- Aguilera, A. (2005). Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol* 17, 242-250.
- Ahn, S.H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* 13, 67-76.
- Amrani, N., Minet, M., Wyers, F., Dufour, M.E., Aggerbeck, L.P., and Lacroute, F. (1997). PCF11 encodes a third protein component of yeast cleavage and polyadenylation factor I. *Mol Cell Biol* 17, 1102-1109.
- Andrulis, E.D., Werner, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Lis, J.T. (2002). The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in *Drosophila*. *Nature* 420, 837-841.
- Arigo, J.T., Eyler, D.E., Carroll, K.L., and Corden, J.L. (2006). Termination of cryptic unstable transcripts is directed by yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nab3. *Mol Cell* 23, 841-851.
- Barilla, D., Lee, B.A., and Proudfoot, N.J. (2001). Cleavage/polyadenylation factor IA associates with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 445-450.
- Buratowski, S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr Opin Cell Biol* 17, 257-261.
- Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 36, 541-546.
- Callahan, K.P., and Butler, J.S. (2008). Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6. *Nucleic Acids Res* 36, 6645-6655.
- Callahan, K.P., and Butler, J.S. (2010). TRAMP complex enhances RNA degradation by the nuclear exosome component Rrp6. *J Biol Chem* 285, 3540-3547.
- Carroll, K.L., Ghirlando, R., Ames, J.M., and Corden, J.L. (2007). Interaction of yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nab3 with RNA polymerase II terminator elements. *RNA* 13, 361-373.
- Conrad, N.K., Wilson, S.M., Steinmetz, E.J., Patturajan, M., Brow, D.A., Swanson, M.S., and Corden, J.L. (2000). A yeast heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex associated with RNA polymerase II. *Genetics* 154, 557-571.
- Doma, M.K., and Parker, R. (2007). RNA quality control in eukaryotes. *Cell* 131, 660-668.
- Egloff, S., and Murphy, S. (2008). Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* 24, 280-288.
- Fasken, M.B., and Corbett, A.H. (2005). Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 12, 482-488.
- Gudipati, R.K., Villa, T., Boulay, J., and Libri, D. (2008). Phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain dictates transcription termination choice. *Nat Struct Mol Biol* 15, 786-794.
- Hessle, V., Bjork, P., Sokolowski, M., de Valdivia, E.G., Silverstein, R., Artemenko, K., Tyagi, A., Maddalo, G., Ilag, L., Helbig, R., *et al.* (2009). The exosome associates cotranscriptionally with the nascent pre-mRNP through interactions with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Mol Biol Cell* 20, 3459-3470.
- Hieronymus, H., Yu, M.C., and Silver, P.A. (2004). Genome-wide mRNA surveillance is coupled to mRNA export. *Genes Dev* 18, 2652-2662.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T.H. (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413, 538-542.
- Kim, M., Suh, H., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2009). Phosphorylation of the yeast Rpb1 C-terminal domain at serines 2, 5, and 7. *J Biol Chem* 284, 26421-26426.
- Kim, M., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Zhelkovsky, A., Moore, C., and Buratowski, S. (2006). Distinct pathways for snoRNA and mRNA termination. *Mol Cell* 24, 723-734.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14, 2452-2460.
- Kuras, L., and Struhl, K. (1999). Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* 399, 609-613.
- Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M., and Jensen, T.H. (2002). Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol Cell Biol* 22, 8254-8266.
- Licalosi, D.D., Geiger, G., Minet, M., Schroeder, S., Cilli, K., McNeil, J.B., and Bentley, D.L. (2002). Functional interaction of yeast pre-mRNA 3' end processing factors with RNA polymerase II. *Mol Cell* 9, 1101-1111.
- Luna, R., Gaillard, H., Gonzalez-Aguilera, C., and Aguilera, A. (2008). Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma* 117, 319-331.
- Luna, R., Jimeno, S., Marin, M., Huertas, P., Garcia-Rubio, M., and Aguilera, A. (2005). Interdependence between transcription and mRNP processing and export, and its impact on genetic stability. *Mol Cell* 18, 711-722.
- Milligan, L., Torchet, C., Allmang, C., Shipman, T., and Tollervey, D. (2005). A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation. *Mol Cell Biol* 25, 9996-10004.
- Mosrin-Huaman, C., Honorine, R., and Rahmouni, A.R. (2009). Expression of bacterial Rho factor in yeast identifies new factors

Résultats

- involved in the functional interplay between transcription and mRNP biogenesis. *Mol Cell Biol* 29, 4033-4044.
- Nedeá, E., He, X., Kim, M., Pootoolal, J., Zhong, G., Canadien, V., Hughes, T., Buratowski, S., Moore, C.L., and Greenblatt, J. (2003). Organization and function of APT, a subcomplex of the yeast cleavage and polyadenylation factor involved in the formation of mRNA and small nucleolar RNA 3'-ends. *J Biol Chem* 278, 33000-33010.
- Perales, R., and Bentley, D. (2009). "Cotranscriptionality": the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Mol Cell* 36, 178-191.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.
- Proudfoot, N. (2004). New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16, 272-278.
- Richard, P., and Manley, J.L. (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev* 23, 1247-1269.
- Rondon, A.G., Mischo, H.E., Kawauchi, J., and Proudfoot, N.J. (2009). Fail-Safe Transcriptional Termination for Protein-Coding Genes in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 36, 88-98.
- Rosonina, E., Kaneko, S., and Manley, J.L. (2006). Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev* 20, 1050-1056.
- Rougemaille, M., Gudipati, R.K., Olesen, J.R., Thomsen, R., Seraphin, B., Libri, D., and Jensen, T.H. (2007). Dissecting mechanisms of nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 complex mutants. *EMBO J* 26, 2317-2326.
- Sadowski, M., Dichtl, B., Hubner, W., and Keller, W. (2003). Independent functions of yeast Pcf11p in pre-mRNA 3' end processing and in transcription termination. *EMBO J* 22, 2167-2177.
- Saguez, C., Olesen, J.R., and Jensen, T.H. (2005). Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr Opin Cell Biol* 17, 287-293.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumpower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18, 3091-3092.
- Schwartz, A., Margeat, E., Rahmouni, A.R., and Boudvillain, M. (2007). Transcription termination factor rho can displace streptavidin from biotinylated RNA. *J Biol Chem* 282, 31469-31476.
- Schwartz, A., Rabhi, M., Jacquinet, F., Margeat, E., Rahmouni, A.R., and Boudvillain, M. (2009). A stepwise 2'-hydroxyl activation mechanism for the bacterial transcription termination factor Rho helicase. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1309-1316.
- Steinmetz, E.J., and Brow, D.A. (1998). Control of pre-mRNA accumulation by the essential yeast protein Nrd1 requires high-affinity transcript binding and a domain implicated in RNA polymerase II association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6699-6704.
- Steinmetz, E.J., Conrad, N.K., Brow, D.A., and Corden, J.L. (2001). RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* 413, 327-331.
- Thiebaut, M., Kisseleva-Romanova, E., Rougemaille, M., Boulay, J., and Libri, D. (2006). Transcription termination and nuclear degradation of cryptic unstable transcripts: a role for the nrd1-nab3 pathway in genome surveillance. *Mol Cell* 23, 853-864.
- Torchet, C., Bousquet-Antonelli, C., Milligan, L., Thompson, E., Kufel, J., and Tollervey, D. (2002). Processing of 3'-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Mol Cell* 9, 1285-1296.
- Vasiljeva, L., and Buratowski, S. (2006). Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Mol Cell* 21, 239-248.
- Vasiljeva, L., Kim, M., Mutschler, H., Buratowski, S., and Meinhart, A. (2008). The Nrd1-Nab3-Sen1 termination complex interacts with the Ser5-phosphorylated RNA polymerase II C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 15, 795-804.
- Villa, T., Rougemaille, M., and Libri, D. (2008). Nuclear quality control of RNA polymerase II ribonucleoproteins in yeast: Tilting the balance to shape the transcriptome. *Biochim Biophys Acta* 1779, 524-531.
- Walmacq, C., Rahmouni, A.R., and Boudvillain, M. (2006). Testing the steric exclusion model for hexameric helicases: substrate features that alter RNA-DNA unwinding by the transcription termination factor Rho. *Biochemistry* 45, 5885-5895.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.C., Dufour, M.E., Boulay, J., Regnault, B., Devaux, F., Namane, A., Seraphin, B., et al. (2005). Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* 121, 725-737.
- Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.C., and Stutz, F. (2002). Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol* 22, 8241-8253.
- Zhang, Z., Fu, J., and Gilmour, D.S. (2005). CTD-dependent dismantling of the RNA polymerase II elongation complex by the pre-mRNA 3'-end processing factor, Pcf11. *Genes Dev* 19, 1572-1580.

Résultats

Table S1 - *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study

Strain name	Genotype	Source
BMA41	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11 trp1Δ can1-100</i>	Baudin et al, 1993
W303	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100</i>	Thomas and Rothstein, 1989
$\Delta rrp6$	as BMA41 with <i>rrp6Δ::KAN</i>	Mosrin-Huaman et al, 2009
DLY1144	as W303 with <i>nrd1Δ::KAN [pRS415-NRD1-HA, LEU2, CEN/ARS]</i>	D. Libri laboratory
DLY1146	as W303 with <i>nrd1Δ::KAN [pRS415-nrd1-102-HA, LEU2, CEN/ARS]</i>	D. Libri laboratory
NHY001	as W303 with <i>nrd1Δ::KAN [pAG415-NRD1, LEU2, CEN/ARS]</i>	This study
YNH026	as W303 with <i>nrd1Δ::KAN [pAG415-nrd1Δ1-151, LEU2, CEN/ARS]</i>	This study
YPN102	as W303 with <i>nab3-11</i>	P. Thuriaux laboratory
DLY913	as W303 with <i>pcf11Δ::TRP1 [pNOPL-PCF11, LEU2, CEN/ARS]</i>	D. Libri laboratory
DLY915	as W303 with <i>pcf11Δ::TRP1 [pNOPL-pcf11-13, LEU2, CEN/ARS]</i>	D. Libri laboratory
<i>rpo21-Δ104</i>	as W303 with <i>rpo21-Δ104</i>	P. Thuriaux laboratory
DLY1124	as W303 with <i>NRD1-TAP::HIS3</i>	D. Libri laboratory
DLY388	as W303 with <i>RRP41-TAP::KAN</i>	D. Libri laboratory

