

Université de Montréal

Étude du rôle biologique de l'activateur
de phosphatase Rrd1 chez la levure
Saccharomyces cerevisiae

Par

Julie Douville

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph. D.)
en Microbiologie et Immunologie

Août 2006

© Julie Douville, 2006



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude du rôle biologique de l'activateur
de phosphatase Rrd1 chez la levure
Saccharomyces cerevisiae

Présentée par

Julie Douville

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Dindial Ramotar,
Directeur de recherche

Dr Elliot Drobetsky
Président-rapporteur

Dr François Robert
Membre du jury

Dr Michel Tremblay
Examineur externe

RÉSUMÉ

Le stress oxydatif généré par l'environnement autant que par la cellule elle-même est délétère pour certains constituants cellulaires essentiels tels l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides et a par conséquent un impact considérable sur la survie cellulaire. Notre laboratoire s'est intéressé à Rrd1, un activateur de phosphatase qui joue un rôle essentiel dans la protection de la cellule contre ce type de stress. En effet, une cellule mutante pour le gène *RRDI* est hypersensible à des agents causant du stress oxydatif, comme les UVA et le 4-nitroquinoline-1-oxide. Ces mutants présentent un autre phénotype intéressant, soit une résistance considérable à la rapamycine, un immunosuppresseur qui mime des conditions de carence nutritionnelle.

Les travaux présentés dans cette thèse montrent que Rrd1 interagit avec une phosphatase, Sit4, pour protéger la cellule contre les dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif. Cette interaction pourrait permettre l'expression de gènes critiques pour la réparation de ce type de dommages.

Nos travaux démontrent également qu'une souche mutante pour *RRDI* présente un défaut dans la régulation de la transcription *in vivo* en réponse à un traitement à la rapamycine, et des extraits nucléaires dérivés de cette souche sont déficients pour l'activation de la transcription *in vitro* d'un gène rapporteur. De plus, nous montrons que la rapamycine provoque la dégradation de Rpb1, la grosse sous-unité de l'ARN polymérase II. Ce phénomène est réduit de façon dramatique dans

les cellules *rrd1* Δ , suggérant que la transcription se poursuit chez les mutants, permettant la croissance malgré le traitement à la rapamycine.

Nos travaux suggèrent aussi un autre rôle prédominant dans la cellule pour Rrd1. En effet, Rrd1 est associé avec la machinerie transcriptionnelle, de même qu'avec l'ARN polymérase II. Nous démontrons que les mutants *rrd1* Δ sont incapables de dégrader l'ARN polymérase II en réponse au 4-nitroquinoline-1-oxide en plus de la rapamycine. Les mutants montrent une accumulation de la forme ubiquitinée de Rpb1, et cette accumulation est causée par l'incapacité des mutants à déloger l'ARN polymérase II de la chromatine en réponse à un arrêt de la transcription induit par ces deux agents. De plus, nous montrons qu'en réponse à ces agents, il n'y a pas de changement dans la conformation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II dans les mutants contrairement à ce qu'on observe dans la souche sauvage.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que Rrd1 est requis pour isomériser le domaine C-terminal de l'ARN polymérase afin de permettre sa dégradation via le protéasome lorsque l'élongation de la transcription est arrêtée. En plus de caractériser un rôle tout à fait novateur pour Rrd1, nos observations présentent la première démonstration que le domaine C-terminal de l'ARN polymérase est isomérisé *in vivo*, en plus d'associer une fonction à ce changement de structure.

Mots-clés : Rrd1, Ptpa, Sit4, Rpb1, transcription, réparation, CTD, isomérisation

ABSTRACT

Oxidative stress can be generated by the environment as well as by the cell itself, and is deleterious for certain essential cellular constituents like DNA, RNA, proteins and lipids, and as such has a considerable impact on cell survival. Our laboratory studied Rrd1, a phosphatase activator that plays an essential role in protecting the cell against this type of stress. Indeed, mutant cells devoid of Rrd1 are hypersensitive to oxidative stress-inducing agents, like UVA and 4-nitroquinoline-1-oxide. These mutants also present another interesting phenotype, they are extremely resistant to rapamycin, an immunosuppressant mimicking starvation conditions.

The work presented in this thesis shows that Rrd1 interacts with Sit4, a phosphatase, to protect the cell against oxidative stress-induced DNA damage. This interaction could allow expression of critical genes required for repair of this type of DNA damage.

Our work also show that a mutant strain for *RRD1* presents a defect in *in vivo* transcription regulation in reponse to a rapamycin treatment, and nuclear extracts derived from this strain are unable to activate transcription of a reporter gene *in vitro*. Moreover, we demonstrate that rapamycin triggers degradation of Rpb1, the large subunit of RNA polymerase II. This phenomenon is drastically reduced in *rrd1Δ* cells, suggesting that transcription may continue in these mutants, thereby allowing growth despite rapamycin treatment.

Our results also suggest another predominant role in the cell for Rrd1. We found that Rrd1 associates with the transcriptional machinery as well as with RNA polymerase II. We demonstrated that *rrd1*Δ mutants are unable to degrade RNA polymerase II in response to 4-nitroquinoline-1-oxide in addition to rapamycin. The mutants present an accumulation of the ubiquitinated form of Rpb1, and this accumulation is caused by the incapacity of the mutants to release RNA polymerase II from chromatin in response to a transcriptional arrest induced by those two agents. Moreover, we show that the mutants are deficient in modifying the C-terminal domain of RNA polymerase polymerase II conformation in response to these agents when compared to wildtype cells.

Taken together, our data suggest that Rrd1 is required to isomerize the C-terminal domain of RNA polymerase II in order to mediate its release from the chromatin and its subsequent degradation by the proteasome when transcription elongation is hindered. In addition to provide the first characterization of this novel role for Rrd1, our data present the first *in vivo* demonstration that the C-terminal domain of RNA polymerase II undergoes isomerization *in vivo* and associate a cellular function to this structural change.

Keywords : Rrd1, Ptpa, Sit4, Rpb1, transcription, DNA repair, CTD, isomerization

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	XVI
REMERCIEMENTS	XVII
1 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	2
1.1 INTRODUCTION	2
1.2 TRANSCRIPTION	3
1.2.1 Généralités.....	3
1.2.2 Structure de l'ARN polymérase II.....	5
1.2.3 Le CTD joue un rôle de régulation.....	6
1.2.4 Initiation de la transcription	7
1.2.5 Formation du complexe ouvert et dégagement du promoteur.....	9
1.2.6 Élongation de la transcription.....	10
1.2.7 Événements régulés pendant l'élongation.....	13
1.2.8 Terminaison de la transcription.....	15
1.3 OBSTACLES À LA TRANSCRIPTION	16
1.3.1 La réparation par excision de nucléotides : TCR et GGR.....	17
1.3.2 Désordres génétiques associés au NER.....	19
1.3.3 Mécanismes moléculaires du NER.....	19

1.3.4	Un lien entre le TCR et la réparation par excision de bases?.....	21
1.4	DESTIN DE L'ARN POLYMÉRISE II BLOQUÉE	22
1.4.1	Rôle de Rad26/CSB dans le déplacement de l'ARN pol II.....	23
1.4.2	Protéolyse de l'ARN pol II en réponse aux dommages à l'ADN	25
1.5	RÔLE DE RRD1 DANS LA RÉPONSE AU STRESS OXIDATIF	28
1.5.1	Identification de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif..	28
1.5.2	Rrd1 est impliqué dans le maintien de l'intégrité de l'ADN en réponse au stress oxydatif	30
1.5.3	Fonctions multiples de Rrd1/Ptpa	30
1.5.4	Les phosphatases de protéines 2A : structure et fonctions.....	31
1.5.5	Fonctions biochimiques de Rrd1/Ptpa.....	34
1.5.6	Rrd1 est conservé à travers l'évolution	36
1.5.7	Phénotypes associés à Rrd1	38
1.6	RAPAMYCINE ET VOIE DE SIGNALISATION TOR	39
1.6.1	Généralités.....	39
1.6.2	Découverte de la rapamycine	40
1.6.3	Effets biologiques de la rapamycine	41
1.6.4	Effets de la rapamycine sur la transcription	42
1.7	MISE EN CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE	43
2	ARTICLE #1 : The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator protein, yPtpa1/Rrd1, interacts with Sit4 phosphatase to mediate resistance to 4- nitroquinoline-1-oxide and UVA	45
2.1	CONTRIBUTION PERSONNELLE.....	45

2.2	ABSTRACT.....	46
2.3	INTRODUCTION.....	48
2.4	MATERIALS AND METHODS.....	51
2.4.1	Strains and media, and transformation.....	51
2.4.2	Cloning and recombinant DNA techniques.....	51
2.4.3	Plasmids to express native and fusion proteins.....	51
2.4.4	Gene disruption.....	53
2.4.5	Survival curves and alkaline sucrose density gradients.....	53
2.4.6	Preparation of total protein extracts.....	53
2.4.7	Phenyl-sepharose and Talon columns to assess protein-protein interaction.....	54
2.4.8	Immunoblotting.....	55
2.4.9	Fluorescence microscopy.....	56
2.5	RESULTS.....	58
2.5.1	Phenotypic characterization of strain EBY20.....	58
2.5.2	Strain EBY20 is rescued by the <i>SIT4</i> gene.....	60
2.5.3	The <i>sit4</i> Δ mutant is sensitive to 4-NQO and UVA.....	62
2.5.4	Sit4 genetically interacts with yPtpa1.....	64
2.5.5	Sit4 physically interacts with yPtpa1.....	65
2.5.6	yPtpa1 and Sit4 share cellular compartment.....	67
2.6	DISCUSSION.....	70
2.7	ACKNOWLEDGEMENTS.....	74
2.8	REFERENCES.....	75

3	ARTICLE #2 : The <i>Saccharomyces cerevisiae</i> phosphatase activator RRD1 is required to modulate gene expression in response to rapamycin exposure	81
3.1	CONTRIBUTION PERSONNELLE	81
3.2	ABSTRACT	82
3.3	INTRODUCTION	83
3.4	RESULTS	85
3.5	DISCUSSION	92
3.6	ACKNOWLEDGEMENTS	94
3.7	REFERENCES	95
4	ARTICLE #3 : The isomerase Rrd1 mediates release of RNA polymerase II from chromatin in response to specific stress conditions	99
4.1	CONTRIBUTION PERSONNELLE	99
4.2	ABSTRACT	100
4.3	INTRODUCTION	101
4.4	MATERIALS AND METHODS	105
4.4.1	Construction of TAP-tagged Rrd1	105
4.4.2	Purification of the TAP complex	105
4.4.3	Construction of the myc-tagged Rrd1 and Swe1 strains	106
4.4.4	Co-Immunoprecipitation experiments	107
4.4.5	Plasmid to express GFP fusion proteins	108
4.4.6	Extraction of Chromatin-Associated Proteins	108
4.4.7	Construction of GST-CTD	110

4.4.8	GST-CTD purification	111
4.4.9	Circular dichroism spectroscopy	112
4.4.10	Limited chymotrypsin digestion assay	112
4.4.11	Interaction between Rrd1-myc and GST-CTD	112
4.4.12	Gradient plate assay.....	113
4.5	RESULTS.....	115
4.5.1	Affinity purification of Rrd1 reveals its association with several proteins.....	115
4.5.2	Rrd1-myc is co-immunoprecipitated by anti-TFIIE, -Srb5, -Gal11, -Snf6, and -Snf2	117
4.5.3	Rrd1 and associated proteins interact with the large subunit Rpb1 of RNA pol II	118
4.5.4	Rrd1 is tightly bound to the chromatin.....	120
4.5.5	Rrd1 is required to mediate degradation of Rbp1 in response to rapamycin and 4-nitroquinoline-1-oxide exposure.....	120
4.5.6	The ubiquitinated form of Rpb1 accumulates in the <i>rrd1</i> Δ mutant in response to stress	124
4.5.7	Rrd1 is required to release Rpb1 from the chromatin	127
4.5.8	Rrd1 alters the structure of the CTD of RNA pol II in response to stress.....	129
4.5.9	Overexpression of the isomerase Ess1 partially substitutes for Rrd1	134
4.6	DISCUSSION	137
4.7	ACKNOWLEDGEMENTS	143

4.8	REFERENCES.....	144
5	DISCUSSION	153
5.1	INTERACTION SIT4-RRD1: RÔLE BIOLOGIQUE	153
5.2	ARRÊT DE L'ARN POLYMÉRISE II PAR LA RAPAMYCINE	155
5.3	LE RÔLE DE RRD1 DÉPEND DU TYPE DE LÉSIONS.....	159
5.4	ÉJECTION DE L'ARN POLYMÉRISE II BLOQUÉE SUR L'ADN....	161
5.5	RÔLES ALTERNATIFS DE L'UBIQUITINATION	162
5.6	RÔLE ALTERNATIF DE RRD1	163
5.7	COMPLEXITÉ DE LA VOIE DE SIGNALISATION	164
5.8	MODÈLE PROPOSÉ.....	165
6	CONCLUSION	167
7	RÉFÉRENCES.....	169

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1 : Le NER chez les cellules de mammifère	20
Figure 2: Hypothèse du mécanisme de la résolution des complexes ARN pol II arrêtés pendant l'élongation	27
Figure 3 : Rrd1 est conservé dans l'évolution	37

Chapitre 2

Figure 1: Sensitivities of <i>S. cerevisiae</i> parent and mutant strains to 4-NQO	59
Figure 2: Strain EBY20 sustains increased DNA fragmentation upon exposure to 4-NQO.	61
Figure 3: <i>S. cerevisiae</i> mutants defective in the <i>SIT4</i> phosphatase gene exhibits hypersensitivity to 4-NQO and UVA.	63
Figure 4: Sit4-yPtpa1 interaction detected by affinity columns	66
Figure 5: Expression and cellular location of GFP-yPtpa1 and GFP-Sit4 in yeast	69

Chapitre 3

Figure 1: <i>rrd1</i> Δ mutant exhibit normal response to the early events of rapamycin exposure	86
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 2: Growth of the parent and the mutants <i>rrd1Δ</i> , <i>pph3Δ</i> , and <i>rrd1Δ pph3Δ</i> in the absence or presence of rapamycin.....	87
Figure 3: Northern blot analysis of rapamycin-responsive genes in the parent and the mutants <i>rrd1Δ</i> , <i>pph3Δ</i> , and <i>rrd1Δ pph3Δ</i>	89
Figure 4: Rapamycin exposure triggers degradation of RNA polymerase II large subunit Rpb1.....	91

Chapitre 4

Figure 1: Rrd1 is part of the transcriptional machinery complex.....	116
Figure 2: Rrd1 and its partners interact with RNA polymerase II.	119
Figure 3 : Rrd1-myc is tightly bound to the chromatin.....	121
Figure 4 : <i>rrd1Δ</i> mutant displays stabilization of RNA pol II upon treatment with rapamycin or 4-NQO.....	123
Figure 5 : Ub-Rpb1 accumulates in <i>rrd1Δ</i> mutant upon specific stress conditions. .	126
Figure 6: Rrd1 is required to release RNA polymerase II from the chromatin following rapamycin exposure.	128
Figure 7: Rrd1 induces a conformational change in the C-terminal domain of RNA pol II upon specific stress conditions.	132
Figure 8: Increased <i>ESS1</i> gene dosage partially restores 4-NQO resistance to the <i>rrd1Δ</i> mutant.	135

Chapitre 5

Figure 1 : Modèle illustrant le rôle de Rrd1 dans le déplacement de l'ARN

polymérase II bloquée pendant l'élongation 166

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Rrd1 : *Rapamycin resistant deletion 1*

Ptpa : *Phosphotyrosyl phosphatase activator*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

TCR : Transcription coupled repair

GGR : Global genomic repair

NER : Nucleotide excision repair

BER : Base excision repair

UV : Ultraviolet light

ARN pol II : ARN polymérase II

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ARNm : ARN messenger

CTD : C-terminal domain

TBP : TATA binding protein

ATP : Adenosine triphosphate

CS : Cockayne syndrome

CSA : Cockayne syndrome protein A

KDa : KiloDalton

CSB : Cockayne syndrome protein B

XP : *Xeroderma pigmentosum*

ChIP : Chromatin

immunoprecipitation

CPD : Cyclobutane pyrimidine dimer

TTD : Trichothiodystrophie

AP : site apurinique/apyrimidique

TRCF : Transcription Repair

Coupling Factor

ROS : Reactive oxygen species

4-NQO : 4-nitroquinoline-1-oxide

MMS : Methyl methane sulfonate

PP2A : Protein phosphatase 2A

TOR : Target of rapamycin

GFP : Green Fluorescent Protein

PCR : Polymerase chain reaction

RT : Room temperature

RAP : Rapamycin

PPIase : Peptidyl-prolyl isomerase

Ser/Thr : Sérine/thréonine

ORF : Open reading frame

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le docteur Dindial Ramotar, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir confié ce projet de recherche stimulant. Le docteur Ramotar a fait preuve à mon égard de beaucoup de confiance, d'un sens critique constructif et d'une grande patience. Merci aux membres du jury, qui prennent des heures pour lire et évaluer mon travail.