Table S2 - Plasmids used in this study

Plasmid name	Yeast sequences	Rho expression	Backbone vector	Source
pCM185	<i>CEN TRP1</i>			Euroscarf
pCM189	<i>CEN URA3</i>			Euroscarf
pCM185-Rho	<i>CEN TRP1</i>	<i>pTetO₂::Rho-NLS</i>	pCM185	Mosrin-Huaman et al, 2009
pCM189-Rho	<i>CEN URA3</i>	<i>pTetO₂::Rho-NLS</i>	pCM189	This study
pCM189-Rho-KE	<i>CEN URA3</i>	<i>pTetO₂::Rho-KE-NLS</i>	pCM189	This study
pRS415-NRD1-HA	<i>CEN LEU2 NRD1</i>		pRS415	D. Libri laboratory
pRS415-nrd1-102-HA	<i>CEN LEU2 nrd1-102</i>		pRS415	D. Libri laboratory
pNOPL ^a -PCF11	<i>CEN LEU2 PCF11</i>		pRS315-2XProtA-TEV	D. Libri laboratory
pNOPL ^a -pcf11-13	<i>CEN LEU2 pcf11-13</i>		pRS315-2XProtA-TEV	D. Libri laboratory
pAG425GPD-ccdB	<i>2μ LEU2</i>			Addgene
FL (<i>PCF11</i>)	<i>2μ LEU2 PCF11</i>			Mosrin-Huaman et al, 2009
1-426	<i>2μ LEU2 pcf11 1-426</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
1-300	<i>2μ LEU2 pcf11 1-300</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
1-145	<i>2μ LEU2 pcf11 1-145</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
1-125	<i>2μ LEU2 pcf11 1-125</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
Δ CID (<i>PCF11</i>)	<i>2μ LEU2 pcf11Δ1-126</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
M1	<i>2μ LEU2 pcf11 1-145 M1 (A66D)</i>		1-145	This study
M2	<i>2μ LEU2 pcf11 1-145 M2 (D68A, S69A)</i>		1-145	This study
M3	<i>2μ LEU2 pcf11 1-145 M3 (D68A, S69A, I70A)</i>		1-145	This study
FL (<i>NRD1</i>)	<i>2μ LEU2 NRD1</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
1-151	<i>2μ LEU2 nrd1 1-151</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
1-178	<i>2μ LEU2 nrd1 1-178</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
1-369	<i>2μ LEU2 nrd1 1-369</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
1-448	<i>2μ LEU2 nrd1 1-448</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
Δ RRM	<i>2μ LEU2 nrd1Δ340-410</i>		pAG425GPD-ccdB	This study
NRD1	<i>CEN LEU2 NRD1</i>		pAG415GPD-ccdB	This study
Δ CID (<i>NRD1</i>)	<i>CEN LEU2 nrd1Δ1-151</i>		pAG415GPD-ccdB	This study

^a (Senger et al, 1998)

Résultats

Table S3 – Primers used in this study for the construction of overexpression plasmids (full length, deleted, and mutated ORFs)

ORF	Plasmid name	Forward	Reverse	
<i>PCF11</i>	1-426	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGA TCA CGACACAGAAGTTATAGT 3'	5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCATTACTAC TTACCACACACGCTACATTTATTTG 3'	
	1-300		5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCATTACTAT TCAACGCCAGAAATATTACCAAAAAGAG 3'	
	1-145		5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCATTAGTTT TTCTGGTGGAGACGA 3'	
	1-125		5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCATTACTA GCCTTCAACAGAGG 3'	
	Δ CID (<i>PCF11</i>)		5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTC AGCACTGGAGAAAATTG 3'	5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCACTATTAT TTTGTGACCAATTTTC 3'
	M1		5'AAGCTATACGCTTTTATGACTTGGACTCCATTTGTAAG 3'	5'CTTACAATGGAGTCCAAGTCAATAAAAAGCGTATAGCTT3'
	M2		5'CGCTTTTTATGCCTTGGCCGCCATTGTAAGAATGTTGG 3'	5'CCAACATTCTTACAAATGGCCGCCAAGGCATAAAAAGCG 3'
	M3		5'CGCTTTTTATGCCTTGGCCGCCCTTGTAGAATGTTGG 3'	5'CCAACATTCTTACAAGCGCGGCCAAGGCATAAAAAGCG 3'
<i>NRD1</i>	NRD1	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATGCA GCAGGACGACGATTTTC 3'	5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTAGCAATAAA GGGTGGAGTAAAG 3'	
	Δ CID (<i>NRD1</i>)	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGA CATATCGAATAACACC 3'		
	1-151	As NRD1 plasmid	5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATTCAAGC AAAGCATTTTGACCTGATGGCG 3'	
	1-178		5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCATTAAAGA TTTGTTCGACCTCTGCTTGGG 3'	
	1-369		5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCATTAAATG ACGCTTTGTACTTCAGCAAAAAGG 3'	
	1-448		5'GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCATTAACCA GAAGTGCCACCCATTGCGC 3'	
Δ RRM	5'- GGTCCAAGAGATTGTTGTGACTATCAACACGGTTACAGTATT ATTCTATGCACAGGC 3'	5'GATAGTCACAACAATCTCTTGACCAACGGCTGTAGACTTTAAT AT ATCTGGTGG 3'		

Bold sequences correspond to the Gateway attB-attachment sites and the stop codons whenever necessary. Italics and underlined sequences represent the nucleotides linker and the modified codons respectively.

Résultats

Table S4 - Oligonucleotides and amplicons used in the Northern blot analyses

Targets	Amplicons, bp	Oligonucleotide sequence	
<i>PGK1</i>	NA	5' CCTTACCGAAGTACTTCAATTCC 3'	
18S	NA	5' GGTTAAGGTCTCGTT 3'	
5.8S	NA	5' TTTCGCTGCGTTCTTCATC 3'	
		Forward	Reverse
<i>PMA1</i>	631	5' GATGGTCGTATTGTCACTGAAGAC 3'	5' CAATAGCATCCAAACCCTTCTTC 3'

NA, not applicable

Table S5 – PMA1 and PGK1 primers used in the ChIP experiments

Alias	Name	Sequence
PM1	F-151	5' CAATCTAATCACGGTGTGACGACGAAGAC 3'
	R-390	5' GGCTTCCATAACGAATTGAATTGGACCGAC 3'
PM2	F-1010	5' GTTTGCCAGCTGTCGTTACCACCAC 3'
	R-1235	5' GCAGCCAAACAAGCAGTCAACATCAAG 3'
PM3	F-2251	5' AACCTACCAAGATTATGGGGTATGTC 3'
	R-2532	5' CCAACCGAATAAGGTAAACATGGTAGCGATG 3'
PK1	F-455	5' GGCTGATGTTTACATCAACGATGCCT 3'
	R-650	5' TCAGCAACCTTGGCACCACCTAAG 3'
PK2	F-751	5' ATCGGTGACTCCATCTTCGACAAGGC 3'
	R-927	5' CCAGCCAGCTGGAATACCTTCCTTGTC 3'
PK3	F-1053	5' GGCTTTGTTAGACGAAGTTGTCAAGAGC 3'
	R-1229	5' GCAACACCTGGCAATTCCTTACCTTCC 3'

Résultats

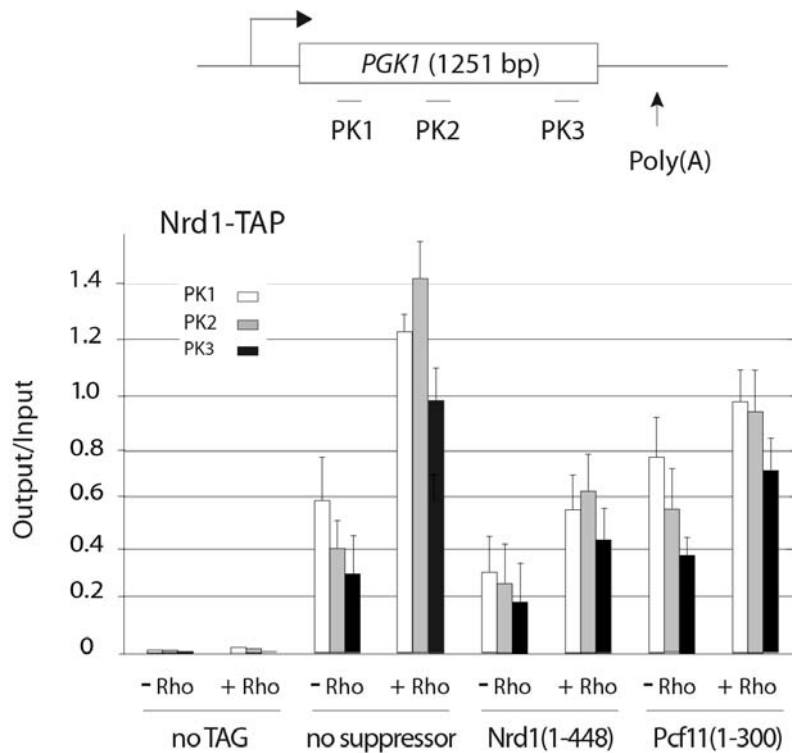


Figure S1: ChIP analyses of Nrd1 recruitment across the *PGK1* locus

(A) Schematic representation of the *PGK1* gene with the horizontal bars denoting the positions of the PCR products used in the ChIP analyses. (B) Quantifications of the fold enrichment for *PGK1* DNA in Nrd1-TAP immunoprecipitates from cells expressing Rho (+Rho) or not (- Rho) and co-transformed with either the pAG425GPD vector for the assays without suppressor or the plasmids over-expressing the suppressors Nrd1 (1-448) or Pcf11 (1-300). The « no TAG » control strain is W303 transformed with pAG425GPD and either the pCM185 (- Rho) or the pYCM22 (+Rho) plasmids. Immunoprecipitated samples (output) were normalized to input. The average of three independent experiments is shown with error bars representing standard deviations.