Je veux également remercier tous les membres du laboratoire, présents et passés, pour leur contribution tant au niveau scientifique, technique qu'à l'ambiance dans le laboratoire. Un merci particulier à Cyril Sabbah, pour sa contribution majeure aux discussions sur Rrd1 et pour son amitié. Merci à Nathalie Jovet, ma stagiaire, mon bébé de lab, mon amie. Merci infiniment à Anick Leduc pour les innombrables protocoles, les heures passées dos à dos, les rires et les confidences, et pour son amitié inconditionnelle.

Je remercie aussi des amis, qui m'ont supportée moralement, notamment Karine Gatién, Isabelle Louis, Guillaume Joseph, Julie Desnoyers, Alexandre Ostiguy et Stéphane Savard. Un merci spécial à Annie Moisan et au Dr Luc Gaudreau, pour les discussions, les anticorps et le CTD.

Merci à mon père Richard, qui m'a soutenue de plusieurs façons dans cette aventure et qui trouve si bien les phrases que j'ai besoin d'entendre. Merci à ma mère Sylvie, pour son support, son écoute et ses encouragements. Merci à mes frères Jonathan et Jasmin, pour leur écoute, leur soutien et leur humour.

Chapitre 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

TRANSCRIPTION GÉNIQUE, RÉPARATION DE L'ADN ET DÉCOUVERTE DE RRD1

1 REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 INTRODUCTION

L'intégrité de l'ADN cellulaire est constamment menacée par des sources endogènes aussi bien qu'exogènes. Le métabolisme de l'oxygène génère des radicaux oxygènes dans la cellule, alors que le rayonnement ultraviolet (UV), les radiations ionisantes et d'autres agents génotoxiques exposent l'ADN à l'environnement. De nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans la surveillance et la réparation des dommages à l'ADN sont apparus au cours de l'évolution. Bien qu'un taux minimal de mutation soit requis pour permettre l'évolution et l'adaptation d'un organisme donné, la perte de la fonction de n'importe laquelle de ces protéines de surveillance et de réparation peut mener à l'instabilité génétique, et par conséquent à la carcinogénèse.

Outre les protéines de réparation comme telles, d'autres acteurs jouent des rôles clés dans le maintien de l'intégrité du génome. Les protéines de signalisation impliquées dans la régulation du cycle cellulaire permettent l'arrêt de ce dernier afin d'assurer qu'une copie fidèle du génome sera transmise à la cellule fille. De plus, le mécanisme de la mort cellulaire programmée, appelé apoptose, empêche une cellule qui aurait accumulé trop de mutations délétères de se diviser. Finalement, des protéines dont la fonction principale est liée à l'expression des gènes, telles l'ARN polymérase II (ARN pol II) et le facteur de transcription général TFIIH sont essentielles pour détecter et permettre la réparation de certains types de dommages.

Ce chapitre présente un survol de la transcription, mécanisme essentiel chez la cellule, et de la réparation des dommages à l'ADN qui bloquent la transcription, de même que les liens intimes qui unissent ces deux procédés. Dans la deuxième moitié de ce chapitre, j'introduirai Rrd1, une protéine impliquée dans le couplage de ces deux mécanismes.

1.2 TRANSCRIPTION

1.2.1 Généralités

La transcription est le processus où une chaîne d'ARN identique en séquence à l'un des brins d'ADN (brin codant) est synthétisée. La chaîne d'ARN est complémentaire à l'autre brin d'ADN, qui sert de matrice pour la synthèse de l'ARN. Non seulement la transcription permet-elle l'expression des gènes, mais il s'agit également de l'événement le plus fréquent dans la cellule. Alors que la réplication de l'ADN se produit seulement dans les cellules en prolifération, plus spécifiquement durant la phase S du cycle cellulaire, la transcription des gènes se déroule qu'il y ait prolifération ou non, et ce durant toutes les phases du cycle cellulaire, à l'exception de la mitose où la chromatine est condensée.

La synthèse de l'ARN est catalysée par l'enzyme ARN polymérase. La transcription débute lorsque l'ARN polymérase se lie à une région particulière de l'ADN au début du gène, le promoteur. Le promoteur est adjacent au « point de départ » de la transcription, c'est-à-dire la première paire de bases qui est transcrite en ARN. À partir de ce point, la polymérase ouvre l'hélice d'ADN et se déplace le

long du brin matrice, synthétisant l'ARN, jusqu'à ce qu'elle rencontre une séquence de terminaison. La transcription utilise le processus usuel de l'appariement des bases complémentaires, et la chaîne d'ARN est synthétisée de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

Trois principaux types d'ARN peuvent être synthétisés par ce processus. Les ARN ribosomiaux (ARNr) sont transcrits par l'ARN polymérase I, et sont des constituants importants de la machinerie ribosomale, responsable de la traduction des gènes en protéines. Les ARN messagers (ARNm) sont synthétisés par l'ARN polymérase II. La plus grande partie de l'ADN nucléaire code pour les ARNm, qui portent le message contenant les instructions de synthèse d'un polypeptide du gène au ribosome, et dont la demi-vie est relativement courte. Finalement, l'ARN polymérase III est responsable de la synthèse des ARN de transfert (ARNt), petites molécules dont le repliement rappelle une feuille de trèfle, et qui permettent le chargement des acides aminés sur les ribosomes. Il existe également d'autres ARN non codants, comme les ARN nucléaires (constituants des ribonucléoprotéines), les microARN (complément inverse d'une portion du transcript ARNm d'un autre gène), les ARN guides (impliqués dans l'édition des ARNm). Bien que moins abondants, ces derniers types d'ARN jouent tous des rôles de régulation très importants. Les sections suivantes présentent un survol des mécanismes de régulation de la transcription par l'ARN polymérase II exclusivement, puisque les ARN polymérases I et III ne sont pas impliquées dans mon projet de recherche.

1.2.2 Structure de l'ARN polymérase II

L'ARN pol II eukaryote comporte 12 sous-unités distinctes (Rpb1 à Rpb12) et a une masse moléculaire de plus de 500 kilodaltons. Chez la levure, les gènes codant pour les douzes sous-unités sont tous requis pour une croissance cellulaire normale, et démontrent un haut niveau de conservation tant fonctionnel que structural puisque la plupart des gènes des sous-unités humaines peuvent remplacer fonctionnellement leur homologue chez la levure. La structure de l'ARN pol II de la levure a été résolue par cristallisation et a révélé plusieurs ressemblances avec la structure de l'ARN pol prokaryote. Les deux plus grosses sous-unités, Rpb1 et Rpb2, forment une crevasse qui contient le site actif. La grosse sous-unité Rpb1 possède un domaine C-terminal (CTD) unique qui consiste en de multiples répétitions en tandem d'un heptapeptide consensus, Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (CORDEN 1990). Ce domaine joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité de l'ARN pol II. La séquence consensus est hautement conservée chez les eukaryotes, mais le nombre de répétitions varie de 26 ou 27 chez la levure à 52 chez l'humain, et au moins 8 répétitions de l'heptapeptide consensus sont nécessaires pour la viabilité chez la levure (WEST and CORDEN 1995). Le CTD forme une structure désorganisée en forme de queue à partir du centre catalytique de l'ARN pol II, et est relié par un linker flexible à une région située près du pore de sortie de l'ARN sur l'enzyme (MEINHART *et al.* 2005; NOBLE *et al.* 2005).

1.2.3 Le CTD joue un rôle de régulation

Il y a cinq sites potentiels de phosphorylation dans une seule répétition de la séquence consensus, soit Y1, S2, T4, S5 et S7. Cependant, la phosphorylation du CTD se fait principalement sur la sérine 2 et la sérine 5, et ces deux sérines ne sont pas fonctionnellement équivalentes (WEST and CORDEN 1995; ZHANG and CORDEN 1991). Il y a donc quatre états de phosphorylation possibles pour le CTD, soit non-phosphorylé, phosphorylé sur la sérine 2, phosphorylé sur la sérine 5, ou phosphorylé sur les deux sérines. La forme phosphorylée de l'ARN pol II porte en moyenne un groupement phosphate par répétition, et le statut de phosphorylation du CTD est généralement considéré comme étant le résultat de la balance des activités des kinases et des phosphatases spécifiques au CTD (PAYNE and DAHMUS 1993). Le patron de phosphorylation change pendant le cycle de la transcription, permettant le recrutement de facteurs spécifiques et le recyclage de l'ARN pol II. La phosphorylation sur la sérine 5 est observée principalement dans les régions promotrices, et permet entre autres le recrutement des sous-unités de l'enzyme responsable de la coiffe 5' de l'ARN (KOMARNITSKY *et al.* 2000). La phosphorylation sur la sérine 2 se produit plutôt dans des régions plus distales du promoteur, et provoque la liaison facteurs spécifiques, notamment de la machinerie de processing 3' de l'ARN (KOMARNITSKY *et al.* 2000).

En plus de la phosphorylation, il a été suggéré que le CTD pouvait aussi être isomérisé. En effet, il a été démontré que Ess1 et Pin1, deux peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérases, liaient de façon spécifique le CTD hyperphosphorylé (MORRIS *et al.*

1999). Les peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérases sont des protéines ubiquitaires, présentes chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, qui catalysent la rotation des liens peptides en N-terminal des résidus prolines dans les chaînes polypeptidiques (SHAW 2002). Des approches génétiques ont révélé que Ess1 joue un rôle dans l'initiation et l'élongation de la transcription, suggérant que l'isomérisation du CTD est physiologiquement pertinente (WILCOX *et al.* 2004; WU *et al.* 2000). Finalement, il a été démontré que Ess1 ciblait le lien S5-P6 de la première moitié du CTD (WILCOX *et al.* 2004). Le rôle exact de l'isomérisation du CTD n'est pas encore connu, mais l'existence d'un code du CTD a été suggérée (BURATOWSKI 2003). En effet, si l'on considère que dans chaque répétition de l'heptapeptide il y a deux prolines pouvant être isomérisées, et si on tient également compte des différents statuts de phosphorylation possibles, seize différentes conformations sont possibles. Ce code devient encore plus complexe si on envisage les patrons possibles en combinant plusieurs répétitions. Chaque conformation peut être reconnue par des facteurs spécifiques, permettant ainsi une régulation très précise (BURATOWSKI 2003). En accord avec cette hypothèse, on a démontré que trois protéines liaient exclusivement le conformère tout-*trans* du CTD, soient Pcf1, Pin1 and Ctg-1 de *C. albicans* (BURATOWSKI 2003).

1.2.4 Initiation de la transcription

Des études menées depuis 30 ans visant à reconstituer la transcription promoteur-dépendante par la l'ARN pol II avec des protéines purifiées ont permis de mieux comprendre la complexité de l'initiation de la transcription, du moins pour les

gènes possédant une boîte TATA. Selon le modèle que ces études ont permis d'établir, la première étape de l'initiation consiste en la liaison de la boîte TATA du promoteur par TBP (TATA Binding Protein) ou par TFIID (complexe multiprotéique qui contient TBP et d'autres facteurs, les TAFs). Puisque TBP est la première protéine à se lier au promoteur et que la boîte TATA est à une distance constante du point de départ, cette liaison séquence-spécifique permet d'établir un site de reconnaissance nucléoprotéique important pour le positionnement de l'ARN pol. Ensuite, TFIIA est recruté de même que TFIIB qui lie à la fois la polymérase et la sous-unité TBP, servant ainsi d'adaptateur qui permet la liaison spécifique de la polymérase à TFIID au promoteur. TFIIF amène la polymérase au complexe et joue un double rôle dans l'assemblage du complexe de pré initiation en se liant à l'intermédiaire TFIID-TFIIB-TFIIA, ce qui le stabilise considérablement, de même qu'en recrutant TFIIE, TFIIJ et TFIIH au complexe (LEE and YOUNG 2000). Un autre complexe multiprotéique, appelé Mediator/Srb, est également associé à l'ARN pol II. Le Mediator/Srb se lie au CTD non phosphorylé de l'ARN pol II et est composé d'environ 20 polypeptides. Le Mediator joue un rôle essentiel dans la régulation transcriptionnelle en servant de cible pour des activateurs et en acheminant des signaux à l'ARN pol II et aux autres composantes de l'appareil de transcription. À ce jour, il n'est pas encore clair si le Mediator existe dans la cellule en association avec l'ARN pol II libre ou s'il est recruté au promoteur. De plus, la composition exacte du Mediator peut varier selon les conditions de l'environnement, permettant ainsi d'adapter la transcription à différentes conditions (LEE and YOUNG 2000).

1.2.5 Formation du complexe ouvert et dégagement du promoteur

Suite à l'assemblage complet du complexe de pré initiation, une activité hélicase associée à TFIIF catalyse le déroulement ATP-dépendant de la matrice ADN à partir du point de départ de la transcription, ce qui forme le complexe ouvert, qui précède l'initiation et la synthèse du transcrit d'ARN par l'ARN pol II. TFIIF stimule l'activité de TFIIF. La synthèse du premier lien phosphodiester se produit à cette étape qui représente l'initiation de la transcription en tant que telle. Suite à l'établissement du complexe ouvert, la sérine 5 du CTD de l'ARN pol II est phosphorylée par TFIIF qui possède une activité kinase en plus de son activité hélicase. Cette phosphorylation permet la libération de la plupart des facteurs avant que l'ARN pol II ne quitte le promoteur (GERBER *et al.* 1995). En effet, plusieurs facteurs généraux de transcription demeurent au promoteur, servant d'échafaudage pour la formation du prochain complexe d'initiation (YUDKOVSKY *et al.* 2000). Lorsque le promoteur est dégagé du premier complexe d'initiation, la prochaine ronde de transcription peut débuter. Cette ré-initiation est potentiellement beaucoup plus rapide que la ronde initiale et est responsable de la plus grande partie du volume de la transcription dans la cellule (ORPHANIDES and REINBERG 2000).

Le dégagement du promoteur semble être une étape limitante dans l'initiation de la transcription. À cette étape, l'ARN polymérase est très instable, sujette aux pauses et aux arrêts, et la transcription est abortive. En conséquence, à chaque étape d'addition d'un nucléotide, il existe une compétition entre la dissociation du complexe d'élongation et la synthèse du prochain lien phosphodiester jusqu'à ce que

le transcrit atteint une longueur de 9 nucléotides environ. La transition entre la transcription abortive et processive est le résultat de la balance entre les facteurs d'élongation négatifs DSIF (Spt4 et Spt5 chez la levure) et NELF et les facteurs positifs comme P-TEFb, TFIIF et TFIIH. P-TEFb est une kinase cycline-dépendante qui phosphoryle le CTD de l'ARN pol II sur la sérine 2. P-TEFb phosphoryle également la sous-unité Spt5 de DSIF et la sous-unité RD de NELF (PRICE 2000). TFIIF stimule l'élongation en diminuant la fréquence des pauses de l'ARN pol II alors que l'activité ATPase/hélicase de TFIIH permet de supprimer les arrêts de la polymérase (KUMAR *et al.* 1998; PRICE *et al.* 1989). L'action concertée de P-TEFb, TFIIF et TFIIH permet de convertir le complexe de pré-initiation en complexe d'élongation.

1.2.6 Élongation de la transcription

Pendant plusieurs années, l'élongation de la transcription a été considérée comme l'étape banale de l'addition de ribonucléotides triphosphates à la chaîne d'ARNm en croissance. Il est maintenant évident que ce processus est une étape dynamique et hautement régulée, capable de coordonner des événements subséquents. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme ciblant spécifiquement l'étape d'élongation de la transcription. De plus, de nombreuses étapes de maturation des ARNm, comme l'ajout de la coiffe en 5', l'épissage, le processing de l'extrémité 3', la surveillance et l'export sont modulés via des interactions avec le complexe d'élongation de la transcription.