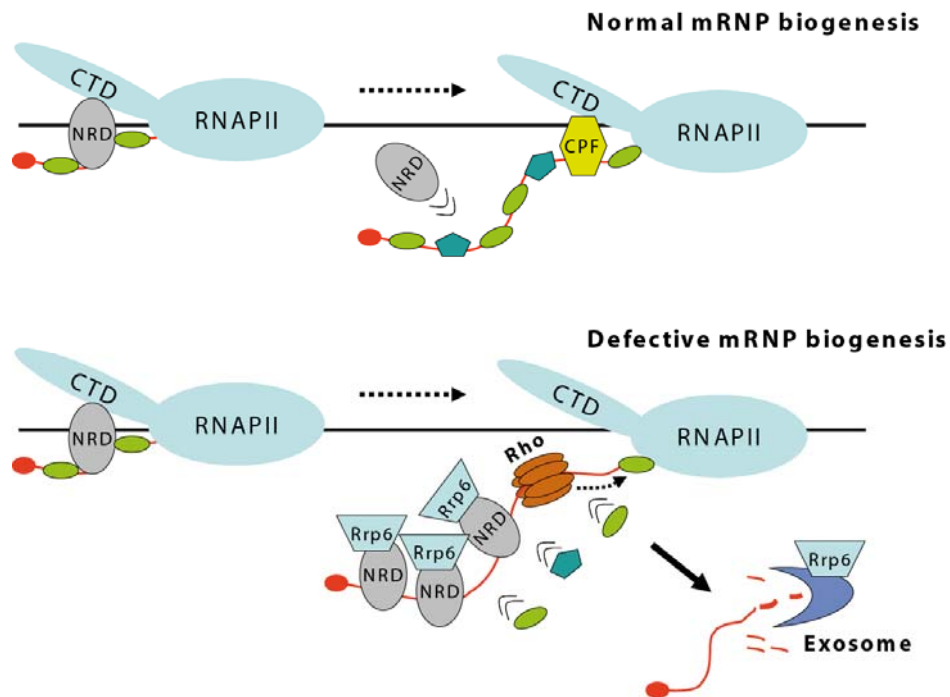


Figure S2: Model illustrating the Nrd1-mediated recognition and degradation of Rho-induced aberrant transcripts.

(A) Normal conditions of mRNP biogenesis. Nrd1 complex is recruited to the transcription complex at early elongation then is outcompeted by the deposition of mRNA processing and binding proteins as RNAP II travels further downstream. (B) Rho-induced defective mRNP biogenesis. Rho loading and tracking along nascent transcript displaces processing and binding proteins uncovering specific RNA-binding sites that promote preferential recruitment of Nrd1 complex and association of nuclear RNA degradation machinery represented by Rrp6. Upon transcription completion, the aberrant transcript would be degraded by the exoribonuclease activity of Rrp6 either alone or in association with the core exosome.

DISCUSSION

ET

PERSPECTIVES

V. Discussion et perspectives

A. Une approche originale pour identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la coordination des étapes de la biogénèse des mRNPs

Les travaux exposés dans cette thèse ont été entrepris afin d'appréhender les interconnexions entre la transcription, la biogénèse et les mécanismes de surveillance des mRNPs chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cette étude a été réalisée grâce à l'utilisation d'un perturbateur global de l'expression des gènes de levure : le facteur hétérologue Rho. Le facteur Rho est une hélicase/translocase qui se fixe sur des séquences nues du transcrit naissant et se transloque le long de la molécule d'ARN de façon ATP-dépendante. D'après un ensemble d'études *in vitro*, le facteur Rho apparaît comme un puissant moteur moléculaire capable de dissocier des protéines liées à une molécule d'ARN (Lang et al. 1998; Schwartz et al. 2007a). L'expression conditionnelle de la protéine Rho au sein du noyau de la levure induit un défaut de croissance dose-dépendant. Des analyses phénotypiques d'un mutant de Rho ont prouvé que la toxicité induite par l'expression de Rho chez la levure est liée à ses caractéristiques fonctionnelles. De plus, des analyses moléculaires *in vivo* indiquent que Rho interfère spécifiquement avec les transcrits ARNP II-dépendants. Il semblerait que l'expression de Rho exacerbe la sensibilité des ARNm par rapport aux ARNs non-codants. Il est probable que les différences structurales de ces deux classes d'ARN soient à l'origine de cette spécificité. En effet, en comparaison aux ARNm, les ARNs non-codants sont nettement plus stables du fait de leurs repliements en structure tertiaire complexe. Ces mêmes structures seraient alors susceptibles de constituer un obstacle à la translocation de Rho sur le transcrit.

La processivité de l'ARNP II constitue aussi un paramètre déterminant pour la toxicité induite par l'expression de Rho chez la levure. En effet, les préjudices liés à l'expression de Rho dépendent d'un couplage cinétique entre la vitesse d'élongation de l'ARNP II et la translocation de Rho le long du transcrit. Cette notion conforte les études de Lang et ses collaborateurs qui avaient démontré *in vitro* que Rho est capable de dissocier l'ARNP II uniquement lorsque l'enzyme est localisé au niveau des sites de pause (Lang et al. 1998).

D'après des études dynamiques *in vivo*, l'ARNP II effectue des pauses en cours de transcription (Darzacq et al. 2007). Ces pauses de l'ARNP II sont le siège du recrutement de diverses machineries protéiques impliquées dans la biogénèse des mRNPs (Glover-Cutter et al. 2008). Les facteurs constituant ces machineries interagissent avec l'ARN et le CTD de

Discussion et perspectives

l'ARNP II pour faciliter, entre autres : l'addition de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN naissant (Saunders et al. 2006) et la terminaison de la transcription à l'extrémité 3' du gène (Yonaha and Proudfoot 1999; Gromak et al. 2006). Les phénomènes de pause garantissent alors la stabilité du transcrit et coordonnent l'élongation de la transcription avec la maturation co-transcriptionnelle (Core and Lis 2008). Pourtant, vis-à-vis de Rho, ces phénomènes de pauses constituent une étape limitante de l'expression des gènes. En effet, ils peuvent constituer des fenêtres d'opportunités où Rho pourrait interférer avec la fixation des facteurs de la biogénèse des mRNPs.

D'après notre modèle, Rho entrerait en compétition avec des facteurs de maturation et d'empaquetage des mRNPs en se chargeant sur le transcrit et/ou en se transloquant le long de la molécule d'ARN. Ainsi, l'expression de Rho, engendrerait la production de mRNPs aberrants. Selon ce postulat, les transcrits aberrants, dépourvus de protéines cruciales, sont dégradés par l'exosome nucléaire. Cette hypothèse solide a été validée par la stabilisation des ARNm chez des mutants de l'exosome nucléaire (le mutant *rrp6Δ* et le double mutant *air1Δ air2Δ*). D'autre part, un crible génétique basé sur la recherche de supprimeurs multicopies du défaut de croissance Rho-dépendant a permis de détecter des facteurs impliqués dans la transcription, la biogénèse et l'export des mRNPs. Chacun des supprimeurs isolés génèrent la production de transcrits entiers et polyadénylés. Leurs actions communes seraient d'assister la formation de mRNPs compétents pour l'export. Le crible génétique utilisant Rho comme sonde de la biogénèse des mRNPs suggère que Rho est un outil pertinent pour rechercher de nouvelles protéines impliquées dans la biogénèse et l'export des mRNPs. Néanmoins, ce crible présente toutefois une limite. Il ne permet pas de détecter des ORFs qui s'avèrent toxiques pour la cellule lorsqu'elles sont surexprimées (Sopko et al. 2006).

De manière intéressante, notre crible a permis l'identification d'une protéine de fonction inconnue : Yil152w. Cette dernière présente une région d'homologie avec le CID de Pcf11 (Figure 19 page 81).

Discussion et perspectives

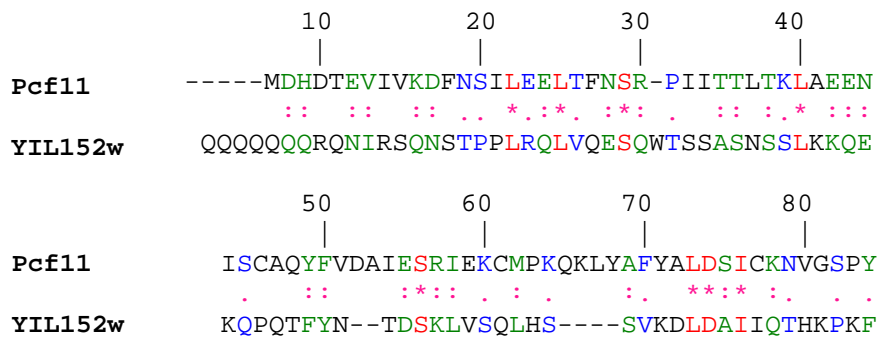


Figure 19 : Alignement des séquences protéiques du CID de *Pcf11* (1 à 78) et du CID putatif de *Yil152w* (82 à 159) avec *ClustalW*.

La surexpression du domaine d'homologie suffit à lever le défaut de croissance Rho-dépendant. D'après une étude génétique préliminaire, la co-délétion des gènes *YIL152W* et *CTK1* (code pour la kinase qui phosphoryle la Ser2 du CTD) conduit à un phénotype de létalité synthétique. L'interaction génétique du facteur Yil152w avec Ctk1 suggère son interconnexion avec le CTD. Cependant, la façon dont Yil152w reconnaît et s'associe au CTD de l'ARNP II reste à déterminer. Pour ce faire, nous testerons la capacité du facteur Yil152w à s'associer *in vitro* avec des peptides synthétiques mimant les différents états de phosphorylation du CTD de l'ARNP II (comme par exemple : le CTD non-phosphorylé ou phosphorylé en Ser5, en Ser2 et en Ser5/Ser2). Pour comprendre la fonction de la protéine Yil152w, différentes approches génétiques, biochimiques et moléculaires sont envisagées. Nous rechercherons tout d'abord les mutations synthétiques létales en combinaison à la délétion *yil152wΔ*. Nous ciblerons les mutations affectant l'état de phosphorylation de l'ARNP II (*kin28*, *bur1*, *fcp1*, *ssu72* et *rtr1*), la maturation en 3' du pré-ARNm (*pcf11*, *rna14* et *pap1*), la terminaison de la transcription (*rat1*), l'assemblage des mRNPs (*hpr1* et *glc7*) et les mécanismes de contrôle qualité (*rrp6* et *trf4*). Ensuite, nous réaliserons la purification et la caractérisation des partenaires protéiques de Yil152w par TAP-tag. Enfin, nous procéderons à l'étude du transcriptome d'une souche *yil152wΔ* afin de connaître les transcrits cibles de Yil152w.