Les pauses de l'ARN pol II pendant l'élongation sont probablement causées par un réarrangement structural dans l'enzyme et dans la séquence d'ADN, résultant en un intermédiaire « inactivé » (NEUMAN *et al.* 2003). Contrairement aux arrêts transcriptionnels, les pauses sont réversibles d'elles-mêmes, et pourraient être un mode de régulation. En effet, il existe plusieurs facteurs, comme TFIIF, les Elongins, le facteur ELL, la protéine CSB qui aussi impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN, qui modulent les pauses, et ainsi la vitesse de l'élongation de la transcription. En plus de ces facteurs qui stimulent directement le taux de synthèse de l'ARN pol II, les facteurs qui remodelent la chromatine sont également importants afin d'aider la polymérase à traverser les nucléosomes. Parmi ceux-ci, on peut nommer les protéines du complexe de remodelage de la chromatine Swi/Snf, l'ATPase Chd1, les chaperones d'histones FACT et Spt6, les protéines modifiant les histones comme l'acétyltransférase Elongator, les méthyltransférases Set1 et Set2 qui sont recrutées par le complexe PAF, ainsi que le protéasome 19S dont le rôle dans la stimulation de l'élongation est encore obscur.

Les pauses transcriptionnelles peuvent dans certaines situations dégénérer en arrêts transcriptionnels. Les arrêts sont dus à la polymérase qui fait un retour en arrière sur la matrice ADN, résultant en un mauvais alignement du site actif catalytique avec le 3'-OH du transcrit d'ARN. Un mécanisme conservé à travers de l'évolution permet aux complexes arrêtés de reprendre l'élongation productive en clivant le transcrit d'ARN dans la direction 3'-5'. Ce clivage permet le réalignement du site actif de la polymérase et le 3'-OH, ce qui facilite le passage à travers les sites d'arrêts (GU and REINES 1995). Le facteur TFIIS augmente l'efficacité de la

polymérase en élongation (CONAWAY *et al.* 2003). Sa liaison à l'ARN polymérase II provoque un changement conformationnel important et ce changement de structure correspond à un réalignement de l'ARN dans le site actif (KETTENBERGER *et al.* 2003).

Comme il a été mentionné précédemment, le statut de phosphorylation du CTD de l'ARN pol II varie au cours du cycle de transcription. La forme hypophosphorylée est préférentiellement recrutée au complexe de pré-initiation, la forme phosphorylée sur la sérine 5 est associée au complexe d'élongation précoce alors que la forme phosphorylée sur la sérine 2 est retrouvée principalement dans les stades plus tardifs de l'élongation (SHILATIFARD *et al.* 2003). En plus des kinases déjà mentionnées, il existe également des phosphatases qui permettent la régulation de l'état de phosphorylation du CTD. FCP1 est une phosphatase régulée par TFIIF qui déphosphoryle préférentiellement la sérine 2 et qui permet le recyclage de la polymérase après la terminaison de la transcription, tout comme Ssu72 qui déphosphoryle la sérine 5 (KRISHNAMURTHY *et al.* 2004; LIN *et al.* 2002a; LIN *et al.* 2002b). D'autres petites phosphatases régulées par TFIIF ont été identifiées, SCP1, SCP2 et SCP3 qui semblent déphosphoryler la sérine 5, possiblement suite à l'initiation. Le facteur général TFIIB pourrait également jouer un rôle dans le recyclage de la polymérase (CHAMBERS *et al.* 1995; CHO *et al.* 1999).

Le modèle présenté plus haut où le CTD est non phosphorylé au promoteur, phosphorylé sur la sérine 5 à l'initiation et au début de l'élongation, et phosphorylé sur la sérine 2 en élongation plus tardive est sans aucun doute naïf et simplifié à

l'extrême. En effet, les évidences obtenues à ce jour suggèrent un ensemble de changements plus complexes et plus subtils. Il a été démontré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) que les niveaux de phosphorylation de la sérine 2 augmentaient pendant l'élongation, pour atteindre un sommet près du site de polyadénylation de l'ARNm, pour redescendre ensuite (AHN *et al.* 2004). De plus, un certain nombre de répétitions demeurent probablement non phosphorylés et les niveaux de phosphorylation de la sérine 5 ne descendent pas à zéro pendant l'élongation, indiquant que la phosphorylation n'est pas la même dans chaque répétition du CTD (AHN *et al.* 2004). Il est également plausible que certaines répétitions du CTD soient doublement phosphorylées pendant l'élongation, augmentant la complexité de l'information potentiellement encodée dans le CTD (BURATOWSKI 2003).

1.2.7 Événements régulés pendant l'élongation

Les transcrits produits par l'ARN polymérase II sont modifiés à leurs extrémités 5' et 3', et doivent également être épissés. Les extrémités 5' des ARNm sont coiffées par une guanosine triphosphate méthylée, et cette modification est essentielle pour les autres étapes du processing, pour la localisation et la traduction de l'ARNm. Ce coiffage en 5' est effectué par les activités séquentielles de la 5'-triphosphatase, de la guanylyltransférase et de la méthyltransférase (PROUDFOOT *et al.* 2002). L'enzyme de coiffage est recrutée en partie par la liaison directe à la forme phosphorylée du CTD de l'ARN pol II, et son activité est intégrée avec l'ARN pol II du complexe d'élongation phosphorylée sur la sérine 5 (MOTEKI and PRICE 2002). Il

a été proposé qu'un mécanisme de checkpoint existait durant l'élongation précoce afin d'assurer l'addition fidèle d'une coiffe en 5' (ORPHANIDES and REINBERG 2002). Au début de l'élongation, le complexe d'élongation est en pause par l'action du facteur négatif NELF. La sous-unité Spt5 de DSIF et la phosphorylation du CTD recrutent l'enzyme de la coiffe. Suite à l'ajout de la coiffe en 5', NELF est relâché, possiblement par l'action concertée de l'enzyme de la coiffe, de la phosphorylation de Spt5 et de la sérine 2 du CTD par P-TEFb et de la phosphatase FCP1 (SCHROEDER *et al.* 2000; SCHROEDER *et al.* 2004).

Le complexe du spliceosome a pour fonction d'épisser les ARNm et est composé de petites ribonucléoprotéines nucléaires et de protéines additionnelles (JURICA and MOORE 2003). Bien que l'épissage et la transcription soient des réactions biochimiquement très distinctes *in vitro*, plusieurs évidences suggèrent qu'*in vivo*, ces deux processus sont couplés. Le recrutement de la machinerie d'épissage par le CTD a été visualisé dans des cellules vivantes (MISTELI *et al.* 1997). Le statut de phosphorylation du CTD régule spécifiquement l'activité d'épissage de l'ARNm, et il a été démontré que la sélection d'un site d'épissage particulier était relié à la vitesse du complexe d'élongation, indiquant un rôle important des pauses transcriptionnelles dans ce processus (DE LA MATA *et al.* 2003; HIROSE *et al.* 1999).

Les extrémités 3' des ARNm sont clivées et polyadénylées, et l'extension 3' polyA joue un rôle dans la terminaison, le transport, la traduction et la stabilité du transcrit. Plusieurs composantes de la machinerie de processing 3' interagissent avec le CTD phosphorylé sur la sérine 2 (LICATALOSI *et al.* 2002). L'ARN polymérase

poursuit sa transcription au-delà du site correspondant à l'extrémité 3' et certaines séquences sont reconnues comme cibles pour une coupure endonucléolytique suivie de la polyadénylation.

1.2.8 Terminaison de la transcription

Une connexion a été établie depuis longtemps entre la polyadénylation et la terminaison de la transcription, lorsqu'on a découvert que ces deux processus étaient dépendants des mêmes séquences d'ADN aux extrémités 3' des gènes (CONNELLY and MANLEY 1988; LOGAN *et al.* 1987). Cette connexion est devenue encore plus évidente lorsqu'il a été découvert que certains facteurs de clivage et de polyadénylation des ARNm étaient également requis pour la terminaison (PROUDFOOT 2004; PROUDFOOT *et al.* 2002). Deux modèles généraux ont été développés pour expliquer ce lien. Le premier modèle, appelé « anti-terminator » propose que l'émergence des séquences de polyadénylation sur l'ARN induit un changement dans les facteurs associés avec la polymérase (LOGAN *et al.* 1987). Par exemple, la liaison de facteurs de polyadénylation pourrait déplacer un facteur d'élongation positif ou recruter un facteur d'élongation négatif. En conséquence, l'ARN pol II devient moins processive et termine la transcription. Le second modèle, souvent appelé « Torpedo », suggère que le clivage au site de polyadénylation génère une nouvelle extrémité 5' (CONNELLY and MANLEY 1988). Contrairement à l'extrémité 5' coiffée de l'ARNm, cette extrémité pourrait agir comme point d'entrée pour une activité exonucléase ou hélicase qui se déplacerait le long de l'ARN et dissocierait la polymérase.

Les études menées dans les dernières années ont amené du support aux deux modèles. Il apparaît peu probable qu'il n'existe qu'un seul mécanisme uniforme pour la terminaison par l'ARN pol II. Des images des chromosomes de *Drosophila* obtenues par microscopie électronique ont montré différents patrons aux extrémités 3', où la plupart des gènes présentent une terminaison abrupte, sans clivage du transcrit, compatible avec le modèle anti-terminator (KOMARNITSKY *et al.* 2000). D'autres gènes présentent clairement des transcrits clivés associés avec la polymérase en élongation aux extrémités 3', supportant directement le modèle Torpedo.

1.3 OBSTACLES À LA TRANSCRIPTION

L'ARN polymérase II peut transcrire l'ADN de façon efficace seulement si elle est capable de surmonter les obstacles sur le brin matrice. Plusieurs types d'obstacles différents peuvent être rencontrés, par exemple les protéines liant l'ADN, les structures d'ADN inhabituelles et les nucléosomes. Cependant, la barrière la plus puissante à la progression de la polymérase est sans aucun doute les lésions à l'ADN sur le brin transcrit d'un gène actif (SVEJSTRUP 2002b). De nombreux types de dommages à l'ADN peuvent bloquer la transcription, et une polymérase piégée de façon irréversible est inacceptable pour la cellule, particulièrement si cette situation se produit dans un gène dont le produit est essentiel pour la viabilité cellulaire. Heureusement, les cellules ont développé des systèmes efficaces pour répondre aux dommages à l'ADN pouvant bloquer la progression des polymérases (CONAWAY *et al.* 2000; SVEJSTRUP 2002a).

Il est important de faire la distinction entre les dommages mutagènes et les dommages cytotoxiques. Les lésions mutagènes sont définies comme étant des dommages qui n'interfèrent pas nécessairement avec le métabolisme de l'ADN, mais s'ils ne sont pas éliminés avant la réplication, peuvent causer un changement dans l'encodage et avoir pour conséquence des mutations et la carcinogénèse (MITCHELL *et al.* 2003). Les lésions cytotoxiques quant à elles interfèrent avec la transcription, la réplication et la ségrégation des chromosomes. Elles incluent les lésions encombrantes, les crosslinks inter-brins et les cassures de brin (MITCHELL *et al.* 2003). La prochaine section ne couvrira que les lésions cytotoxiques, qui sont pertinentes pour mon projet.

1.3.1 La réparation par excision de nucléotides : TCR et GGR

Comme mentionné précédemment, le facteur d'élongation TFIIIS permet à la polymérase de traverser des sites d'arrêts comme les structures inhabituelles d'ADN et les protéines liées à l'ADN. Cependant, TFIIIS est incapable de promouvoir la progression de l'ARN pol II à travers certaines lésions qui bloquent complètement la transcription (DONAHUE *et al.* 1994). Parmi les mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN, une voie est spécialisée dans la réparation préférentielle des dommages situés sur le brin transcrit des gènes actifs, soit la réparation couplée à la transcription, ou TCR (MELLON *et al.* 1987). En général, on considère que le blocage du complexe de l'ARN pol II au site d'un dommage est l'événement précoce qui initie le TCR.

La réparation sélective des dommages sur le brin transcrit des gènes actifs (soit un faible pourcentage du génome) permet à la transcription de reprendre même en l'absence de réparation significative dans le reste de l'ADN génomique, et ce phénomène a été documenté chez les cellules de mammifères, chez la levure et chez *Escherichia coli* (MELLON and HANAWALT 1989; MELLON *et al.* 1987; SWEDER and HANAWALT 1992). Dans ces trois organismes, on a montré clairement que le TCR faisait partie d'une voie plus générale, soit la réparation par excision de nucléotides (NER). Cette voie a pour substrats des dommages qui distorsionnent la double-hélice d'ADN, comme les dimères cyclobutane pyrimidine (CPD) et les photoproduits (6-4), qui sont produits par la lumière UV, de même que certaines autres lésions encombrantes produites par des agents chimiques, comme les crosslinks intra-brin de cisplatine (CHEN *et al.* 1992; JONES *et al.* 1991; VAN HOFFEN *et al.* 1995). En plus du TCR, le NER comporte également une seconde sous-voie, appelée la réparation génomique globale (GGR). Le GGR représente la réparation sur le brin non-transcrit des gènes actifs, de même que la réparation des régions du génome qui ne sont pas exprimées. Les deux sous-voies diffèrent principalement au niveau de la reconnaissance du dommage (MITCHELL *et al.* 2003; SVEJSTRUP 2002b). Le NER est un processus complexe qui requiert plus de trente protéines chez les eucaryotes, parmi lesquelles on retrouve les protéines du groupe XP (XPA à XPG), qui sont nécessaires pour la reconnaissance du dommage à l'ADN et l'incision au site de dommage.

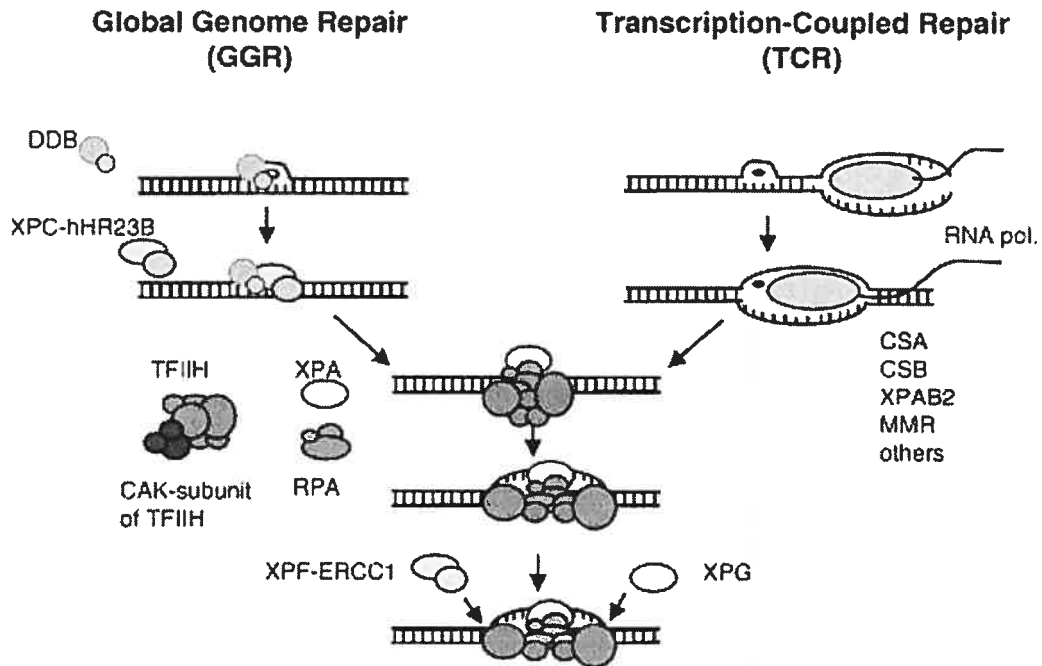
1.3.2 Désordres génétiques associés au NER

L'importance biologique du NER se manifeste par l'existence de trois désordres autosomaux récessifs rares chez l'humain, le xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD). Les patients XP montrent une photosensibilité sévère et une pigmentation anormale, souvent accompagnées par un retard mental, et ils développent habituellement un cancer de la peau en bas âge (BOOTSMA 1998; LEHMANN 2003). Les individus atteints du CS présentent un retard de croissance, un vieillissement prématuré, une dégénérescence neurologique progressive et une photosensibilité cutanée (LEHMANN 2003; NANCE and BERRY 1992). Les patients atteints de TTD quant à eux montrent une dysplasie des cheveux/poils, une ichtyose, un retard mental, une microencéphalie et un retard de croissance, de même qu'une photosensibilité dans 50% des cas (LEHMANN 2003). Il a été démontré que le XP est causé par une mutation dans l'un des 8 gènes du groupe XP et les symptômes sont causés par un défaut du NER en général. Le CS est causé par une mutation dans *CSA* ou *CSB*, et représente un défaut du TCR. La TTD est causée par une mutation dans le gène *XPD*, qui est une sous-unité du facteur de transcription TFIIH, et la complexité de cette maladie reflète bien les divers rôles joués par TFIIH tant dans la transcription que dans la réparation (LEHMANN 2003).