B. Un modèle d'étude des mécanismes de reconnaissance et de dégradation des transcrits aberrants

Le crible utilisant Rho comme sonde de la biogénèse des mRNPs repose sur l'utilisation d'une banque de surexpression des ORFs de levure ayant une complexité de 24000 clones. Malgré les 40000 clones criblés manuellement, seul un candidat a été retrouvé deux fois. Ce résultat indique que le crible génétique n'est pas saturé. Conceptuellement, la surexpression d'autres facteurs serait susceptible de lever le défaut de croissance Rho-dépendant. Jusqu'alors, notre crible a permis de détecter deux facteurs du complexe CFIA : Pcf11 et Rna14. Par conséquent, nous avons vérifié si parmi les facteurs de maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNm d'autres protéines étaient capables de lever la toxicité Rho-dépendante par surexpression. Ainsi, nous avons isolé, en sus, trois suppresseurs : Pta1, Cft1 et Cft2. Ces facteurs, tout comme Pcf11 et Rna14, participent à la machinerie de maturation de l'extrémité 3' des pré-ARNm et s'associent au CTD de l'ARNP II. Suite à une étude fonctionnelle de la protéine Pcf11, nous avons montré que la surexpression de son CID est indispensable pour la suppression de la toxicité Rho-dépendante. Il apparaît donc clairement que la surexpression de facteurs de terminaison interagissant avec le CTD lève la toxicité induite par l'expression de Rho. Par ailleurs, la délétion du CID de Nrd1 restaure le défaut de croissance ainsi que la quantité de transcrit lorsque Rho est exprimé. Ces résultats suggèrent qu'un compétiteur du CID de Nrd1, tel que Pcf11, inhibe l'association de Nrd1 au CTD et empêche la reconnaissance des transcrits aberrants par l'exosome. Ces données soutiennent le modèle de compétition entre Nrd1 et Pcf11 vis-à-vis de leur fixation au CTD (Gudipati et al. 2008). Nos résultats confortent aussi le modèle de signalisation des transcrits aberrants à l'exosome nucléaire par le complexe Nrd1c (Vasiljeva and Buratowski 2006) car le recrutement de Nrd1 sur les séquences codantes des gènes *PMA1* et *PGK1*, augmente en fonction de l'expression de Rho. Ainsi, nous proposons un modèle de compétition entre Nrd1 et Pcf11 vis-à-vis de leur fixation au CTD afin de réguler la dégradation des transcrits aberrants. La fixation majoritaire du complexe Nrd1c permettrait d'activer les mécanismes de surveillance Rrp6-dépendants. Par ailleurs, le recrutement prépondérant du complexe CPF-CF faciliterait la terminaison de la transcription.

D'après le modèle de phosphorylation du CTD en Ser5/Ser2 au cours du cycle de transcription, la fixation des complexes Nrd1c et CPF-CF serait prépondérante aux extrémités 5' et 3' du transcrit, respectivement. Or, la compétition entre Pcf11 et Nrd1 implique une

Discussion et perspectives

interaction concomitante des complexes Nrd1c et CPF-CF avec le CTD. La fixation des complexes Nrd1c et CPF-CF ne se produirait donc pas exclusivement aux extrémités 5' et 3' du transcrit, respectivement. En faveur de cette hypothèse, Licatalosi et ses collaborateurs indique que le recrutement du CPF-CF a lieu dès la formation de l'extrémité 5' du transcrit (Licatalosi et al. 2002). De plus, il semblerait que la déphosphorylation des Ser5 du CTD soit un facteur limitant à la déstabilisation du complexe Nrd1c au CTD à l'extrémité 3' du transcrit (Rondon et al. 2009; Singh et al. 2009). Notons que tous les gènes analysés par ChIP n'indiquent pas une diminution de la phosphorylation en Ser5 du CTD au niveau de l'extrémité 3' des gènes (Boehm et al. 2003). Aussi, on peut émettre quelques réserves quant au modèle de phosphorylation du CTD en cours de transcription. En effet, ce dernier est essentiellement basé sur l'attribution des degrés de phosphorylation du CTD en Ser5/Ser2 par ChIP. Cependant, cette méthodologie qui utilise des anticorps spécifiques des diverses phosphorylations du CTD, présente quelques biais. Les signaux de ChIP peuvent être restreints si des protéines se fixant au CTD occultent stériquement les épitopes reconnus par les anticorps. De plus, certains anticorps peuvent induire des réactions croisées et par conséquent, réagir mieux que d'autres (Jones et al. 2004).

L'ensemble de nos analyses génétiques et moléculaires suggère que l'expression de Rho génère la formation de transcrits aberrants qui sont reconnus par le complexe Nrd1c pour être dégradés par l'exosome nucléaire. Cependant, tous les transcrits ne sont pas dégradés par des exonucléases. Certains, dépourvus de protéines de structure, seraient reconnus spécifiquement par l'endonucléase Rnt1 qui interagit avec le complexe Nrd1c (Ursic et al. 2004; Vasiljeva and Buratowski 2006). La déplétion des facteurs de remodelage du transcrit et le recrutement accru de Nrd1 laisse envisager que les transcrits sensibles à Rho, susceptibles de générer une tétraboucle, seraient reconnus spécifiquement par Rnt1. En effet, des études préliminaires indiquent que l'expression de Rho chez la levure génère, au sein du transcrit *FBA1*, une coupure endonucléasique par Rnt1. Ces transcrits clivés par Rnt1, semblent relativement stables dans une souche sauvage. Ce phénomène n'est pas sans rappeler le mécanisme alternatif de terminaison Rnt1-dépendante lors d'un dysfonctionnement de la terminaison poly(A)-dépendante (Ghazal et al. 2009; Rondon et al. 2009). Aussi, la stabilité des transcrits, qui sont sensibles à Rho et clivés par Rnt1, suggère leurs terminaison canoniques au niveau de sites poly(A) cryptiques d'une part et la présence d'une coiffe à leurs extrémités 5' d'autre part. Cette première hypothèse sera vérifiée grâce à l'utilisation de mutants de la machinerie de terminaison canonique : *pap1-5*, *mal4-1* et *pcf11-13*. Ensuite

Discussion et perspectives

nous évaluerons la présence de coiffe après traitement des ARNs à l'exonucléase Xrn1. Enfin, l'interdépendance entre le recrutement de Nrd1 et la coupure par Rnt1 sera estimée grâce à l'utilisation d'un variant du gène *NRD1* (gène codant la protéine Nrd1 mutée, déficiente dans sa capacité à se fixer sur l'ARN).

Le mode d'interférence de Rho avec la biogénèse des mRNPs repose sur une accumulation de preuves génétiques et moléculaires tangibles. Mais malgré l'étendue des expériences réalisées, nous n'avons pu déterminer avec exactitude ce mécanisme d'interférence de Rho. Pour confirmer la fixation de Rho sur le transcrit, il serait intéressant de réaliser du RNA-ChIP en utilisant un anticorps spécifique de la protéine Rho. Nous pourrions également s'assurer que Rho est capable de dissocier des protéines fixées à l'ARN *in vivo*. Ceci en évaluant, lorsque Rho est exprimé, le recrutement de protéines connues pour être fixées de manière abondante sur le transcrit dans des conditions normales d'expression (Npl3, par exemple). Par la technique de FISH (fluorescent *in situ* hybridization), nous pourrions apprécier la rétention nucléaire des transcrits aberrants Rho-dépendants.

Le mécanisme de terminaison de la transcription étant évasif, quelques auteurs laissent imaginer que la terminaison ARNP II-dépendante puisse être assimilée à la terminaison Rho-dépendante (Buratowski 2005; Arigo et al. 2006b; Luo et al. 2006; Rosonina et al. 2006; Peters et al. 2009). Des études *in vitro* suggèrent que la dégradation 5'-3' du transcrit par Rat1 favorise la pause de l'ARNP II. Cependant, elle serait insuffisante pour induire la dissociation du TEC (Ujvari et al. 2002). Le relargage du transcrit nécessiterait donc une hélicase ARN-ADN, similaire à Rho. Notons que l'ARN hélicase Sen1, qui est impliquée dans la terminaison des sn/snoRNA, apparaît comme un bon candidat. Selon cette théorie, nous avons considéré la possibilité que Rho puisse induire une terminaison prématurée de la transcription ARNP II-dépendante. En ce sens, nous avons recherché la présence de transcrits tronqués sous l'influence de Rho par Northern blot et hybridation. Nous avons alors utilisé des sondes à l'extrémité 5' et 3' proximal de transcrits relativement abondants et représentatifs de la diversité du transcriptome. Afin de limiter la dégradation possible des transcrits tronqués nous avons effectué cette analyse dans des souches dépourvues des principales exonucléases 5'-3' (*xrn1Δ*) et 3'-5' (*rrp6Δ*). Cependant, aucun transcrit tronqué Rho-dépendant n'a été observé dans ces conditions. Seule la méthode de 3' Long-SAGE permettrait d'évaluer, sur l'ensemble

Discussion et perspectives

du transcriptome, la nature exacte de l'extrémité 3' des transcrits stabilisés chez un mutant *rrp6Δ* lorsque Rho est exprimé.

L'ensemble des informations présentées dans ce manuscrit contribue à éclaircir les interactions entre la biogénèse et le contrôle qualité des mRNPs. Elles montrent aussi que l'expression de Rho chez la levure constitue un bon modèle d'étude du devenir des transcrits aberrants. Ce système d'étude originale, offre des perspectives de recherche très intéressantes qui devraient permettre d'affiner notre compréhension des aspects dynamiques de régulation de l'expression des gènes.

REFERENCES

Références

A

- Abou Elela S, Ares M, Jr. (1998) Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *The EMBO journal* 17(13): 3738-3746.
- Abruzzi KC, Lacadie S, Rosbash M (2004) Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *The EMBO journal* 23(13): 2620-2631.
- Aguilera A (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Current opinion in cell biology* 17(3): 242-250.
- Aguilera A, Klein HL (1988) Genetic control of intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations. *Genetics* 119(4): 779-790.
- Ahn SH, Kim M, Buratowski S (2004) Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Molecular cell* 13(1): 67-76.
- Akhtar MS, Heidemann M, Tietjen JR, Zhang DW, Chapman RD et al. (2009) TFIIF kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Molecular cell* 34(3): 387-393.
- Allmang C, Petfalski E, Podtelejnikov A, Mann M, Tollervey D et al. (1999a) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes & development* 13(16): 2148-2158.
- Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, Mitchell P, Petfalski E et al. (1999b) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *The EMBO journal* 18(19): 5399-5410.
- Ansari A, Hampsey M (2005) A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes & development* 19(24): 2969-2978.
- Arigo JT, Eyler DE, Carroll KL, Corden JL (2006a) Termination of cryptic unstable transcripts is directed by yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nab3. *Molecular cell* 23(6): 841-851.
- Arigo JT, Carroll KL, Ames JM, Corden JL (2006b) Regulation of yeast NRD1 expression by premature transcription termination. *Molecular cell* 21(5): 641-651.