1.3.3 Mécanismes moléculaires du NER

Le mécanisme général du TCR et du GGR est illustré dans la Figure 1. On remarquera que les deux voies impliquent les mêmes facteurs, l'étape de reconnaissance du dommage mise à part. Brièvement, dans le cas du GGR, la lésion

est reconnue par XPE et liée par le complexe XPC/hHR23B (Rad4/Rad23 chez la levure), qui cause une distorsion de l'hélice et recrute les autres facteurs de réparation (DE LAAT *et al.* 1999; MELLON 2005). Dans le cas du TCR, il semble que la polymérase bloquée par une lésion soit elle-même le signal qui recrute les autres



tiré de van Hoffen A., et al. (2003) *Toxicology* 193: 79-90

Figure 1 : Le NER chez les cellules de mammifère

facteurs de réparation. Suite à la détection de la lésion, TFIIH est recruté (ou est déjà présent dans le complexe de l'ARN pol II dans le cas du TCR) et catalyse la formation d'un complexe ouvert au site de dommage. TFIIH agit aussi comme protéine de structure, facilitant la formation du complexe de réparation. TFIIH compte neuf sous-unités, dont les hélicase XPB (Rad25) et XPD (Rad3), qui catalysent la création d'une région simple-brin de 20 à 30 nucléotides autour de la lésion (DE LAAT *et al.* 1999). La protéine XPA (Rad14) joue un rôle crucial dans les

étapes précoces du GGR et du TCR. Il s'agit d'une protéine liant l'ADN simple brin, qui démontre une affinité plus grande pour l'ADN endommagé proportionnellement à l'ampleur de la distorsion de la double-hélice. XPA interagit avec un grand nombre de facteur du NER, et on pense qu'il agit en aval de XPC pour vérifier le dommage et positionner correctement la machinerie du NER sur la lésion (DE LAAT *et al.* 1999). La protéine RPA est une autre protéine liant l'ADN simple-brin, cependant on croit qu'elle lie plutôt le brin non-endommagé, stabilisant ainsi l'intermédiaire monocaténaire et éliminant les structures secondaires. RPA est crucial pour coordonner les nucléases XPG (Rad2) et ERCC1/XPF (Rad10/Rad1), qui ont une polarité spécifique (DE LAAT *et al.* 1999). En effet, XPG effectue la première incision du côté 3', et joue également un rôle dans la structure du complexe NER (DE LAAT *et al.* 1999). La nucléase ERCC1-XPF quant à elle catalyse l'incision du côté 5' de la lésion. La brèche ainsi créée est ensuite remplie par la polymérase δ et ϵ , via la liaison du facteur RF-C et PCNA (DE LAAT *et al.* 1999).

1.3.4 Un lien entre le TCR et la réparation par excision de bases?

La réparation par excision de bases (BER) et une autre voie de réparation, distincte du NER, qui agit sur des bases déaminées, alkylées, oxydées, ou encore sur des sites apurinique/apyrimidique (AP) générés spontanément ou sur des cassures simple-brin avec une lésion à l'extrémité 3' (SUNG and DEMPSEY 2006). Brièvement, le mécanisme principal de réparation des bases endommagées consiste en cinq étapes enzymatiques. Une ADN glycosylase excise la base endommagée, une AP lyase ou une AP endonucléase incise la double-hélice, une phosphodiesterase crée un espace

d'un nucléotide, une ADN polymérase insère le nucléotide correct et une ADN ligase re-scelle le brin d'ADN (SUNG and DEMPLÉ 2006).

Certaines publications ont rapporté que la réparation de dommages oxydatifs pouvait être couplée à la transcription (COOPER *et al.* 1997; GOWEN *et al.* 1998; LE PAGE *et al.* 2000; LEADON and COOPER 1993). Puisque plusieurs lésions créées par le stress oxydatif sont des substrats pour le BER, il a été suggéré que le BER pouvait aussi être couplé à la transcription. Cependant, il n'y a eu aucune démonstration génétique ou biochimique directe d'un rôle du BER dans le TCR. Par ailleurs, les lésions oxydatives 8-oxoguanine et thymine glycol ne semblent pas bloquer l'élongation de l'ARN polymérase dans des systèmes *in vitro* (TORNALETTI *et al.* 2001; VISWANATHAN and DOETSCH 1998). De plus, plusieurs articles focusant sur l'examen du TCR des lésions oxydatives ont été rétractés (COOPER *et al.* 2005; GOWEN *et al.* 2003; LE PAGE *et al.* 2005). Par conséquent, la validité de cette portion du domaine doit être considérée avec prudence, du moins pour l'instant (MELLON 2005). Cependant, il a été proposé que la réparation d'une lésion oxydative par le BER pourrait créer un intermédiaire ayant la capacité de bloquer l'ARN pol II, enclenchant ainsi le TCR (ZHOU and DOETSCH 1993). D'autres études seront nécessaires afin d'éclaircir les liens entre le BER et le TCR.

1.4 DESTIN DE L'ARN POLYMÉRASE II BLOQUÉE

Comme détaillé précédemment, certains dommages sur l'ADN peuvent causer une obstruction à la progression de l'ARN polymérase II. La polymérase bloquée

présente un obstacle stérique pour la machinerie de réparation (TORNALETTI *et al.* 1999). Qu'advient-il de la polymérase bloquée, et comment la machinerie du NER accède-t-elle à la lésion? Il existe présentement dans la littérature deux modèles mutuellement exclusifs du mécanisme moléculaire de cette étape du TCR. Le premier modèle suggère que l'ARN pol II est déplacée temporairement du site de dommage (backtracking), sans être délogée de l'ADN. Après la réparation du dommage, l'élongation de la transcription peut reprendre pour compléter la synthèse de l'ARNm (TORNALETTI *et al.* 1999). Le second modèle propose que la grande sous-unité Rpb1 de l'ARN pol II est polyubiquitinée suite au blocage, pour être subséquemment dégradée par le protéasome. Dans ce cas, l'ARNm incomplet est abandonné et l'initiation de la transcription peu reprendre pour produire de nouveaux transcrits (RATNER *et al.* 1998).

1.4.1 Rôle de Rad26/CSB dans le déplacement de l'ARN pol II

La réparation sur le brin non-transcrit est beaucoup plus lente dans les régions d'ADN positionnées dans les nucléosomes que dans les régions inter-nucléosomales, alors que la vitesse de réparation sur le brin transcrit est indépendante de la position des nucléosomes. Cependant, certaines lésions dans des régions inter-nucléosomales sont réparées plus lentement sur le brin transcrit que sur le brin non-transcrit si RAD26 (qui encode l'homologue de CSB chez la levure) est délété (TIJSTERMAN and BROUWER 1999). Cette observation suggère que le NER aux sites les plus accessibles semble perturbé par la présence de l'ARN pol II sur le brin transcrit. Ainsi, une des

fonctions de Rad26 (et de CSB) pourrait être de déplacer la polymérase afin de permettre la réparation (TIJSTERMAN and BROUWER 1999).

Rad26/CSB est une ATPase de la famille Swi/Snf et possède un homologue procaryote, le transcription repair coupling factor (TRCF) (EISEN *et al.* 1995; SELBY and SANCAR 1993). TRCF est une translocase ATP-dépendante qui peut déplacer l'ARN polymérase II vers l'avant sur l'ADN (PARK *et al.* 2002). L'une des caractéristiques bien établie de TRCF est sa capacité à déloger la polymérase si les nucléotides sont absents ou si un obstacle est dans sa voie. Ainsi, TRCF est capable d'éjecter l'ARN pol II si l'arrêt est dû à un dommage à l'ADN (SELBY and SANCAR 1993). Cependant, cette caractéristique ne semble pas être conservée chez l'homologue eucaryote, CSB, qui est incapable de déplacer l'ARN pol II d'un site de dommage (SELBY and SANCAR 1997b). Ceci n'est pas étonnant puisque CSB et Rad26 sont apparentés de façon plutôt lointaine à TRCF (EISEN *et al.* 1995). Par contre, on sait que CSB peut promouvoir l'addition d'un nucléotide par la polymérase bloquée à une lésion (SELBY and SANCAR 1997a). Aussi, on a rapporté que l'enzyme RSC, semblable aux Swi/Snf, était une ADN translocase, comme TRCF (SAHA *et al.* 2002). Il est possible que les protéines de la famille Swi/Snf aient pour substrat les nucléosomes, mais dans le cas de CSB/Rad26, le substrat primaire pourrait être l'ARN pol II. Trois mécanismes sont suggérés pour le mode d'action de Rad26/CSB. Premièrement, Rad26/CSB pourrait remodeler l'interface ARN pol II-ADN pour rendre la lésion plus accessible. Deuxièmement, Rad26/CSB pourrait éjecter la polymérase du site de dommage. Finalement, Rad26/CSB pourrait aussi promouvoir le bypass de la lésion par l'ARN pol II (SVEJSTRUP 2003).

1.4.2 Protéolyse de l'ARN pol II en réponse aux dommages à l'ADN

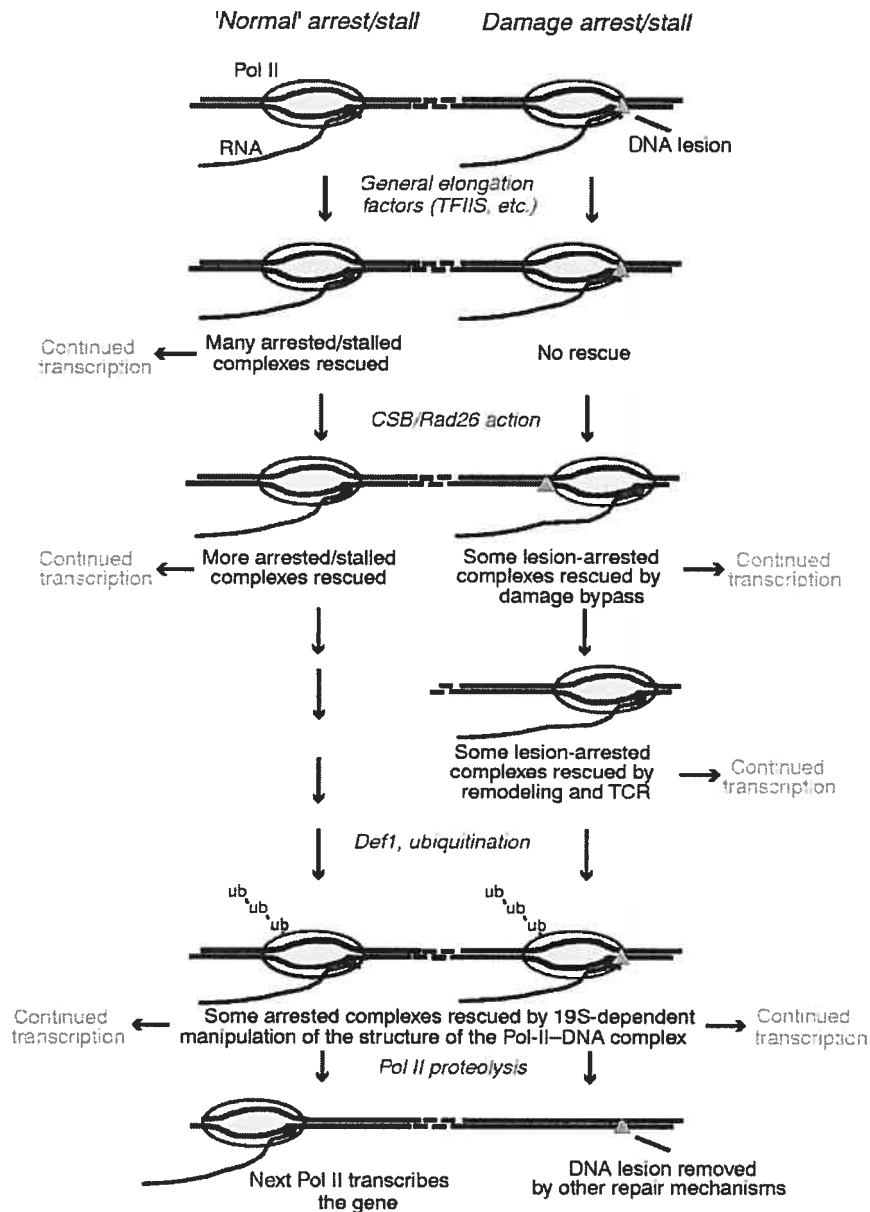
Lorsque l'action de CSB/Rad26 ne résout pas le problème de l'ARN pol II bloquée à un site de lésion, une réponse plus drastique pourrait être nécessaire. En effet, il a été démontré qu'en réponse à plusieurs dommages à l'ADN, l'ARN pol II est ubiquitinée par l'ubiquitine ligase Rsp5 et dégradée via le protéasome (BEAUDENON *et al.* 1999; BREGMAN *et al.* 1996; INUKAI *et al.* 2004; JUNG and LIPPARD 2006; LEE *et al.* 2002; RATNER *et al.* 1998). Ceci suggère que l'ARN pol II est éliminée du site de dommage afin que la réparation puisse rapidement se faire. Cependant, la fonction de la protéolyse de l'ARN pol II n'est sans doute pas d'activer le TCR (LOMMEL *et al.* 2000; WOULDSTRA *et al.* 2002). Des études récentes suggèrent que l'ubiquitination et la dégradation de l'ARN pol II seraient plutôt une alternative de dernier ressort à la réparation de l'ADN (WOUDSTRA *et al.* 2002).

Cette hypothèse a été soulevée suite à la découverte et à la caractérisation de Def1 chez la levure. Les mutants *def1Δ* présentent des phénotypes indiquant que cette protéine joue un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN de même que dans l'élongation de la transcription. Notamment, les cellules *def1Δ* ne sont pas sensibles aux UV et leur TCR est fonctionnel. Cependant, lorsque la mutation *def1Δ* est combinée avec des mutations qui réduisent ou abolissent la capacité des cellules à réparer les dommages à l'ADN, les cellules deviennent extrêmement sensibles aux UV, indiquant que Def1 fait partie d'une voie qui est alternative à la réparation (WOUDSTRA *et al.* 2002). En effet, les mutants *def1Δ* sont incapables d'ubiquitiner et de dégrader l'ARN pol II en réponse aux dommages induits par les UV (WOUDSTRA

et al. 2002). Il est intéressant de noter que les mutants de *RAD26* se comportent de façon opposée : dans ces cellules, l'ARN pol II est dégradée de façon beaucoup plus rapide et beaucoup plus complète en réponse aux dommages que dans une cellule sauvage. Cependant, chez les doubles mutants *rad26Δdef1Δ*, la dégradation de l'ARN pol II est restaurée. L'interaction fonctionnelle de Rad26 et Def1 *in vivo* joue sans doute un rôle dans la régulation de la dégradation de la polymérase en réponse aux dommages à l'ADN (WOUNDSTRA *et al.* 2002).

Il est intéressant de noter que l'ubiquitination et la protéolyse de l'ARN polymérase ne se produisent pas qu'en réponse à des dommages à l'ADN. En effet, il a été rapporté que l' α -amanitine, une toxine qui inhibe l'élongation par l'ARN pol II, de même que la déprivation en nucléotides pouvaient induire le même phénomène (LEE *et al.* 2002; YANG *et al.* 2003). Les résultats présentés dans ces deux études de même que ceux présentés par l'équipe de Svejstrup en 2005 ont permis de déterminer que l'ubiquitination était en fait déclenchée par un blocage ou un arrêt persistant de l'ARN pol II, bien que la présence d'un dommage augmente l'efficacité de l'ubiquitination (LEE *et al.* 2002; SOMESH *et al.* 2005; YANG *et al.* 2003). De plus, l'ubiquitination est beaucoup plus efficace sur un complexe d'élongation que sur la polymérase seule, de même que si Def1 est présent (SOMESH *et al.* 2005). Le statut de phosphorylation du CTD est également important pour la régulation de l'ubiquitination. En accord avec les observations mentionnées précédemment, la phosphorylation en S5 inhibe l'ubiquitination, suggérant que les polymérases qui sont dans les stades précoces de transcription (donc susceptibles à de nombreuses pauses

et arrêts) ne sont pas ciblées (SOMESH *et al.* 2005). La Figure 2 propose un modèle qui résume la régulation des événements entourant un arrêt de l'ARN pol II.



tiré de Svejstrup J.Q. (2003) *J. Cell Sci.* 116 ; 447-51

Figure 2: Hypothèse du mécanisme de la résolution des complexes ARN pol II arrêtés pendant l'élongation

1.5 RÔLE DE RRD1 DANS LA RÉPONSE AU STRESS OXIDATIF

1.5.1 Identification de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif

Le stress oxydatif a un impact significatif sur la santé humaine en général, et plus particulièrement dans le mécanisme de la carcinogénèse. C'est pourquoi notre laboratoire s'est intéressé à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la réponse cellulaire à ce type de stress, avec un intérêt plus marqué pour les gènes dont le rôle favorise la réparation des dommages à l'ADN induits par les espèces oxygènes réactives (ROS). Nous avons choisi la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme organisme modèle pour ces études puisque son génome est bien caractérisé et facilement manipulable. De plus, les processus cellulaires fondamentaux, incluant la réparation de l'ADN de même que la transcription, sont très bien conservés de la levure à l'humain. Ainsi, l'isolement de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif chez la levure pourrait mener à l'identification de fonctions inédites de gènes inconnus ou de gènes déjà caractérisés chez l'humain.

Notre laboratoire a conduit un criblage d'une banque de mutants de levure afin d'isoler des mutants présentant une hypersensibilité au 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) (RAMOTAR *et al.* 1998). Le 4-NQO a été utilisé largement dans des systèmes de cellules de mammifères pour étudier la carcinogénèse induite par des dommages à l'ADN et génère principalement deux types de lésions : 1) des lésions génotoxiques encombrantes, qui sont réparées par le NER de façon analogue aux dimères de pyrimidine cyclobutane et aux photoproduits (6-4) pyrimidine pyrimidone générés par les UV-254 nm (HOEIJMAKERS 1993; PRAKASH *et al.* 1993), et 2) des dommages

oxidatifs (NUNOSHIBA and DEMPLE 1993), puisque le 4-NQO peut entrer dans le cycle redox pour produire des anions superoxide qui peuvent ensuite être transformés en ROS entraînant des modifications de bases et des cassures de brin (NUNOSHIBA and DEMPLE 1993) (YAMAMOTO *et al.* 1993); ces lésions sont réparées par le BER. Par conséquent, les 55 mutants isolés suite à ce criblage initial pouvaient présenter des défauts dans différentes voies métaboliques, incluant le NER et le BER. Afin d'isoler les mutants possédant un défaut spécifiquement dans la réponse aux ROS de ce groupe, les souches hypersensibles au 4-NQO ont été exposées aux UVC (254 nm). Les mutants présentant une forte sensibilité croisée aux UVC ont été exclus de l'étude puisque ceux-ci étaient susceptibles de porter des défauts dans des gènes déjà connus pour jouer un rôle dans des voies de réparation de l'ADN, comme ceux impliqués dans le NER et la réparation des photoproduits et des lésions encombrantes générés par le 4-NQO. Les 5 mutants résiduels montrant une hypersensibilité au 4-NQO et une sensibilité parentale aux UV-254nm ont été caractérisés pour leur résistance à d'autres agents oxidants, tels le diamide et les UVA (320-400 nm).

Deux de ces mutants, EBY1 et EBY10, présentaient des caractéristiques semblables, soient une hypersensibilité au 4-NQO, aux UVA et au diamide, une légère sensibilité aux UVB (290-320 nm) et au peroxyde d'hydrogène. Ces deux souches présentaient également des sensibilités parentales aux radiations ionisantes et à la bléomycine, suggérant que les défauts génétiques se situaient bien au niveau de la réponse au stress oxidatif et non pas un niveau de la réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue ou du NER (DOUVILLE *et al.* 2004; RAMOTAR *et*

al. 1998). La souche EBY10 a fait l'objet d'une partie de mon projet de doctorat et vous trouverez au Chapitre 2 l'article que nous avons publié à ce sujet.

1.5.2 Rrd1 est impliqué dans le maintien de l'intégrité de l'ADN en réponse au stress oxydatif

La souche EBY1 portait une mutation dans le gène *RRD1*, un des deux homologues de la levure de l'activateur de phosphotyrosyl phosphatase humain, hPTPA. En plus des phénotypes de sensibilité décrits plus haut, notre laboratoire a démontré que les souches mutantes pour *RRD1* présentaient une fréquence de cassure de chromosomes très élevée comparativement à une souche sauvage suite à un traitement au 4-NQO. Les souches mutantes pour *RRD1* présentent également un phénotype d'hypermutableté dans des conditions normales, et ce phénotype est exacerbé lorsque les cellules sont exposées au 4-NQO. L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude suggèrent que Rrd1 joue un rôle dans la réponse au stress oxydatif, et plus précisément dans le maintien de l'intégrité chromosomique (RAMOTAR *et al.* 1998).

1.5.3 Fonctions multiples de Rrd1/Ptpa

L'homologue mammifère de *RRD1*, PTPA, a été identifié en 1990 et a fait depuis l'objet de plusieurs études qui n'ont toutefois pas encore permis de bien définir sa fonction. Ptpa a été initialement identifié comme étant un activateur de l'activité phosphotyrosyl phosphatase des PP2A, une famille de phosphatases de protéine ayant principalement une activité sérine/thréonine (Ser/Thr) phosphatase

(CAYLA *et al.* 1990). De fait, les PP2A sont des phosphatases multifonctionnelles impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires, et Ptpa semble jouer autant de rôles. La section suivante est consacrée à une revue plus détaillée des fonctions des PP2A. Cette complexité a compliqué l'étude du rôle cellulaire précis de Ptpa, et a induit des conceptions erronées sur la fonction réelle de Ptpa. En effet, des études récentes ont démontré que Ptpa était plutôt un activateur général des PP2A, et possédait une activité peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase (FELLNER *et al.* 2003b; JORDENS *et al.* 2006a; LONGIN *et al.* 2004). Plusieurs dogmes ont dû être remis en question, et vous trouverez dans les sections suivantes une revue de la structure et des fonctions cellulaires des PP2A, suivie d'une synthèse des connaissances publiées à ce jour sur Ptpa/Rrd1.

1.5.4 Les phosphatases de protéines 2A : structure et fonctions

Les phosphatases de protéines 2A sont une famille de protéines conservées phylogéniquement parmi les eukaryotes et sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires (JANSSENS and GORIS 2001). La fonction biochimique primaire des PP2A est de déphosphoryler les résidus sérines et thréonines qui sont phosphorylés mais elles possèdent également une faible activité basale de phosphatase de tyrosines phosphorylées (CHERNOFF *et al.* 1983; WAELKENS *et al.* 1987).

Au niveau structurel, chez les mammifères, le noyau de l'enzyme consiste en un dimère (PP2A_D) composé d'une sous-unité catalytique d'une masse d'environ 36 kDa (PP2A_C) et d'une sous-unité régulatrice d'environ 65 kDa appelée sous-unité A

ou PR65 (MAYER-JAEKEL and HEMMINGS 1994). Le dimère formant le noyau enzymatique existe de façon indépendante dans la cellule, et représente environ le tiers des PP2A cellulaires totales (KREMMER *et al.* 1997). Une troisième sous-unité régulatrice B peut s'associer au noyau. 4 familles de sous-unités B ont été répertoriées à ce jour (B, B', B'' et B'''), possédant chacune leurs isoformes, et l'association de ces troisièmes sous-unités avec le noyau est mutuellement exclusive (MAYER-JAEKEL and HEMMINGS 1994).

Chez les mammifères, il existe 2 isoformes de la sous-unité catalytique (α et β) qui partagent 97% d'identité dans leur séquence primaire, mais qui sont encodés par deux gènes distincts, exprimés de façon ubiquitaire (ARINO *et al.* 1988; KHEW-GOODALL *et al.* 1991). Le clonage de PP2A_C de plusieurs eukaryotes inférieurs a révélé que la structure de cette protéine est demeurée remarquablement constante à travers l'évolution, et pourrait même être la plus conservée de toutes les enzymes connues à ce jour (COHEN *et al.* 1990).

La sous-unité A est une sous-unité structurelle intimement associée avec PP2A_C, formant un échafaud auquel la sous-unité B peut se lier. Les différentes sous-unités B interagissent avec la sous-unité A via des sites qui se chevauchent, expliquant l'exclusion mutuelle des différentes sous-unités B au sein de l'enzyme (RUEDIGER *et al.* 1994; RUEDIGER *et al.* 1992). Comme pour la sous-unité catalytique, les mammifères comptent deux isoformes de la sous-unité A, α et β , partageant 86% d'identité au niveau de leur séquence, et qui sont exprimés de façon ubiquitaire (HEMMINGS *et al.* 1990).

Les sous-unités B sont très diversifiées, et ne présentent aucune similitude de séquence entre les différentes familles, bien qu'elles reconnaissent des segments similaires de la sous-unité A. Les membres de la famille des sous-unités B sont exprimés de façon tissus-spécifique, et la distribution des variants est aussi différente selon les compartiments cellulaires (MAYER *et al.* 1991; STRACK *et al.* 1999; STRACK *et al.* 1998; ZOLNIEROWICZ *et al.* 1994). C'est l'association de la sous-unité B au noyau de l'enzyme qui confère à cette dernière sa spécificité de substrat et sa localisation cellulaire (ZOLNIEROWICZ *et al.* 1996).

L'assemblage de toutes ces sous-unités en dimère ou en trimère fonctionnel permet 76 combinaisons différentes, illustrant bien la complexité des PP2A chez les mammifères (JANSSENS and GORIS 2001).

Chez la levure, l'organisation des PP2A est beaucoup plus simple que dans les systèmes de mammifères. Les sous-unités catalytiques sont encodées par *PPH21* et *PPH22*, la sous-unité structurelle par *TPD3*, et il n'existe que deux sous-unités régulatrices encodées par *CDC55* (famille B) et par *RTS1* (famille B') (HEALY *et al.* 1991; RONNE *et al.* 1991; VAN ZYL *et al.* 1992). Il n'existe apparemment pas d'homologue des familles B'' et B'''. La levure possède trois autres sous-unités catalytiques, qui font partie de la famille des PP2A-like, soient Sit4, Pph3 et Ppg1 qui participent à la formation de complexes avec les deux autres sous-unités (JIANG 2006).

En plus de leur association avec les sous-unités A et B, les sous-unités catalytiques de PP2A peuvent aussi exister de façon indépendante en complexe avec Tap42 (JIANG 2006). L'interaction PP2A_C-Tap42 est un processus dynamique, régulé par la voie de signalisation TOR (Target of Rapamycin) en réponse aux conditions nutritionnelles. L'inhibition de la voie TOR par la rapamycine (un inhibiteur des kinases Tor) provoque la dissociation de Tap42 et PP2A_C ce qui amène l'activation de la phosphatase (JIANG 2006). La voie TOR sera couverte plus en détail dans la section 1.6.

Vu le nombre important d'holoenzymes potentielles et la possibilité qu'elles aient chacune des fonctions partiellement non-redondantes, il n'est pas surprenant que les PP2A soient associées avec une variété impressionnante de processus biologiques, incluant le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, la transcription, l'épissage des ARN, la traduction et la morphogénèse (DI COMO and ARNDT 1996; HEALY *et al.* 1991; KARAIKOU *et al.* 1999; LIN *et al.* 1998; MERMOUD *et al.* 1994; VAN ZYL *et al.* 1992). Les PP2A sont également une cible cellulaire importante pour des toxines invasives et des virus (GARCIA *et al.* 2000).

1.5.5 Fonctions biochimiques de Rrd1/Ptpa

Comme mentionné précédemment, les PP2A peuvent exister sous forme de dimère ou de trimère, et possèdent deux activités phosphatases : une activité principale Ser/Thr phosphatase, et un niveau basal d'activité tyrosyl phosphatase. Ptpa a été identifié initialement comme étant un activateur de l'activité

phosphotyrosyl phosphatase de la forme dimère des PP2A (CAYLA *et al.* 1990). Cependant, cette étude a exclu la possibilité que Ptpa active la forme trimérique de l'holoenzyme, ou encore que Ptpa agisse sur l'activité Ser/Thr phosphatase des PP2A (CAYLA *et al.* 1990). Toutefois, des études plus récentes ont démontré que ces suppositions étaient erronées. En effet, les études publiées par Fellner *et al.* (2003) et par Longin *et al.* (2004) ont démontré que la fonction principale de Ptpa était plutôt de stimuler l'activité Ser/Thr phosphatase de la forme trimérique des PP2A (FELLNER *et al.* 2003b; LONGIN *et al.* 2004). Ces deux études ont aussi suggéré que l'activation des PP2A par Ptpa se faisait via un changement de conformation, ce qui est en accord avec les études précédentes qui avaient écarté la possibilité que Ptpa possède une activité kinase. Le mécanisme d'activation est cependant demeuré évasif jusqu'à ce qu'on identifie que Ptpa et son homologue de levure Rrd1 possédaient une activité peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase (PPIase) sur des peptides synthétiques (JORDENS *et al.* 2006a).

Les peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérases sont des protéines ubiquitaires, présentes chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, qui catalysent la rotation des liens peptides en N-terminal des résidus prolines dans les chaînes polypeptidiques (SHAW 2002). L'étude de Jordens *et al.* (2006) a démontré que Rrd1 et Ptpa peuvent changer la structure de peptides synthétiques courts, et cette activité est stimulée par l'addition d'ATP et de Mg^{2+} , deux cofacteurs déjà connu de Ptpa (CAYLA *et al.* 1990; JANSSENS *et al.* 1998; JORDENS *et al.* 2006a). En addition, l'un des substrats synthétiques représentant une séquence conservée à travers les PP2A (186 LQEPHEGPMCDL 198) peut être isomérisée de façon efficace par Ptpa (JORDENS *et*

al. 2006a). Ainsi, il a été suggéré que cette activité PPIase pourrait représenter le mécanisme par lequel Ptpa active les PP2A (JORDENS *et al.* 2006a). Néanmoins, à ce jour ni la cible *in vivo* ni la fonction biologique de l'activité PPIase ont été établies.

1.5.6 Rrd1 est conservé à travers l'évolution

Il existe un autre gène homologue à *RRD1* chez la levure, soit *RRD2*. Des homologues de Rrd1 ont aussi été identifiés chez *S. pombe* (accession Z98980), *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, et chez de nombreux mammifères, comme le lapin, la souris, le chien et l'humain (CAYLA *et al.* 1990; CAYLA *et al.* 1994a; VAN HOOF *et al.* 1994; VAN HOOF *et al.* 1998). De plus, Ptpa semble être ubiquitaire chez les mammifères, puisqu'il a été détecté dans le cerveau, le foie, le rein, le muscle, la rate, le pancréas et les cellules adipeuses du lapin et du chien, de même que dans des lignées cellulaires variées dérivées de la souris et de l'humain (CAYLA *et al.* 1994a; FELLNER *et al.* 2003b).