B

- Banerjee S, Chalissery J, Bandey I, Sen R (2006) Rho-dependent transcription termination: more questions than answers. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 44(1): 11-22.
- Barilla D, Lee BA, Proudfoot NJ (2001) Cleavage/polyadenylation factor IA associates with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(2): 445-450.
- Bear DG, Hicks PS, Escudero KW, Andrews CL, McSwiggen JA et al. (1988) Interactions of *Escherichia coli* transcription termination factor rho with RNA. II. Electron microscopy and nuclease protection experiments. *Journal of molecular biology* 199(4): 623-635.
- Bear DG, Andrews CL, Singer JD, Morgan WD, Grant RA et al. (1985) *Escherichia coli* transcription termination factor rho has a two-domain structure in its activated form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(7): 1911-1915.

Références

- Beckwith J (1963) Restoration of Operon Activity by Suppressors. *Biochimica et biophysica acta* 76: 162-164.
- Berretta J, Morillon A (2009) Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO reports* 10(9): 973-982.
- Boehm AK, Saunders A, Werner J, Lis JT (2003) Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock. *Molecular and cellular biology* 23(21): 7628-7637.
- Bousquet-Antonelli C, Presutti C, Tollervey D (2000) Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102(6): 765-775.
- Brown CE, Sachs AB (1998) Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Molecular and cellular biology* 18(11): 6548-6559.
- Bucheli ME, Buratowski S (2005) Npl3 is an antagonist of mRNA 3' end formation by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 24(12): 2150-2160.
- Buratowski S (2005) Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Current opinion in cell biology* 17(3): 257-261.
- Burckin T, Nagel R, Mandel-Gutfreund Y, Shiue L, Clark TA et al. (2005) Exploring functional relationships between components of the gene expression machinery. *Nature structural & molecular biology* 12(2): 175-182.
- Burkard KT, Butler JS (2000) A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Molecular and cellular biology* 20(2): 604-616.
- Burns CM, Richardson LV, Richardson JP (1998) Combinatorial effects of NusA and NusG on transcription elongation and Rho-dependent termination in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 278(2): 307-316.

C

- Cabal GG, Genovesio A, Rodriguez-Navarro S, Zimmer C, Gadal O et al. (2006) SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* 441(7094): 770-773.
- Calvo O, Manley JL (2003) Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes & development* 17(11): 1321-1327.
- Cardinale CJ, Washburn RS, Tadigotla VR, Brown LM, Gottesman ME et al. (2008) Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science (New York, NY)* 320(5878): 935-938.
- Carpousis AJ (2007) The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annual review of microbiology* 61: 71-87.
- Carroll KL, Ghirlando R, Ames JM, Corden JL (2007) Interaction of yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nab3 with RNA polymerase II terminator elements. *RNA (New York, NY)* 13(3): 361-373.

Références

- Carroll KL, Pradhan DA, Granek JA, Clarke ND, Corden JL (2004) Identification of cis elements directing termination of yeast nonpolyadenylated snoRNA transcripts. *Molecular and cellular biology* 24(14): 6241-6252.
- Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H et al. (2004) Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* 117(4): 427-439.
- Chanfreau G, Buckle M, Jacquier A (2000) Recognition of a conserved class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(7): 3142-3147.
- Chanfreau G, Rotondo G, Legrain P, Jacquier A (1998) Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1. *The EMBO journal* 17(13): 3726-3737.
- Chapman RD, Heidemann M, Albert TK, Mailhammer R, Flatley A et al. (2007) Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science (New York, NY)* 318(5857): 1780-1782.
- Chavez S, Aguilera A (1997) The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes & development* 11(24): 3459-3470.
- Chavez S, Beilharz T, Rondon AG, Erdjument-Bromage H, Tempst P et al. (2000) A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 19(21): 5824-5834.
- Cheng H, Dufu K, Lee CS, Hsu JL, Dias A et al. (2006) Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* 127(7): 1389-1400.
- Ciais D, Bohnsack MT, Tollervey D (2008) The mRNA encoding the yeast ARE-binding protein Cth2 is generated by a novel 3' processing pathway. *Nucleic acids research* 36(9): 3075-3084.
- Cole CN (2000) mRNA export: the long and winding road. *Nature cell biology* 2(4): E55-58.
- Conrad NK, Wilson SM, Steinmetz EJ, Patturajan M, Brow DA et al. (2000) A yeast heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex associated with RNA polymerase II. *Genetics* 154(2): 557-571.
- Core LJ, Lis JT (2008) Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science (New York, NY)* 319(5871): 1791-1792.

D

- Dalal RV, Larson MH, Neuman KC, Gelles J, Landick R et al. (2006) Pulling on the nascent RNA during transcription does not alter kinetics of elongation or ubiquitous pausing. *Molecular cell* 23(2): 231-239.
- Danin-Kreiselman M, Lee CY, Chanfreau G (2003) RNase III-mediated degradation of unspliced pre-mRNAs and lariat introns. *Molecular cell* 11(5): 1279-1289.
- Darzacq X, Shav-Tal Y, de Turrís V, Brody Y, Shenoy SM et al. (2007) In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nature structural & molecular biology* 14(9): 796-806.

Références

- Davis CA, Ares M, Jr. (2006) Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(9): 3262-3267.
- de la Cruz J, Kressler D, Tollervey D, Linder P (1998) Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 17(4): 1128-1140.
- deHaseth PL, Zupancic ML, Record MT, Jr. (1998) RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *Journal of bacteriology* 180(12): 3019-3025.
- Dengl S, Cramer P (2009) The torpedo nuclease Rat1 is insufficient to terminate RNA polymerase II in vitro. *The Journal of biological chemistry*.
- Dheur S, Vo le TA, Voisinnet-Hakil F, Minet M, Schmitter JM et al. (2003) Pti1p and Ref2p found in association with the mRNA 3' end formation complex direct snoRNA maturation. *The EMBO journal* 22(11): 2831-2840.
- Dieppois G, Iglesias N, Stutz F (2006) Cotranscriptional recruitment to the mRNA export receptor Mex67p contributes to nuclear pore anchoring of activated genes. *Molecular and cellular biology* 26(21): 7858-7870.
- Doma MK, Parker R (2007) RNA quality control in eukaryotes. *Cell* 131(4): 660-668.
- Dombroski AJ, Platt T (1988) Structure of rho factor: an RNA-binding domain and a separate region with strong similarity to proven ATP-binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(8): 2538-2542.
- Dreyfus M, Regnier P (2002) The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* 111(5): 611-613.
- Drolet M (2006) Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Molecular microbiology* 59(3): 723-730.
- Dunn EF, Hammell CM, Hodge CA, Cole CN (2005) Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes & development* 19(1): 90-103.
- Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E, Seraphin B (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nature structural & molecular biology* 14(1): 15-22.

E

- Egecioglu DE, Henras AK, Chanfreau GF (2006) Contributions of Trf4p- and Trf5p-dependent polyadenylation to the processing and degradative functions of the yeast nuclear exosome. *RNA (New York, NY)* 12(1): 26-32.
- Egloff S, Murphy S (2008) Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* 24(6): 280-288.

Références

F

- Fasken MB, Corbett AH (2005) Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nature structural & molecular biology* 12(6): 482-488.
- Fischer T, Strasser K, Racz A, Rodriguez-Navarro S, Oppizzi M et al. (2002) The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *The EMBO journal* 21(21): 5843-5852.
- Fisher RF, Yanofsky C (1983) Mutations of the beta subunit of RNA polymerase alter both transcription pausing and transcription termination in the trp operon leader region in vitro. *The Journal of biological chemistry* 258(13): 8146-8150.
- Fisk DG, Ball CA, Dolinski K, Engel SR, Hong EL et al. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis. *Yeast (Chichester, England)* 23(12): 857-865.
- Fleckner J, Zhang M, Valcarcel J, Green MR (1997) U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. *Genes & development* 11(14): 1864-1872.

G

- Gallardo M, Aguilera A (2001) A new hyperrecombination mutation identifies a novel yeast gene, THP1, connecting transcription elongation with mitotic recombination. *Genetics* 157(1): 79-89.
- Galluppi GR, Richardson JP (1980) ATP-induced changes in the binding of RNA synthesis termination protein Rho to RNA. *Journal of molecular biology* 138(3): 513-539.
- Galy V, Gadal O, Fromont-Racine M, Romano A, Jacquier A et al. (2004) Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* 116(1): 63-73.
- Ganem C, Devaux F, Torchet C, Jacq C, Quevillon-Cheruel S et al. (2003) Ssu72 is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast. *The EMBO journal* 22(7): 1588-1598.
- Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M et al. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415(6868): 141-147.
- Ge D, Lamontagne B, Elela SA (2005) RNase III-mediated silencing of a glucose-dependent repressor in yeast. *Curr Biol* 15(2): 140-145.
- Geiselman J, Yager TD, Gill SC, Calmettes P, von Hippel PH (1992) Physical properties of the *Escherichia coli* transcription termination factor rho. 1. Association states and geometry of the rho hexamer. *Biochemistry* 31(1): 111-121.
- Ghazal G, Gagnon J, Jacques PE, Landry JR, Robert F et al. (2009) Yeast RNase III triggers polyadenylation-independent transcription termination. *Molecular cell* 36(1): 99-109.
- Gilbert W, Guthrie C (2004) The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Molecular cell* 13(2): 201-212.

Références

- Glover-Cutter K, Kim S, Espinosa J, Bentley DL (2008) RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nature structural & molecular biology* 15(1): 71-78.
- Gogol EP, Seifried SE, von Hippel PH (1991) Structure and assembly of the Escherichia coli transcription termination factor rho and its interaction with RNA. I. Cryoelectron microscopic studies. *Journal of molecular biology* 221(4): 1127-1138.
- Green DM, Johnson CP, Hagan H, Corbett AH (2003) The C-terminal domain of myosin-like protein 1 (Mlp1p) is a docking site for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins that are required for mRNA export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(3): 1010-1015.
- Greenblatt J, Li J (1981) Interaction of the sigma factor and the nusA gene protein of E. coli with RNA polymerase in the initiation-termination cycle of transcription. *Cell* 24(2): 421-428.
- Gromak N, West S, Proudfoot NJ (2006) Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 26(10): 3986-3996.
- Gudipati RK, Villa T, Boulay J, Libri D (2008) Phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain dictates transcription termination choice. *Nature structural & molecular biology* 15(8): 786-794.
- Guerin M, Robichon N, Geiselmann J, Rahmouni AR (1998) A simple polypyrimidine repeat acts as an artificial Rho-dependent terminator in vivo and in vitro. *Nucleic acids research* 26(21): 4895-4900.
- Gusarov I, Nudler E (1999) The mechanism of intrinsic transcription termination. *Molecular cell* 3(4): 495-504.
- Gwizdek C, Iglesias N, Rodriguez MS, Ossareh-Nazari B, Hobeika M et al. (2006) Ubiquitin-associated domain of Mex67 synchronizes recruitment of the mRNA export machinery with transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(44): 16376-16381.

H

- Hahn S (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature structural & molecular biology* 11(5): 394-403.
- Hammell CM, Gross S, Zenklusen D, Heath CV, Stutz F et al. (2002) Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. *Molecular and cellular biology* 22(18): 6441-6457.
- Hansen UM, McClure WR (1980) Role of the sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase in initiation. I. Characterization of core enzyme open complexes. *The Journal of biological chemistry* 255(20): 9556-9563.
- Harinarayanan R, Gowrishankar J (2003) Host factor titration by chromosomal R-loops as a mechanism for runaway plasmid replication in transcription termination-defective mutants of Escherichia coli. *Journal of molecular biology* 332(1): 31-46.
- Hieronimus H, Yu MC, Silver PA (2004) Genome-wide mRNA surveillance is coupled to mRNA export. *Genes & development* 18(21): 2652-2662.

Références

- Hilleren P, McCarthy T, Rosbash M, Parker R, Jensen TH (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413(6855): 538-542.
- Hirose Y, Manley JL (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes & development* 14(12): 1415-1429.
- Hodge CA, Colot HV, Stafford P, Cole CN (1999) Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *The EMBO journal* 18(20): 5778-5788.
- Hollingworth D, Noble CG, Taylor IA, Ramos A (2006) RNA polymerase II CTD phosphopeptides compete with RNA for the interaction with Pcf11. *RNA (New York, NY)* 12(4): 555-560.
- Houseley J, Tollervey D (2006) Yeast Trf5p is a nuclear poly(A) polymerase. *EMBO reports* 7(2): 205-211.
- Houseley J, LaCava J, Tollervey D (2006) RNA-quality control by the exosome. *Nature reviews* 7(7): 529-539.
- Huertas P, Aguilera A (2003) Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Molecular cell* 12(3): 711-721.
- Hurt E, Luo MJ, Rother S, Reed R, Strasser K (2004) Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(7): 1858-1862.

I

- Iglesias N, Stutz F (2008) Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. *FEBS letters* 582(14): 1987-1996.

J

- Jensen TH, Patricio K, McCarthy T, Rosbash M (2001a) A block to mRNA nuclear export in *S. cerevisiae* leads to hyperadenylation of transcripts that accumulate at the site of transcription. *Molecular cell* 7(4): 887-898.
- Jensen TH, Boulay J, Rosbash M, Libri D (2001b) The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. *Curr Biol* 11(21): 1711-1715.
- Jensen TH, Boulay J, Olesen JR, Colin J, Weyler M et al. (2004) Modulation of transcription affects mRNP quality. *Molecular cell* 16(2): 235-244.
- Jimeno S, Rondon AG, Luna R, Aguilera A (2002) The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *The EMBO journal* 21(13): 3526-3535.
- Jin DJ, Burgess RR, Richardson JP, Gross CA (1992) Termination efficiency at rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and rho. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(4): 1453-1457.

Références

Johnson SA, Cubberley G, Bentley DL (2009) Cotranscriptional recruitment of the mRNA export factor Yra1 by direct interaction with the 3' end processing factor Pcf11. *Molecular cell* 33(2): 215-226.

Jones JC, Phatnani HP, Haystead TA, MacDonald JA, Alam SM et al. (2004) C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *The Journal of biological chemistry* 279(24): 24957-24964.

K

Kadaba S, Wang X, Anderson JT (2006) Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. *RNA (New York, NY)* 12(3): 508-521.

Kadaba S, Krueger A, Trice T, Krecic AM, Hinnebusch AG et al. (2004) Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA^{Met} in *S. cerevisiae*. *Genes & development* 18(11): 1227-1240.

Kim M, Suh H, Cho EJ, Buratowski S (2009) Phosphorylation of the yeast RPB1 C-terminal domain at serines 2, 5, and 7. *The Journal of biological chemistry*.

Kim M, Ahn SH, Krogan NJ, Greenblatt JF, Buratowski S (2004a) Transitions in RNA polymerase II elongation complexes at the 3' ends of genes. *The EMBO journal* 23(2): 354-364.

Kim M, Vasiljeva L, Rando OJ, Zhelkovsky A, Moore C et al. (2006) Distinct pathways for snoRNA and mRNA termination. *Molecular cell* 24(5): 723-734.

Kim M, Krogan NJ, Vasiljeva L, Rando OJ, Nedeja E et al. (2004b) The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432(7016): 517-522.

Kohler A, Hurt E (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews* 8(10): 761-773.

Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes & development* 14(19): 2452-2460.

Kress TL, Krogan NJ, Guthrie C (2008) A single SR-like protein, Npl3, promotes pre-mRNA splicing in budding yeast. *Molecular cell* 32(5): 727-734.

Krummel B, Chamberlin MJ (1992) Structural analysis of ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase. Deoxyribonuclease I footprinting of defined complexes. *Journal of molecular biology* 225(2): 239-250.

Kyburz A, Sadowski M, Dichtl B, Keller W (2003) The role of the yeast cleavage and polyadenylation factor subunit Ydh1p/Cft2p in pre-mRNA 3'-end formation. *Nucleic acids research* 31(14): 3936-3945.

L

LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E et al. (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121(5): 713-724.

Références

- Landick R (2006) The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochemical Society transactions* 34(Pt 6): 1062-1066.
- Landick R, Carey J, Yanofsky C (1987) Detection of transcription-pausing in vivo in the trp operon leader region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(6): 1507-1511.
- Lang WH, Platt T, Reeder RH (1998) *Escherichia coli* rho factor induces release of yeast RNA polymerase II but not polymerase I or III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(9): 4900-4905.
- Lau LF, Roberts JW, Wu R (1983) RNA polymerase pausing and transcript release at the lambda tR1 terminator in vitro. *The Journal of biological chemistry* 258(15): 9391-9397.
- Lau LF, Roberts JW, Wu R, Georges F, Narang SA (1984) A potential stem-loop structure and the sequence CAAUCAA in the transcript are insufficient to signal rho-dependent transcription termination at lambda tR1. *Nucleic acids research* 12(2): 1287-1299.
- Lebreton A, Seraphin B (2008) Exosome-mediated quality control: Substrate recruitment and molecular activity. *Biochimica et biophysica acta* 1779(9): 558-565.
- Lebreton A, Tomecki R, Dziembowski A, Seraphin B (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* 456(7224): 993-996.
- Lee TI, Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics* 34: 77-137.
- Lei EP, Krebber H, Silver PA (2001) Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes & development* 15(14): 1771-1782.
- Lejeune F, Ishigaki Y, Li X, Maquat LE (2002) The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *The EMBO journal* 21(13): 3536-3545.
- Libri D, Graziani N, Saguez C, Boulay J (2001) Multiple roles for the yeast SUB2/yUAP56 gene in splicing. *Genes & development* 15(1): 36-41.
- Libri D, Dower K, Boulay J, Thomsen R, Rosbash M et al. (2002) Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Molecular and cellular biology* 22(23): 8254-8266.
- Licatalosi DD, Geiger G, Minet M, Schroeder S, Cilli K et al. (2002) Functional interaction of yeast pre-mRNA 3' end processing factors with RNA polymerase II. *Molecular cell* 9(5): 1101-1111.
- Linder P, Stutz F (2001) mRNA export: travelling with DEAD box proteins. *Curr Biol* 11(23): R961-963.
- Liu Q, Greimann JC, Lima CD (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127(6): 1223-1237.
- Lorentzen E, Conti E (2006) The exosome and the proteasome: nano-compartments for degradation. *Cell* 125(4): 651-654.

Références

- Luna R, Gaillard H, Gonzalez-Aguilera C, Aguilera A (2008) Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma* 117(4): 319-331.
- Lund MK, Guthrie C (2005) The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. *Molecular cell* 20(4): 645-651.
- Luo W, Bentley D (2004) A ribonucleolytic rat torpedo RNA polymerase II. *Cell* 119(7): 911-914.
- Luo W, Johnson AW, Bentley DL (2006) The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes & development* 20(8): 954-965.
- Lykke-Andersen S, Jensen TH (2007) Overlapping pathways dictate termination of RNA polymerase II transcription. *Biochimie* 89(10): 1177-1182.

M

- Magyar A, Zhang X, Kohn H, Widger WR (1996) The antibiotic bicyclomycin affects the secondary RNA binding site of Escherichia coli transcription termination factor Rho. *The Journal of biological chemistry* 271(41): 25369-25374.
- Mandart E, Parker R (1995) Effects of mutations in the Saccharomyces cerevisiae RNA14, RNA15, and PAP1 genes on polyadenylation in vivo. *Molecular and cellular biology* 15(12): 6979-6986.
- Mandel CR, Bai Y, Tong L (2008) Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci* 65(7-8): 1099-1122.
- Maniatis T, Reed R (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416(6880): 499-506.
- Mason PB, Struhl K (2005) Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Molecular cell* 17(6): 831-840.
- McCracken S, Fong N, Yankulov K, Ballantyne S, Pan G et al. (1997) The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385(6614): 357-361.
- McKee AE, Silver PA (2007) Systems perspectives on mRNA processing. *Cell research* 17(7): 581-590.
- Meinhart A, Cramer P (2004) Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature* 430(6996): 223-226.
- Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cramer P (2005) A structural perspective of CTD function. *Genes & development* 19(12): 1401-1415.
- Milligan L, Torchet C, Allmang C, Shipman T, Tollervy D (2005) A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation. *Molecular and cellular biology* 25(22): 9996-10004.
- Milligan L, Decourty L, Saveanu C, Rappsilber J, Ceulemans H et al. (2008) A yeast exosome cofactor, Mpp6, functions in RNA surveillance and in the degradation of noncoding RNA transcripts. *Molecular and cellular biology* 28(17): 5446-5457.