La figure 3 de la page suivante présente un alignement des séquences de Rrd1 et de plusieurs de ses homologues. Il faut noter que bien que les homologues de mammifères sont très semblables entre eux au niveau de la séquence en acides aminés, beaucoup moins de similitudes sont observables entre les protéines de mammifères et les protéines des eucaryotes inférieurs. De plus, les protéines de la levure et de *Drosophila* sont beaucoup plus grosses que leurs homologues de mammifères (47 kDa vs 37 kDa) (VAN HOOF *et al.* 1998). Toutefois, certaines

H-Ptpa	MAEGERQPPDSSEEAPPATQNFIIIPKKEIHTVPDMGKWKRSQAYADYIGFILTLENEGVK	60
M-Ptpa	MAEGERQPPDSSEETPPTTQNFIIIPKKEIHTVPDMGKWKRSQAYADYIGFILTLENEGVK	60
D-Ptpa	MASGINQAAG-----KLPAlA-----KKVQNLGDMGVWQKSRAFHDLIGYINGTSSAIQ	49
C-Ptpa	MAENSYKPPE-----MKIKNVFDLNPWFYFSKAYEYLAFLHRLNDSVV	43
Y-Rrd2	MLPE-----KRLLT PDDMKLWEESPTRAHFTKFIIDLAE SVK	37
Y-Rrd1	MSLDRVDWPHATFS-----TPVKRIFDTQTTLDFQSSLAIHRIKYHLHKYTTLIS	50
H-Ptpa	GK---KLTFEYRVSEAI EKLVALLNTLDRWIDETPPVDQP--SRFGNKAYRTWYAKLDEE	115
M-Ptpa	GK---KLTFDYKVSEAI EKLVALLDTLDRWIDETPPVDQP--SRFGNKAYRTWYAKLDQE	115
D-Ptpa	GI---KTTDEIFESEMLKLLRLFDAL EKLV EQNPPLEQP--QRFGNKAYRDWAQAMREL	104
C-Ptpa	GV---HTTADMRC TDLVISFIDMLDKLEKWAEEI PLEDVSE-QRFGNKAYRK FYEKLCKE	99
Y-Rrd2	GHE--NSQYKEPISE SINSMMNLLS QIKDITQKHPVIK DADSSRFGKVEFRDFYDEVSRN	95
Y-Rrd1	HCSDPDPHATASSIAMVNGLMGVLDKLAHLIDET PPLPGP--RRYGNLACREWHHKLDER	108
H-Ptpa	AENLVATVVP THLAAAVPEVAVYLKESVGNSTRIDYGTGHEAAFAAFLCCLCKIGVLRV-	174
M-Ptpa	AENLVATVVP THLAAAVPEVAVYLKEAVGNSTRIDYGTGHEAAFAAFLCCLCKIGVLRV-	174
D-Ptpa	LPELLEQLLPDDKKRYQVELGQYLTESFGNATRIDYGTGHELSFLFLC SLFKAEI LQE-	163
C-Ptpa	SPDLLASVLPENVHDALVELVPYFTESFGNATRIDYGS GHEANFLILLFCLQKLGVFTE-	158
Y-Rrd2	SRKILRSEFP SLTDEQLEQLSIYLDES WGNKRRIDYGS GHELNFMCLLYGLYSYGI FNLS	155
Y-Rrd1	LPQWLQEMLPSEYHEVPELQYYLGN SFGSSTRLDYGTGHELSFMATVAALDMLGMFPH-	167
H-Ptpa	DDQIAIVFKVFNRYLEV MRK LQKTYRMEPAGSQGVWGLDDFQFLPFIWGS S---QLIDHP	231
M-Ptpa	DDQVAIVFKVFD RYLEV MRK LQKTYRMEPAGSQGVWGLDDFQFLPFIWGS S---QLIDHP	231
D-Ptpa	RDIVS AALRRFNRYLEVARQLQRTYNMEPAGSQGVWGLDDFQFV PFIWGS A---QLAVKS	220
C-Ptpa	NDDKVLVLRIFNKYLRVCRHLQTRFKMEPAGSRGVHAI DDFQFAPFIFGSA---QLIGSK	215
Y-Rrd2	NDSTNLV LKVFIEY LKIMRILETKYWE PAGSHGVWGLDDYHFLPFLFGAF---QLTHK	212
Y-Rrd1	-MRGADVFL LFNKY YTIMRRLILT YLEPAGSHGVWGLDDHFHLVYILGSSQWQLLDAQA	226
H-Ptpa	YLEPRHFVDEKAVNENHKDYMFL ECILFITEMKTGP-FAEHSNQLWNISA-VPSWSKVNQ	289
M-Ptpa	HLEPRHFVDEKAVSENHKDYMFLQ CILFITEMKTGP-FAEHSNQLWNISA-VPSWSKVNQ	289
D-Ptpa	PFDP SKFVDEAII TEYKDHFMFISCIDYICKVKTGH-FGEHSNQLWSITD-VPTWAKINA	278
C-Ptpa	SIVPDSYLKKNIVETHAHTSLFLDCVNFINQTKTGP-FHEHSNQLWNISA-VPHWKVNS	273
Y-Rrd2	HLKPI SIHNNELVEMFAHRYLYFGC IAFINKVKSSASLRWHS PMLDDISG-VKTWSKVAE	271
Y-Rrd1	PLQPREILDKSLVREYKDTNFY CQGINFINEVKMGP-FEEHSPILYDIAVTVPRWSKVCK	285
H-Ptpa	GLIRMYKAECLEKFPVIOHF KFGS-LLPIHPVTSG-----	323
M-Ptpa	GLIRMYKAECLEKFPVIOHF KFGS-LLPIHPVTSG-----	323
D-Ptpa	GLVKMYOKEILSKFPVIOH VYFGE-LMTFEPVSSGTTLSNALLGHVAPPPSKRICIGTPN	337
C-Ptpa	GMFKMYEGEVLK KFPVQHM MFGS-LFSFDRSEHPRESMEDAPSQDFMPPRAPAQHGMFA	332
Y-Rrd2	GMIKMYKAEVLSKLPIMQH FYFSE-FLPCPDGVS-----PPRGH IHDGTDK	316
Y-Rrd1	GLLKMYSVEVLK KFPVQHF WFGTGFPPWVNIQNGTDLPVFEEKEEESIEQANAGSPGRE	345
H-Ptpa	-----	
M-Ptpa	-----	
D-Ptpa	LVPPVPVATAPPPAESLSIEQNVGDSSSESSD NSVLRPSTSSSSLVAAAEGSGDKPSKE	397
C-Ptpa	FKIPS-AANTSTVHSSSVVESGDLRRLHSEKHPNEHCPPP MADA-----	375
Y-Rrd2	DDECNFEGHVHTTWGDCCGIKLPSAIAATEMNK KHKH KPIPFD-----	358
Y-Rrd1	QTSTRFPTSTSMPPPGVPPSGNNINYL SHQNSHRNQT SFSRDR LRR-----	393

Tiré de Cyril Sabbah 2004

Figure 3 : Rrd1 est conservé dans l'évolution

H: Humain, M: Souris, D: *Drosophila*, C: *C. elegans* et Y: *S. cerevisiae*.
Les séquences surlignées correspondent aux régions hautement conservées.

mutations dans ces régions altèrent de façon importante l'activité de Ptpa, indiquant un rôle majeur pour ces régions (JORDENS *et al.* 2006a; LEULLIOT *et al.* 2006; VAN HOOF *et al.* 1998). De plus, si on transforme un vecteur permettant l'expression de Ptpa de souris dans une souche de levure où Rrd1 est absent, on peut observer la complémentation de certains phénotypes (J. Douville et D. Ramotar, données non publiées).

La cristallisation de Rrd1 et de ses homologues Rrd2 et Ptpa a récemment été rapportée par l'équipe de Jozef Goris (LEULLIOT *et al.* 2006). Les cristaux obtenus ont révélé une protéine ayant une structure composée exclusivement d'hélices- α qui est complètement différente de la structure des autres PPIases connues (LEULLIOT *et al.* 2006). La protéine est organisée en deux domaines séparés par une crevasse dans laquelle on retrouve des résidus hautement conservés (LEULLIOT *et al.* 2006). Cette étude a également montré que la présence d'un peptide substrat induisait la dimérisation de la protéine, et que le peptide substrat se liait à l'interface du dimère via des résidus conservés (LEULLIOT *et al.* 2006). Il est intéressant de noter que malgré leur homologie limitée au niveau de la séquence en acides aminés, les structures obtenues pour les trois homologues sont parfaitement superposables.

1.5.7 Phénotypes associés à Rrd1

En plus de leur hypersensibilité au stress oxydatif, les souches de levure déficientes pour *RRD1* présentent bon nombre de phénotypes qui ne semblent pas être directement associés à la réponse au stress oxydatif. Ceci n'est pas étonnant si l'on

considère que les PP2A sont elles aussi impliquées dans un large éventail de processus cellulaires. D'ailleurs, les mutants de *RRD1* montrent des phénotypes semblables à ceux des souches mutantes pour des sous-unités des PP2A. Notamment, la délétion de *RRD1* provoque un défaut dans la morphologie du bourgeon, une distribution anormale de l'actine et des défauts de croissance (VAN HOOF *et al.* 2000; VAN HOOF *et al.* 2001). Finalement, les mutants pour *RRD1* présentent une très forte résistance à la rapamycine, un immunosuppresseur qui mime des conditions de carence nutritionnelle et qui a pour cible les kinases Tor dont il a été question précédemment (REMPOLA *et al.* 2000). Des études préliminaires conduites dans notre laboratoire ont démontré que les mutants de *RRD1* présentaient un patron transcriptionnel altéré en réponse à un traitement à la rapamycine (DOUVILLE *et al.* 2006). La prochaine section présente un survol de la voie de signalisation TOR et des effets de la rapamycine. Le rôle de Rrd1 dans la voie TOR est encore obscur, mais les chapitres 3 et 4 présentent deux articles qui permettent de comprendre un peu mieux le phénomène.

1.6 RAPAMYCINE ET VOIE DE SIGNALISATION TOR

1.6.1 Généralités

La voie de signalisation TOR représente une voie métabolique majeure régulant la croissance cellulaire en réponse aux changements de conditions dans l'environnement (ROHDE *et al.* 2001b). La voie TOR est activée lorsque les conditions de croissance sont optimales, et les cellules maintiennent un bon rythme de biogénèse des ribosomes, d'initiation de la traduction et d'importation des

nutriments. Lorsque les conditions sont défavorables, la voie est inhibée, provoquant la downrégulation de la synthèse des protéines en général, l'activation de plusieurs facteurs de transcription reliés aux stress et l'uprégulation de l'autophagie (WULLSCHLEGER *et al.* 2006).

La voie TOR est contrôlée par les kinases Tor1 et Tor2 chez la levure. Chez les mammifères, une seule protéine mTOR contrôle la voie. À ce jour, tous les génomes connus possèdent au moins un gène *TOR*, incluant les levures, les algues, les moisissures, les plantes, les vers, les mouches et les mammifères (WULLSCHLEGER *et al.* 2006). Les kinases Tor eucaryotes sont de grosses protéines (~280-290 kDa) et possèdent un domaine carboxy-terminal homologue au domaine catalytique des phosphatidyl-inositol 3-kinases (PI3K) (BJORNSTI and HOUGHTON 2004).

1.6.2 Découverte de la rapamycine

La rapamycine a été découverte dans les années 1970 lorsqu'on a trouvé une souche bactérienne, *Streptomyces hygroscopicus*, produisant un métabolite antifongique dans un échantillon de terre provenant de l'île de Pâques (Rapa Nui, en langage local). Suite à la purification, on a identifié le métabolite comme étant une lactone macrocyclique qu'on a appelé rapamycine d'après son lieu d'origine. La rapamycine est un antibiotique antifongique qui peut aussi agir comme un suppresseur du système immunitaire (DUMONT *et al.* 1990; VEZINA *et al.* 1975). On a aussi rapporté que la rapamycine possédait une activité anti-tumorale contre certaines tumeurs solides (HOUCHENS *et al.* 1983).

La cible cellulaire de la rapamycine a été identifiée à l'origine par des mutations qui conféraient la résistance à l'inhibition de croissance induite par la rapamycine chez la levure (HEITMAN *et al.* 1991). Cette étude a également démontré que la rapamycine nécessitait un cofacteur, la peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase FKBP12 (encodée par *FPR1* chez la levure) pour exercer son effet toxique. La rapamycine forme un complexe avec FKBP12, et ce complexe se lie à TOR et l'inhibe (HEITMAN *et al.* 1991).

1.6.3 Effets biologiques de la rapamycine

Chez la levure, le complexe rapamycine-Frp1 ainsi que des conditions de carence nutritionnelle inactivent les kinases Tor (HEITMAN *et al.* 1991). Ainsi, un traitement avec la rapamycine est souvent considéré comme mimant les conditions d'un milieu très pauvre (CRESPO and HALL 2002). Suivant l'inactivation des kinases Tor, Sit4, une des sous-unités catalytiques des PP2A, se dissocie de Tap42, ce qui a pour conséquence d'activer Sit4 (JIANG and BROACH 1999b). Sit4 activé déphosphoryle ensuite de nombreuses cibles, notamment Gln3, un activateur transcriptionnel, et la kinase Npr1 qui régule les perméases d'acides aminés comme Tat2 (SCHMIDT *et al.* 1998). L'inactivation des kinases Tor affecte également la distribution cellulaire de nombreux autres facteurs de transcription, comme Gat1, Msn2, Msn4 et Rtg1/3, mais de façon indépendante de Sit4 (BECK *et al.* 1999; SCHMELZLE *et al.* 2004). La complexité des effets de la rapamycine peut s'observer au niveau transcriptionnel. En effet, des études effectuées à l'aide de puces à ADN ont démontré qu'un traitement à la rapamycine induisait des changements important

dans le profil transcriptionnel de la levure (HARDWICK *et al.* 1999). Les principaux gènes affectés se situent dans les voies métaboliques du carbone et de l'azote, de la biosynthèse des ribosomes et du shift diauxique (HARDWICK *et al.* 1999). Ce patron transcriptionnel altéré montre que la cellule tend à réduire l'expression des gènes de biosynthèse des ribosomes et des gènes participant à l'uptake et au métabolisme des sources d'azote de prédilection (glutamine et ammonium) pour plutôt upréguler l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des sources d'azotes pauvres (urée et proline) (CRESPO and HALL 2002; HARDWICK *et al.* 1999). Le mécanisme global par lequel la rapamycine induit l'arrêt des cellules en G1 demeure cependant obscur.

1.6.4 Effets de la rapamycine sur la transcription

Bien qu'un traitement à la rapamycine bouleverse le patron transcriptionnel de la levure, peu de choses sont connues à ce jour sur les effets directs de cette drogue sur le mécanisme transcriptionnel comme tel. Il semble qu'un des modes d'action privilégiés de la rapamycine soit via la translocation du cytoplasme vers le noyau de facteurs de transcription spécifiques (CRESPO and HALL 2002). Également, il semble que la voie TOR agisse au niveau de la demi-vie des ARNm en accélérant leur turnover (ALBIG and DECKER 2001). Cependant, étant donné le nombre considérable de gènes qui sont affectés par un traitement à la rapamycine (710 ORF), d'autres mécanismes de modulation de la transcription sont sans doute impliqués (HARDWICK *et al.* 1999). L'article présenté au chapitre 4 de cette thèse propose un nouveau

modèle pour l'action potentielle de la rapamycine sur la transcription par l'ARN pol II.

1.7 MISE EN CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE

Le but initial de mon projet de recherche était de mieux comprendre les fonctions cellulaires de l'activateur de phosphatase Rrd1 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, puisque cette protéine semblait jouer un rôle essentiel dans la réparation de l'ADN de même que dans la transcription. Parmi les articles publiés dans la littérature sur Rrd1 et Ptpa, aucun ne permettait de déterminer un rôle pour Rrd1 dans ces deux mécanismes fondamentaux pour la cellule. Nous avons choisi d'utiliser le modèle de la levure puisque tout comme Rrd1, les mécanismes de transcription et de réparation de l'ADN sont extrêmement bien conservés. De plus, le temps de génération est relativement court et la génétique de la levure est beaucoup plus facile à manipuler que celle des eucaryotes supérieurs.

En se basant sur le rôle potentiel de Rrd1 comme activateur de phosphatase et aussi sur des résultats préliminaires suggérant un rôle pour Rrd1 dans la régulation de la transcription, nous avons donc élaboré un projet qui permettrait de découvrir la fonction cellulaire de Rrd1. Nous nous sommes principalement attardés aux mécanismes cellulaires dans lesquels Rrd1 est impliqué, puisque plusieurs articles sont disponibles concernant la biochimie de Rrd1. Les chapitres suivants présentent les trois articles que nous avons publiés à ce sujet, et permettent une meilleure compréhension du rôle global de Rrd1.