Références

- Minvielle-Sebastia L, Beyer K, Krecic AM, Hector RE, Swanson MS et al. (1998) Control of cleavage site selection during mRNA 3' end formation by a yeast hnRNP. *The EMBO journal* 17(24): 7454-7468.
- Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M, Tollervey D (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91(4): 457-466.
- Mitchell P, Petfalski E, Houalla R, Podtelejnikov A, Mann M et al. (2003) Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3' processing of stable RNAs. *Molecular and cellular biology* 23(19): 6982-6992.
- Morgan WD, Bear DG, von Hippel PH (1983) Rho-dependent termination of transcription. I. Identification and characterization of termination sites for transcription from the bacteriophage lambda PR promoter. *The Journal of biological chemistry* 258(15): 9553-9564.
- Morlando M, Greco P, Dichtl B, Fatica A, Keller W et al. (2002) Functional analysis of yeast snoRNA and snRNA 3'-end formation mediated by uncoupling of cleavage and polyadenylation. *Molecular and cellular biology* 22(5): 1379-1389.
- Morris DP, Greenleaf AL (2000) The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* 275(51): 39935-39943.
- Moy VT, Florin EL, Gaub HE (1994) Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science (New York, NY)* 266(5183): 257-259.

N

- Nedea E, He X, Kim M, Pootoolal J, Zhong G et al. (2003) Organization and function of APT, a subcomplex of the yeast cleavage and polyadenylation factor involved in the formation of mRNA and small nucleolar RNA 3'-ends. *The Journal of biological chemistry* 278(35): 33000-33010.
- Nedea E, Nalbant D, Xia D, Theoharis NT, Suter B et al. (2008) The Glc7 phosphatase subunit of the cleavage and polyadenylation factor is essential for transcription termination on snoRNA genes. *Molecular cell* 29(5): 577-587.
- Neil H, Malabat C, d'Aubenton-Carafa Y, Xu Z, Steinmetz LM et al. (2009) Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* 457(7232): 1038-1042.
- Noble CG, Hollingworth D, Martin SR, Ennis-Adeniran V, Smerdon SJ et al. (2005) Key features of the interaction between Pcf11 CID and RNA polymerase II CTD. *Nature structural & molecular biology* 12(2): 144-151.
- Nudler E, Gottesman ME (2002) Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes Cells* 7(8): 755-768.

O

- O'Sullivan JM, Tan-Wong SM, Morillon A, Lee B, Coles J et al. (2004) Gene loops juxtapose promoters and terminators in yeast. *Nature genetics* 36(9): 1014-1018.

Références

P

- Palancade B, Zuccolo M, Loeillet S, Nicolas A, Doye V (2005) Pml39, a novel protein of the nuclear periphery required for nuclear retention of improper messenger ribonucleoparticles. *Molecular biology of the cell* 16(11): 5258-5268.
- Pena-Castillo L, Hughes TR (2007) Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics* 176(1): 7-14.
- Peng WT, Robinson MD, Mnaimneh S, Krogan NJ, Cagney G et al. (2003) A panoramic view of yeast noncoding RNA processing. *Cell* 113(7): 919-933.
- Pereira S, Platt T (1995) Analysis of E. coli rho factor: mutations affecting secondary-site interactions. *Journal of molecular biology* 251(1): 30-40.
- Peterlin BM, Price DH (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Molecular cell* 23(3): 297-305.
- Peters JM, Mooney RA, Kuan PF, Rowland JL, Keles S et al. (2009) Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Phatnani HP, Greenleaf AL (2006) Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & development* 20(21): 2922-2936.
- Piruat JJ, Aguilera A (1998) A novel yeast gene, THO2, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination. *The EMBO journal* 17(16): 4859-4872.
- Proudfoot N (2004) New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Current opinion in cell biology* 16(3): 272-278.

Q

- Query CC, Bentley RC, Keene JD (1989) A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 57(1): 89-101.

R

- Reed R, Hurt E (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108(4): 523-531.
- Richard P, Manley JL (2009) Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes & development* 23(11): 1247-1269.
- Richardson JP (1982) Activation of rho protein ATPase requires simultaneous interaction at two kinds of nucleic acid-binding sites. *The Journal of biological chemistry* 257(10): 5760-5766.
- Richardson JP (1990) Rho-dependent transcription termination. *Biochimica et biophysica acta* 1048(2-3): 127-138.
- Richardson JP (1991) Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor. *Cell* 64(6): 1047-1049.

Références

- Richardson JP (2002) Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochimica et biophysica acta* 1577(2): 251-260.
- Richardson JP, Carey JL, 3rd (1982) rho Factors from polarity suppressor mutants with defects in their RNA interactions. *The Journal of biological chemistry* 257(10): 5767-5771.
- Richardson LV, Richardson JP (1992) Cytosine nucleoside inhibition of the ATPase of *Escherichia coli* termination factor rho: evidence for a base specific interaction between rho and RNA. *Nucleic acids research* 20(20): 5383-5387.
- Roberts JW, Shankar S, Filter JJ (2008) RNA polymerase elongation factors. *Annual review of microbiology* 62: 211-233.
- Rodriguez-Navarro S, Fischer T, Luo MJ, Antunez O, Brettschneider S et al. (2004) Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* 116(1): 75-86.
- Rondon AG, Mischo HE, Proudfoot NJ (2008) Terminating transcription in yeast: whether to be a 'nerd' or a 'rat'. *Nature structural & molecular biology* 15(8): 775-776.
- Rondon AG, Mischo HE, Kawauchi J, Proudfoot NJ (2009) Fail-safe transcriptional termination for protein-coding genes in *S. cerevisiae*. *Molecular cell* 36(1): 88-98.
- Rosonina E, Kaneko S, Manley JL (2006) Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes & development* 20(9): 1050-1056.
- Rougemaille M, Villa T, Gudipati RK, Libri D (2008a) mRNA journey to the cytoplasm: attire required. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 100(6): 327-342.
- Rougemaille M, Gudipati RK, Olesen JR, Thomsen R, Seraphin B et al. (2007) Dissecting mechanisms of nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 complex mutants. *The EMBO journal* 26(9): 2317-2326.
- Rougemaille M, Dieppois G, Kisseleva-Romanova E, Gudipati RK, Lemoine S et al. (2008b) THO/Sub2p functions to coordinate 3'-end processing with gene-nuclear pore association. *Cell* 135(2): 308-321.

S

- Sadowski M, Dichtl B, Hubner W, Keller W (2003) Independent functions of yeast Pcf11p in pre-mRNA 3' end processing and in transcription termination. *The EMBO journal* 22(9): 2167-2177.
- Saguez C, Jensen TH (2009) Assembly of export-competent mRNP: it's all about being connected. *Molecular cell* 33(2): 139-140.
- Saguez C, Olesen JR, Jensen TH (2005) Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Current opinion in cell biology* 17(3): 287-293.
- Saguez C, Schmid M, Olesen JR, Ghazy MA, Qu X et al. (2008) Nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 mutants is triggered by inefficient polyadenylation. *Molecular cell* 31(1): 91-103.
- Saunders A, Core LJ, Lis JT (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nature reviews* 7(8): 557-567.

Références

- Schilders G, Raijmakers R, Raats JM, Pruijn GJ (2005) MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8S rRNA maturation. *Nucleic acids research* 33(21): 6795-6804.
- Schmid M, Jensen TH (2008a) Quality control of mRNP in the nucleus. *Chromosoma* 117(5): 419-429.
- Schmid M, Jensen TH (2008b) The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends in biochemical sciences* 33(10): 501-510.
- Schmitt C, von Kobbe C, Bachi A, Pante N, Rodrigues JP et al. (1999) Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *The EMBO journal* 18(15): 4332-4347.
- Schneider D, Gold L, Platt T (1993) Selective enrichment of RNA species for tight binding to *Escherichia coli* rho factor. *Faseb J* 7(1): 201-207.
- Schwartz A, Margeat E, Rahmouni AR, Boudvillain M (2007a) Transcription termination factor rho can displace streptavidin from biotinylated RNA. *The Journal of biological chemistry* 282(43): 31469-31476.
- Schwartz A, Walmacq C, Rahmouni AR, Boudvillain M (2007b) Noncanonical interactions in the management of RNA structural blocks by the transcription termination rho helicase. *Biochemistry* 46(33): 9366-9379.
- Shuman S (1997) Origins of mRNA identity: capping enzymes bind to the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(24): 12758-12760.
- Singh N, Ma Z, Gemmill T, Wu X, Defiglio H et al. (2009) The Ess1 prolyl isomerase is required for transcription termination of small noncoding RNAs via the Nrd1 pathway. *Molecular cell* 36(2): 255-266.
- Skordalakes E, Berger JM (2003) Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading. *Cell* 114(1): 135-146.
- Skordalakes E, Berger JM (2006) Structural insights into RNA-dependent ring closure and ATPase activation by the Rho termination factor. *Cell* 127(3): 553-564.
- Skordalakes E, Brogan AP, Park BS, Kohn H, Berger JM (2005) Structural mechanism of inhibition of the Rho transcription termination factor by the antibiotic bicyclomycin. *Structure* 13(1): 99-109.
- Skruzny M, Schneider C, Racz A, Weng J, Tollervey D et al. (2009) An endoribonuclease functionally linked to perinuclear mRNP quality control associates with the nuclear pore complexes. *PLoS biology* 7(1): e8.
- Sommer P, Nehrass U (2005) Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Current opinion in cell biology* 17(3): 294-301.
- Sopko R, Huang D, Preston N, Chua G, Papp B et al. (2006) Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Molecular cell* 21(3): 319-330.
- Stackhouse TM, Telesnitsky AP, Meares CF (1989) Release of the sigma subunit from *Escherichia coli* RNA polymerase transcription complexes is dependent on the promoter sequence. *Biochemistry* 28(19): 7781-7788.