Chapitre 2

Article 1

The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator protein, yPtpa1/Rrd1, interacts with Sit4 phosphatase to mediate resistance to 4-nitroquinoline-1-oxide and UVA.

Julie Douville, Jocelyn David, Pierre-Karl Fortier et Dindial Ramotar

Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415 de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada, H1T 2M4

Université de Montréal

ARTICLE PUBLIÉ DANS *CURRENT GENETICS* (2004) 46 : 72-81

2 ARTICLE #1

2.1 CONTRIBUTION PERSONNELLE

Cet article comprend les résultats obtenus par J. Douville, P.-K. Fortier, J. David et D. Ramotar. Au niveau de la planification et du design des expériences, j'évalue ma contribution à 50%. Au niveau de la réalisation des expériences, ma contribution a également été de 50%. Au niveau de la rédaction de l'article, ma contribution a été de 80% et pour ce qui est des corrections subséquentes, ma contribution a aussi été de 80%.

2.2 ABSTRACT

We previously reported the isolation of mutants hypersensitive to the genotoxic agent 4-nitroquinoline-1-oxide, a potent inducer of oxidative stress. One of the mutants was defective in a gene designated *yPTPA1*, encoding a protein related to the human phosphotyrosyl phosphatase activator hPTPA, that is believed to play a role in activating the serine/threonine phosphatase PP2A. Yeast *ytpa1* Δ mutants are also sensitive to the UVA component of sunlight known to produce reactive oxygen species, suggesting a role for yPtpa1 in oxidative stress response. We now report the characterization of another 4-nitroquinoline-1-oxide-sensitive mutant, EBY20. We show that this mutant is defective in the *SIT4* gene encoding a catalytic subunit of the PP2A phosphatases, and that *sit4* Δ mutants exhibited hypersensitivities to 4-nitroquinoline-1-oxide and UVA, but not to 254nm UVC. Like the *ytpa1* Δ mutants, *sit4* Δ mutants were also defective in the repair of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced DNA lesions. Genetic analysis revealed that both yPtpa1 and Sit4 function in the same pathway to protect cells against the lethal effects of 4-nitroquinoline-1-oxide and UVA. Moreover, we demonstrate that yPtpa1-affinity columns specifically retained Sit4, confirming a previous report that these two proteins indeed belong to a complex. Cellular localization studies using GFP tagged proteins revealed that yPtpa1 is localized to the cytoplasm and the nucleus, while the Sit4 protein showed an intense staining spot in the cytoplasm, as well as diffused staining in this organelle. We suggest that the yPtpa1-Sit4 complex may participate in a novel

mechanism that mediates repair of oxidative DNA damage caused by 4-NQO and UVA.

2.3 INTRODUCTION

The model carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) has been widely employed in mammalian systems as a paradigm for DNA damage-induced carcinogenesis. To exert its neoplastic effect, 4-NQO must first undergo metabolic activation to the proximate carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4-HAQO), which reacts with DNA to form stable quinoline-purine monoadducts (Galiegue-Zouitina, et al. 1986; Sugimura, et al. 1968; Tada 1976). In bacteria, yeast, and mammalian cells, these genotoxic “bulky” DNA lesions are processed largely by the nucleotide excision repair (NER) pathway, which recognizes and creates two incisions, i.e., on either side of the DNA strand containing the helix-distorting lesion, to create a gap (Hoeijmakers 1993; Prakash, et al. 1993). This single-stranded gap is restored to the original double stranded form by DNA polymerase. The 4-NQO-induced “bulky lesion” is removed in a manner analogous to classical dipyrimidine photoproducts generated by the model DNA damaging agent 254nm ultraviolet (UV) light (Hoeijmakers 1993; Prakash, et al. 1993). Thus, mutants deficient in NER are hypersensitive to the genotoxic effects of 254nm UV, as well as 4-NQO (Hoeijmakers 1993; Prakash, et al. 1993).

A few studies clearly demonstrated that 4-NQO, unlike 254nm UV, can generate a substantial degree of intracellular oxidative stress (Demple and Amabile-Cuevas 1991; Nunoshiba and Demple 1993; Felkner and Kadlubar 1968). It was shown that 4-NQO is a potent inducer of the *E. coli* soxR/S regulon that responds to intracellular superoxide imbalances: SoxR is activated by

superoxide anion and triggers the expression of the transcriptional activator SoxS, which in turn induces the expression of several proteins including the DNA repair enzyme endonuclease IV (Dempfle and Amabile-Cuevas 1991; Nunoshiba and Dempfle 1993). It is believed that 4-NQO undergoes redox cycling to produce superoxide anion, which can be further converted into genotoxic reactive oxygen species (e.g., singlet oxygen and hydroxyl radicals) that engender modified bases and DNA strand breaks (Nunoshiba and Dempfle 1993; Yamamoto, et al. 1993; Kohda, et al. 1986; Ruiz-Laguna, et al. 1994).

In order to understand how eukaryotic cells respond to 4-NQO-induced oxidative DNA damage, we exploited *Saccharomyces cerevisiae* to isolate mutants exhibiting hypersensitivity to the cytotoxic effects of 4-NQO, but not to 254nm UV (Ramotar, et al. 1998). This approach led to the isolation of five mutants, EBY1, EBY10, EBY20, EBY30, and EBY40 that were sensitive to 4-NQO (Ramotar, et al. 1998). We previously characterized one of the mutants, EBY1 and demonstrated that it is defective in a gene designated *yPTPA1*, as it encoded a protein sharing 40% identity with the human phosphotyrosyl phosphatase activator, hPTPA (CAYLA *et al.* 1994a)(Ramotar, et al. 1998). hPTPA was isolated as a protein that stimulates the phosphotyrosyl phosphatase activity of the mammalian serine/threonine phosphatase PP2A, suggesting that *yPtpa1* may act in yeast to activate a phosphatase (Cayla, et al. 1994; Ramotar, et al. 1998).

Yeast cells devoid of yPtpa1 display several phenotypes, such as sensitivity to UVA and enhanced mutations, which are associated with a defect in the repair of oxidative DNA lesions (Ramotar, et al. 1998). However, the phosphatase implicated in this process was not previously defined. In this study, we report the characterization of strain EBY20 from our 4-NQO sensitive mutant collection, and demonstrated that this mutant is defective in the *SIT4* gene encoding a catalytic subunit of the PP2A family of Ser/Thr phosphatases (Stark 1996). Deletion of the *SIT4* gene in either a parent strain or a *yptpa1* Δ mutant, resulted in *sit4* Δ single and *yptpa1* Δ *sit4* Δ double mutants, respectively, that displayed the same level of sensitivity to 4-NQO and UVA. This genetic data strongly suggests that yPtpa1 and Sit4 function in the same pathway to mediate protection against 4-NQO- and UVA-induced cell death. Using affinity columns, we showed that Sit4 indeed interacts with yPtpa1 consistent with the observation of a previous study (Mitchell and Sprague 2001). We believe that one of the functions of yPtpa1-Sit4 complex is to modify a target protein that allows repair of 4-NQO and UVA-induced DNA lesions.

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Strains and media, and transformation

The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. Yeast cells were grown at 30°C in either YPD, or minimal synthetic (SD) medium (Guthrie and Fink 1991; Sherman, et al. 1983). Nutritional supplements (20 µg/ml) were added as required. Yeast cells were transformed by the lithium-acetate method (Gietz, et al. 1992). The *E. coli* strain DH5α was used for plasmid maintenance and grown in Luria Broth (Sambrook, et al. 1989).

2.4.2 Cloning and recombinant DNA techniques

The defective gene in strain EBY20 was cloned using a previously described protocol (Ramotar, et al. 1998). Plasmid DNA purification, DNA cloning and transformation of *E. coli* competent cells were done according to Sambrook *et al.* (1989). DNA fragments were sequenced using the dideoxynucleotide chain termination method (Sanger, et al. 1977).

2.4.3 Plasmids to express native and fusion proteins

pEB1 and pEB2 are single and multicopy plasmids carrying the *yPTPA1* gene, respectively (Ramotar, et al. 1998), and pSIT4-1 and pSIT4-2 are single and multicopy plasmids carrying the *SIT4* gene (provided by Kim Arndt, NJ., USA). Plasmids to express GFP-Sit4, GFP-yPtpa1, GFP-Rad52, HIS-yPtpa1, lip1-HA, and

Sit4-HA fusion proteins were created as follows: The *SIT4*, *yPTPA1*, and *RAD52* genes were amplified from the start codon to the 200-bp sequences downstream of the stop codon and bearing the restriction enzymes *EcoRI* and *Sall* (Vongsamphanh, et al. 2001). Each gene was digested with *EcoRI* and *Sall* and the DNA fragment cloned adjacent to the *GFP* gene, which is under the control of the *GALI* promoter in the yeast expression vector pYES2.0. This resulted in the following plasmids pGFP-SIT4, pGFP-yPTPA1, and pGFP-RAD52. The plasmid pGFP-IMP2 was created previously by the same strategy (Vongsamphanh, et al. 2001). Using the same approach, a HIS tag was placed at the N-Terminal end of *yPTPA1* (Wang and Ramotar 2002).

The IIP1-HA fusion was obtained by amplifying by PCR the *YLR368* gene (-30 to +1794) from genomic DNA using the primer YLR368-F4-*KpnI* (5'-CGGTATTAGTTACTAAA AGGTACCCATATACATG-3') bearing a *KpnI* restriction site (underlined) and the primer YLR368-R5-*XbaI* (5'-CAAGCTTCTAGActa**AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT***ATAAATTATGTAAAGGCTGTTTCATC*-3') bearing a *XbaI* restriction site (underlines), a stop codon (lower case), a coding sequence for the HA epitope (bold) and the 3' part of the *YLR368* gene (italic). The PCR fragment was then cloned in the pYES2.0 vector (Invitrogen) using the *KpnI* and *XbaI* restriction enzymes. This produced a plasmid pIIP1-HA to express Iip1-HA fusion protein under the control of a *GALI* promoter. The plasmid YEpLEU2ADH+SIT4-HA to produce Sit4-HA fusion protein was kindly provided by G. Sprague, OR, USA.

2.4.4 Gene disruption

Deletion of the *SIT4* and *yPTPA1* genes in the indicated strain was carried out by one-step gene targeting using universal upstream and downstream primers, as previously described (Goldstein, et al. 1999). These primers contain 45 nucleotides corresponding to the targeted gene and 20 nucleotides matching the universal regions present in a set of selective marker genes including *HIS3*, *URA3*, *TRP1*, and *LEU2* (Brachmann, et al. 1998).

2.4.5 Survival curves and alkaline sucrose density gradients

These analyses were performed as previously described (Leduc, et al. 2003; Ramotar, et al. 1998).

2.4.6 Preparation of total protein extracts

Strains (5 ml) were cultured in minimal media overnight at 30°C containing 2% raffinose instead of dextrose. The next day, 0.5% galactose was added to the culture to induce expression of the indicated fusion protein. The culture was centrifuged for 2 min at 4,000 xg and washed with water. The cell pellet was transferred into a 0.5 ml eppendorf tube and washed once more with 300µl of water, followed by centrifugation for 2 min at 4, 000 rpm in an eppendorf centrifuge at ambient temperature. The supernatant was removed and 200µl of yeast extraction buffer (buffer A, 50mM Tris-HCl, 5% glycerol, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM DTT, 1 µg/ml aprotinin and 0.5 µg/ ml leupeptin), and a volume of

200µl of glass beads were added to the pellets. The tubes were placed on ice for 5 min and then total protein extract was prepared using a mini-beadbeater (Zymotex, Montreal, Canada). Cells were burst 5 times for 20 sec at 5,000 rpm with 1 min intervals on ice. The extracts were centrifuged at 3,000 rpm in an eppendorf centrifuge at 4°C for 5 min and the supernatants were kept on ice. Large scale extracts were prepared in a similar manner, except using 1 liter culture (Vongsamphanh, et al. 2001).

2.4.7 Phenyl-sepharose and Talon columns to assess protein-protein interaction

The phenyl-sepharose column was done as previously described with minor modifications (Vongsamphanh, et al. 2001). The phenyl-sepharose slurry (1 ml, Pharmacia) was washed three times in eppendorf tubes with 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in buffer A and transferred to a 2 ml column (Bio-Rad), followed by the addition of 1 mg of protein extract containing the GFP fusion protein of interest equilibrated to 1.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. After 30 min incubation at room temperature (RT), the column was washed three times with 2 ml of buffer A before adding 1 mg of crude extract derived from strains expressing the indicated HA fusion protein. The column was then retained for 1 h at RT. Finally, the column was washed with 2 ml (three times) of buffer A to eliminate non-specific interaction and the beads were directly analysed by Western blotting.

For analysis of protein-protein interaction by the Talon metal affinity resin (Clontech), 400 µl of matrix slurry was placed in a plastic disposable 10 ml-gravity

flow column (BioRad). The resin was equilibrated with 10 ml of buffer B (50 mM sodium phosphate (pH 7.0) and 300 mM NaCl). At least 100 mg of total protein derived from strain BY4741 (*yptpa1* Δ) expressing the HIS-*yPtpa1* protein His-*ptpa* was then incubated with the resin for 30 min at RT with gentle shaking. The column was washed with 30 ml of buffer B followed by the addition of 100 mg of total protein extract derived from strain BY4741 (*yptpa1* Δ) expressing either GFP-tagged Sit4 or Rad52, and incubation for 1 h at RT. The column was washed with 30 ml of buffer A and a sample of the resin was kept for Western blot analysis. Bound material was eluted into 5 fractions (150 μ l each) with buffer B containing 150 mM imidazole. Each fraction (20 μ l), as well as the beads after elution, was analyzed by Western blot.

2.4.8 Immunoblotting

For Western analysis, the monoclonal anti-GFP (Clontech) and anti-HA and anti-HIS antibodies (Santa Cruz) were used at a dilution of 1:5000 in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)-150 mM NaCl-5% powdered milk (Gershoni and Palade 1983). Ten ml of this mixture was used to probe nitrocellulose blots (8 by 10 cm) overnight at 4°C. Anti-mouse secondary antibodies were used at a dilution of 1:5000 and detected by the enhanced chemiluminescence system (Dupont, NEN).

2.4.9 Fluorescence microscopy

Cells were grown to a density of 2×10^8 cells/ml. Expression of the GFP fusion protein was induced for 4 h by addition of 0.5% galactose in the media. Samples were taken after 30, 60, 120 and 180 minutes in order to assess for degradation by standard Western blot procedures using 1:5000 dilution of anti-GFP. For propidium iodine staining, after induction cells were fixed in 1% formaldehyde and treated with 1 mg/ml of RNase A overnight. Cells were washed 4 times and resuspended in 5 μ g/ml propidium iodine. After 15 minutes incubation, cells were washed once and resuspended in PBS. Cellular localization and nuclear staining were observed using 3 μ l of cells mounted on microscope slides for fluorescent microscopy. Cells were photographed at 100 times magnification by imaging camera (Retiga GX 32-002TB-303) attached to a Leica DMRE immunofluorescent microscope and images were processed by the MacIntosh OpenLab program.