Références

- Stanssens P, Remaut E, Fiers W (1986) Inefficient translation initiation causes premature transcription termination in the lacZ gene. *Cell* 44(5): 711-718.
- Stead JA, Costello JL, Livingstone MJ, Mitchell P (2007) The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor Rrp47p, a nucleic acid-binding protein. *Nucleic acids research* 35(16): 5556-5567.
- Steinmetz EJ, Brow DA (2003) Ssu72 protein mediates both poly(A)-coupled and poly(A)-independent termination of RNA polymerase II transcription. *Molecular and cellular biology* 23(18): 6339-6349.
- Steinmetz EJ, Conrad NK, Brow DA, Corden JL (2001) RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* 413(6853): 327-331.
- Steinmetz EJ, Ng SB, Cloute JP, Brow DA (2006a) cis- and trans-Acting determinants of transcription termination by yeast RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 26(7): 2688-2696.
- Steinmetz EJ, Warren CL, Kuehner JN, Panbehi B, Ansari AZ et al. (2006b) Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Molecular cell* 24(5): 735-746.
- Stitt BL, Xu Y (1998) Sequential hydrolysis of ATP molecules bound in interacting catalytic sites of Escherichia coli transcription termination protein Rho. *The Journal of biological chemistry* 273(41): 26477-26486.
- Strambio-de-Castillia C, Blobel G, Rout MP (1999) Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior. *The Journal of cell biology* 144(5): 839-855.
- Strasser K, Hurt E (2000) Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *The EMBO journal* 19(3): 410-420.
- Strasser K, Hurt E (2001) Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413(6856): 648-652.
- Strasser K, Bassler J, Hurt E (2000) Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *The Journal of cell biology* 150(4): 695-706.
- Strasser K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M et al. (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417(6886): 304-308.

T

- Thiebaut M, Kisseleva-Romanova E, Rougemaille M, Boulay J, Libri D (2006) Transcription termination and nuclear degradation of cryptic unstable transcripts: a role for the nrd1-nab3 pathway in genome surveillance. *Molecular cell* 23(6): 853-864.
- Thomsen R, Libri D, Boulay J, Rosbash M, Jensen TH (2003) Localization of nuclear retained mRNAs in Saccharomyces cerevisiae. *RNA (New York, NY)* 9(9): 1049-1057.
- Torchet C, Bousquet-Antonelli C, Milligan L, Thompson E, Kufel J et al. (2002) Processing of 3'-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Molecular cell* 9(6): 1285-1296.

Références

Tran EJ, Zhou Y, Corbett AH, Wentz SR (2007) The DEAD-box protein Dbp5 controls mRNA export by triggering specific RNA:protein remodeling events. *Molecular cell* 28(5): 850-859.

U

Ujvari A, Pal M, Luse DS (2002) RNA polymerase II transcription complexes may become arrested if the nascent RNA is shortened to less than 50 nucleotides. *The Journal of biological chemistry* 277(36): 32527-32537.

Ursic D, Chinchilla K, Finkel JS, Culbertson MR (2004) Multiple protein/protein and protein/RNA interactions suggest roles for yeast DNA/RNA helicase Sen1p in transcription, transcription-coupled DNA repair and RNA processing. *Nucleic acids research* 32(8): 2441-2452.

V

Vanacova S, Wolf J, Martin G, Blank D, Dettwiler S et al. (2005) A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS biology* 3(6): e189.

Vasiljeva L, Buratowski S (2006) Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Molecular cell* 21(2): 239-248.

Vasiljeva L, Kim M, Mutschler H, Buratowski S, Meinhart A (2008) The Nrd1-Nab3-Sen1 termination complex interacts with the Ser5-phosphorylated RNA polymerase II C-terminal domain. *Nature structural & molecular biology* 15(8): 795-804.

Villa T, Rougemaille M, Libri D (2008) Nuclear quality control of RNA polymerase II ribonucleoproteins in yeast: tilting the balance to shape the transcriptome. *Biochimica et biophysica acta* 1779(9): 524-531.

Vinciguerra P, Stutz F (2004) mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Current opinion in cell biology* 16(3): 285-292.

Vinciguerra P, Iglesias N, Camblong J, Zenklusen D, Stutz F (2005) Perinuclear Mlp proteins downregulate gene expression in response to a defect in mRNA export. *The EMBO journal* 24(4): 813-823.

W

Wahle E (2007) Wrong PH for RNA degradation. *Nature structural & molecular biology* 14(1): 5-7.

Walmacq C, Rahmouni AR, Boudvillain M (2004) Influence of substrate composition on the helicase activity of transcription termination factor Rho: reduced processivity of Rho hexamers during unwinding of RNA-DNA hybrid regions. *Journal of molecular biology* 342(2): 403-420.

Walmacq C, Rahmouni AR, Boudvillain M (2006) Testing the steric exclusion model for hexameric helicases: substrate features that alter RNA-DNA unwinding by the transcription termination factor Rho. *Biochemistry* 45(18): 5885-5895.

Weirich CS, Erzberger JP, Flick JS, Berger JM, Thorner J et al. (2006) Activation of the DExD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nature cell biology* 8(7): 668-676.

West ML, Corden JL (1995) Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. *Genetics* 140(4): 1223-1233.

Références

- Windgassen M, Sturm D, Cajigas IJ, Gonzalez CI, Seedorf M et al. (2004) Yeast shuttling SR proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are part of the translating mRNPs, and Npl3p can function as a translational repressor. *Molecular and cellular biology* 24(23): 10479-10491.
- Wong SS, Joselevich E, Woolley AT, Cheung CL, Lieber CM (1998) Covalently functionalized nanotubes as nanometre-sized probes in chemistry and biology. *Nature* 394(6688): 52-55.
- Wyers F, Rougemaille M, Badis G, Rousselle JC, Dufour ME et al. (2005) Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* 121(5): 725-737.

Y

- Yonaha M, Proudfoot NJ (1999) Specific transcriptional pausing activates polyadenylation in a coupled in vitro system. *Molecular cell* 3(5): 593-600.
- Yu X, Horiguchi T, Shigesada K, Egelman EH (2000) Three-dimensional reconstruction of transcription termination factor rho: orientation of the N-terminal domain and visualization of an RNA-binding site. *Journal of molecular biology* 299(5): 1279-1287.
- Yuryev A, Patturajan M, Litingtung Y, Joshi RV, Gentile C et al. (1996) The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(14): 6975-6980.

Z

- Zalatan F, Galloway-Salvo J, Platt T (1993) Deletion analysis of the Escherichia coli rho-dependent transcription terminator trp t'. *The Journal of biological chemistry* 268(23): 17051-17056.
- Zenklusen D, Stutz F (2001) Nuclear export of mRNA. *FEBS letters* 498(2-3): 150-156.
- Zenklusen D, Vinciguerra P, Strahm Y, Stutz F (2001) The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p. *Molecular and cellular biology* 21(13): 4219-4232.
- Zenklusen D, Vinciguerra P, Wyss JC, Stutz F (2002) Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Molecular and cellular biology* 22(23): 8241-8253.
- Zhang Z, Gilmour DS (2006) Pcf11 is a termination factor in Drosophila that dismantles the elongation complex by bridging the CTD of RNA polymerase II to the nascent transcript. *Molecular cell* 21(1): 65-74.
- Zhang Z, Fu J, Gilmour DS (2005) CTD-dependent dismantling of the RNA polymerase II elongation complex by the pre-mRNA 3'-end processing factor, Pcf11. *Genes & development* 19(13): 1572-1580.

Romy HONORINE

Utilisation du facteur bactérien Rho pour l'étude de la biogénèse et du contrôle qualité des transcrits eucaryotes

Chez les eucaryotes, la transcription de l'information génétique en ARN messager (ARNm) est un processus complexe nécessitant de multiples modifications de la molécule d'ARN précurseur. D'après le modèle actuel, l'ARN naissant est recouvert de protéines pour former une particule ribonucléoprotéique (mRNP). Ces étapes de maturation et d'assemblage du transcrit, connues sous le nom de biogénèse des mRNPs, sont physiquement et fonctionnellement couplées à la transcription. Elles assurent l'intégrité ainsi que l'export du transcrit vers le cytoplasme pour y être traduit en protéine. La production du transcrit mature est interconnectée à une étape de contrôle qualité afin d'éviter l'export de transcrits aberrants. Pour identifier de nouveaux facteurs de la biogénèse des mRNPs et comprendre le mode de signalisation des transcrits aberrants, nous avons élaboré un crible innovant. Il repose sur la perturbation de l'expression des gènes de *Saccharomyces cerevisiae* par le facteur bactérien Rho, capable de dissocier des protéines liées à une molécule d'ARN *in vitro*. L'expression de Rho chez la levure perturbe l'assemblage nucléoprotéique co-transcriptionnel et génère des transcrits aberrants qui sont dégradés par le système de surveillance nucléaire. Cette étude révèle les interactions dynamiques des facteurs avec le complexe transcriptionnel et leurs implications dans le mécanisme de reconnaissance des transcrits aberrants par la machinerie de dégradation. Notre méthodologie ouvre des perspectives intéressantes pour détecter de nouveaux facteurs de la biogénèse des mRNPs et évaluer leurs rôles dans la régulation de l'expression des gènes.

Mots clés : ARNm, biogénèse des particules ribonucléoprotéiques, facteur bactérien Rho, transcrits aberrants, mécanisme de surveillance

Use of bacterial Rho factor to study biogenesis and quality control of eukaryotic transcripts

In eukaryotes, the transcription of genetic information into messenger RNA is a complex process which requires multiple modifications of precursor RNA molecule, termed mRNA processing. Current view is that the nascent RNA is sequentially coated with a large set of proteins to generate messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs). Various mRNA processing and assembly events, known as mRNP biogenesis, are coupled physically and functionally to transcription. They confer integrity and promote export of transcript to the cytoplasm for translation. The production of mature export-competent transcripts is interconnected with a quality control step in order to avoid the export of improperly processed transcript. To identify new factors of mRNP biogenesis and understand the signalisation mode of aberrant transcripts, we have implemented an innovative screen. This screen is based on the perturbation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* by bacterial Rho factor which is able to disrupt proteins interacting with RNA molecule *in vitro*. Rho expression in yeast interferes with co-transcriptional nucleoprotein assembly and generates aberrant transcripts which are degraded by the nuclear surveillance system. This study reveals dynamic interactions of protein factors with transcriptional complex and their implications in recognition of aberrant transcripts by the degradation machinery. Our methodology opens interesting prospects to detect new mRNP biogenesis factors and value their role in regulation of genes expression.

Keywords: mRNA, ribonucleoprotein particles biogenesis, bacterial Rho factor, aberrant transcripts, surveillance mechanism



Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301
« Interactions ribonucléoprotéiques
et applications thérapeutiques »
Rue Charles Sadron
45071 Orléans Cedex 2