Table 1: List of yeast strains

Strains	Genotype	Source
DBY747	<i>MATa, leu2-3, 112, trp1-289a, ura3-52, his3-Δ1, canR, gal2</i>	This laboratory
CY4029	W303 background, SSD1-v1, <i>MATa; ade2-1; can1-100; his3-11, 15; leu2-3, 112; trp1-1; ura3-1</i>	K. Arndt
SY3675	<i>MATa, ade2, ade8, leu2, ura3, his3, trp1, NCS1, SIT4</i>	G. Sprague
BY4741	<i>Mat a, his3-1, leu2-0, met15-0, ura3-0</i>	C. Roberts
BY4741 (<i>ytpa1Δ</i>)	Isogenic to BY4741, except <i>ytpa1Δ::LEU2</i>	This study
EBY1	Isogenic to DBY747, except <i>ytpa1Δ::LEU2</i>	Ramotar et al., 1998
EBY20	Isogenic to DBY747, except carrying an allele of <i>SIT4</i>	Ramotar et al., 1998
CY3938	Isogenic to CY4029, except <i>sit4Δ::HIS3</i>	K. Arndt
SY3677	Isogenic to SY3675, except <i>sit4Δ::HIS3</i>	G. Sprague
DRY500	Isogenic to CY4029, except <i>ytpa1Δ::LEU2</i>	This study
DRY501	Isogenic to CY4029, except <i>ytpa1Δ::LEU2 sit4Δ::HIS3</i>	This study

2.5 RESULTS

2.5.1 Phenotypic characterization of strain EBY20

We previously isolated several recessive mutants that were hypersensitive to 4-NQO, but not to 254 nm UVC (Ramotar, et al. 1998). One of the mutant strains EBY20, displayed nearly the same sensitivity to 4-NQO and UVA as a mutant we previously reported to be defective in the *yPTPA1/RRD1* gene (herein referred to as *yPTPA1*) (Fig. 1, shown only for 4-NQO). Further phenotypic analysis revealed that strain EBY20 was no more sensitive to the DNA damaging agents methyl methane sulfonate, bleomycin, and cisplatin when compared to the parent strain DBY747 (data not shown). It is noteworthy that similar findings were observed for the *yptpal*Δ mutant (Ramotar, et al. 1998). Furthermore, the 4-NQO or UVA sensitivity of strain EBY20 was not rescued by a plasmid pEB1 bearing the entire *yPTPA1* gene (Fig. 1). Taken together, these data suggest that strain EBY20 may harbor a defect in a gene other than *yPTPA1*.

We previously showed that the sensitivity of the *yptpal*Δ mutant to 4-NQO was related to a defect in the repair of damaged DNA (Ramotar, et al. 1998). We therefore examined if strain EBY20 displayed a similar defect in the repair of 4-NQO-induced DNA lesions. To perform this experiment, the parent and the mutant strain EBY20 were either untreated or treated with increasing concentrations of 4-NQO. The chromosomal DNA was then extracted from these strains and analyzed

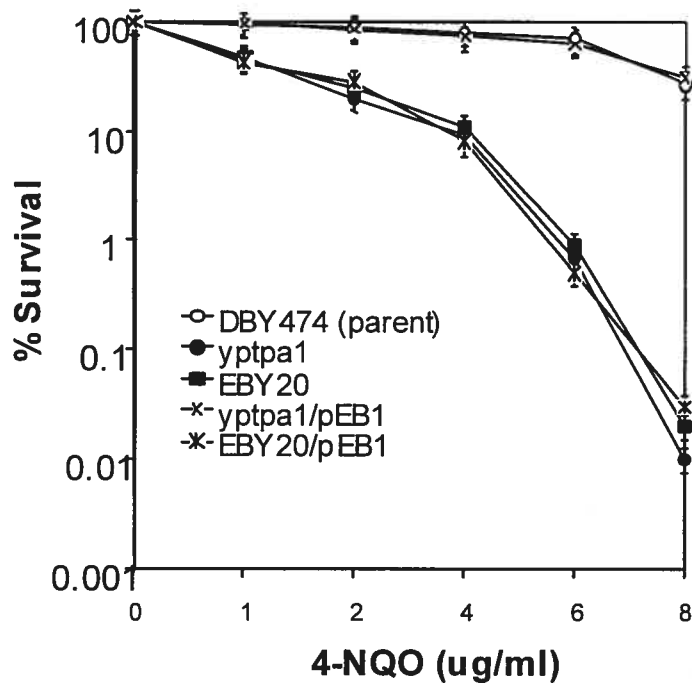


Figure 1: Sensitivities of *S. cerevisiae* parent and mutant strains to 4-NQO.

Exponentially growing cells (OD₆₀₀ ~1.0) were treated with increasing concentrations of 4-NQO in SD medium incubated at 30°C for 1 h in an orbital shaker (300 rpm). The cells were diluted, plated on YPD solid medium, and scored for survivors after 3 days of growth at 30°C. Plasmid pEBY1 harbors the *yPTPA1* gene on the single copy vector YCp50. The data represent the average of three independent experiments.

on alkaline sucrose density gradients, which readily detect strand breaks, as well as the alkali labile AP sites in damaged DNA (Ramotar, et al. 1998). In this type of analysis, high molecular weight or undamaged DNA is present in the bottom of the gradient, whereas lower molecular weight or heavily damaged DNA remains at the top of the gradient. Results from this analysis revealed that strain EBY20 showed a steady and rapid decrease in the recovery of the high molecular weight DNA following exposure to increasing concentrations of 4-NQO, as compared to the parent (Fig. 2A). A concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 4-NQO for 1 h reduced the recovery of the high molecular weight DNA from strain EBY20 to $\sim 60\%$ (Fig. 2). In contrast, the same dose of 4-NQO allowed nearly full recovery of the DNA from the parent strain (Fig. 2A). The decreased recovery of high molecular weight DNA from strain EBY20 mutant following exposure to 4-NQO was accompanied by a parallel increase in low molecular weight DNA (Fig. 2B). These data suggest that the decreased recovery of high molecular weight DNA in strain EBY20 might be due to increasing levels of DNA fragmentation caused by 4-NQO, and that this mutant harbors a defect in the repair of 4-NQO-induced DNA lesions.

2.5.2 Strain EBY20 is rescued by the *SIT4* gene

To identify the gene that complemented the defect of strain EBY20, a yeast genomic DNA library constructed on a single copy vector bearing the selection marker *URA3* was introduced into the strain. The resulting Ura^+ transformants ($\sim 70,000$) were replica plated onto minimal medium plates containing 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 4-NQO, a concentration that permits growth of the parent strain, but not strain EBY20

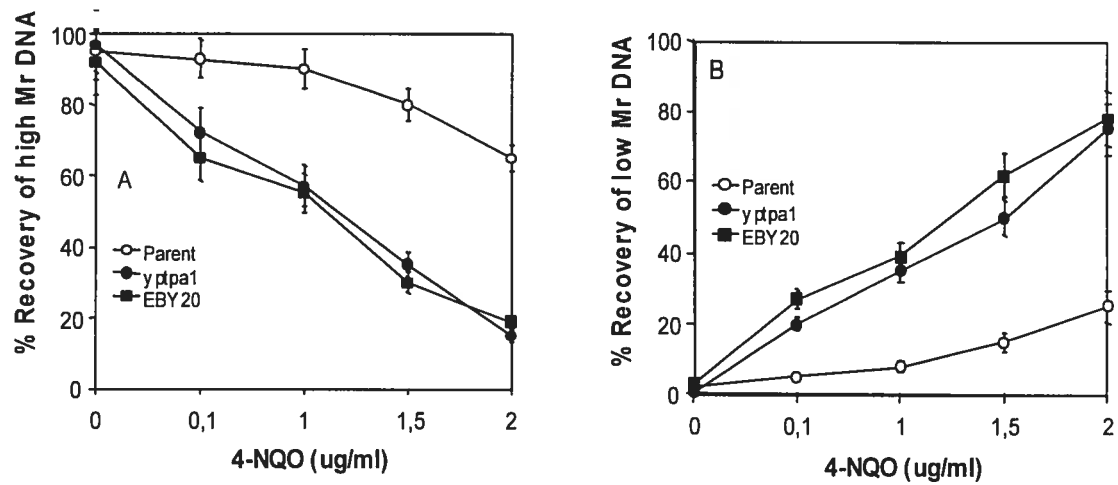


Figure 2: Strain EBY20 sustains increased DNA fragmentation upon exposure to 4-NQO.

The exponentially growing parent strain DBY747 and the isogenic EBY20 mutant strain were treated with increasing concentration of 4-NQO, followed by the isolation of chromosomal DNA, and analysis by alkaline sucrose density gradient (see Materials and Methods). Panel A and B, high or low molecular weight (Mr) DNA in the bottom or top of the gradient, respectively, was recovered following 4-NQO treatment and expressed as a percentage of the total DNA. The data were derived from two independent experiments.

(Ramotar, et al. 1998). This screening approach revealed two positive Ura3⁺ colonies that grew on the 4-NQO-drug selection plate. Plasmid extraction and DNA sequence analysis revealed that both Ura3⁺ colonies contained the same genomic DNA fragment bearing several genes. Among these genes, only *SIT4* was deemed interesting as it encodes a serine /threonine phosphatase belonging to the PP2A phosphatase family, which could be defective in strain EBY20. Moreover, it could be the phosphatase that functions with yPtpa1.

2.5.3 The *sit4*Δ mutant is sensitive to 4-NQO and UVA

To assess if Sit4 plays a role in 4-NQO and UVA resistance, we tested another parent strain CY4029 and its isogenic *sit4*Δ mutant for sensitivity towards these agents. As shown in Fig. 3A and B, the *sit4*Δ mutant was 6- and 5-fold more sensitive to 4-NQO and UVA, as compared to the parent, respectively. Like the *yptpa1*Δ mutant, the *sit4*Δ showed no sensitivity to 254nm UVC (Fig. 3C).

Analogous phenotypes were observed if the *SIT4* gene was deleted in other parental strain backgrounds (e.g., BY4741). Introduction of a single copy plasmid pSIT4-1 bearing the entire *SIT4* gene restored 4-NQO and UVA resistance to either strain EBY20 (data not shown) or the *sit4*Δ mutant (Fig. 3). These data strongly suggest that Sit4, like the yPtpa1 protein, is involved in protecting cells against the lethal effects of 4-NQO and UVA.

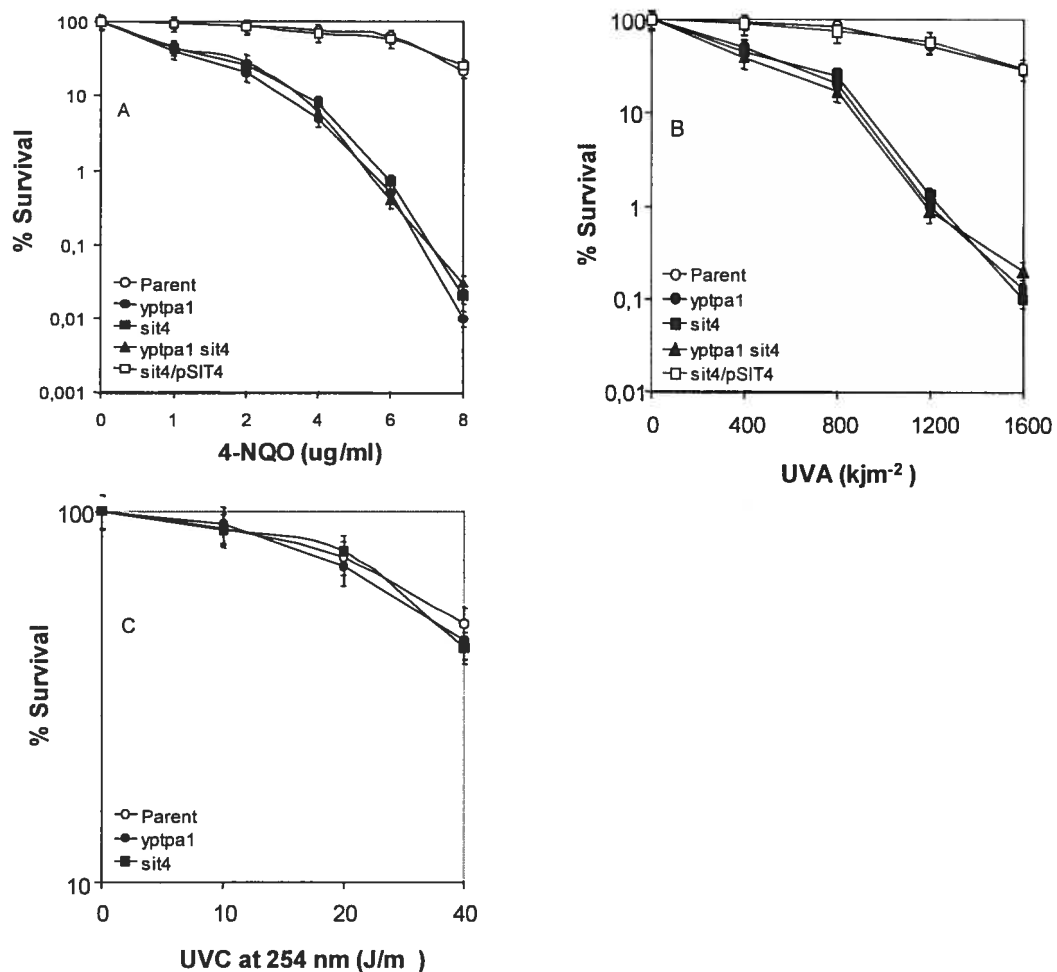


Figure 3: *S. cerevisiae* mutants defective in the *SIT4* phosphatase gene exhibits hypersensitivity to 4-NQO and UVA.

The exponentially growing parent CY4039 and the isogenic mutant strain (shown by the defective gene(s)) were treated with either 4-NQO (panel A), UVA (panel B), or 254 nm UVC (panel C). The cells were diluted, plated on YPD solid medium, and scored for survivors after 3 days of growth at 30°C. Plasmid pSIT4 harbors the *SIT4* gene on the single copy vector YCp50. The data represent the average of three independent experiments.

2.5.4 Sit4 genetically interacts with yPtpa1

The phenotypic similarities that exist between the *sit4Δ* and *yptpa1Δ* mutants suggest that the Sit4 and yPtpa1 proteins may function in a common pathway. To test this, a parent strain (CY4029) and three isogenic mutant strains, the single mutants *sit4Δ* and *yptpa1Δ*, and the double mutant *sit4Δ yptpa1Δ*, were analyzed for sensitivity towards 4-NQO and UVA. While the *sit4Δ* and the *yptpa1Δ* single mutants displayed nearly the same sensitivity to 4-NQO and UVA, the *sit4Δ yptpa1Δ* double mutant was no more sensitive to 4-NQO or UVA than either of the single mutants (Fig. 3A and B). This data strongly suggests that both Sit4 and yPtpa1 may belong to the same genetic pathway. We next tested if a multicopy plasmid pSIT4-2 designed to overproduce Sit4 could substitute for the yPtpa1 deficiency. Introduction of pSIT4-2 into the *sit4Δ yptpa1Δ* double mutant conferred no resistance to 4-NQO (data not shown). Likewise, overproduction of yPtpa1 did not prevent 4-NQO-induced cell death of the *sit4Δ yptpa1Δ* double mutant (data not shown). These results suggest that the functions of both proteins are essential for mediating resistance to 4-NQO.

2.5.5 Sit4 physically interacts with yPtpa1

The above data suggest that Sit4 role in 4-NQO and UVA response may be dependent on the presence of yPtpa1. During the course of our study, Mitchell and Sprague (2001) re-isolated *yPTPA1* as a defective gene (*NCS1*) that caused synthetic lethality with a mutant lacking the Cla4 kinase. The authors also demonstrated that yPtpa1/Ncs1 interacts with Sit4 using immunoprecipitation assay (Mitchell and Sprague 2001). We therefore used an entirely different approach to test if Sit4 and yPtpa1 indeed physically interacts. In this experiment, a plasmid pGFP-yPTPA1 was designed to produce a functionally active GFP-yPtpa1 fusion protein under the control of the galactose inducible promoter *GAL1* in yeast (see Fig. 5A below). The GFP-yPtpa1 fusion protein was attached to a hydrophobic column to serve as an affinity step to examine for binding of the Sit4 protein, which is tagged on the C-terminal end with HA (see Materials and Methods). When total cell extracts derived from a strain expressing the Sit4-HA fusion protein was loaded onto the GFP-yPtpa1 affinity column and washed, the column matrix was found to retain the Sit4-HA protein as determined by Western blot analysis probed with monoclonal antibody against the hemagglutinin tag (Fig. 4A). A control protein Iip1 (tagged with HA), which interacts with the transcriptional co-activator Imp2 (P-K. F and D.R., unpublished data), did not bind to the GFP-yPtpa1 column, but to a column consisting of GFP-Imp2 (Fig. 4A, lane 5). In a parallel approach, another affinity column (Talon) consisting of HIS tagged yPtpa1 was capable of retaining GFP-Sit4, but not GFP-Rad52 (a nuclear protein involved in homologous recombination) (Fig. 4B, lane 2 vs.1). In control experiments, the Talon column without any HIS-yPtpa1 did not

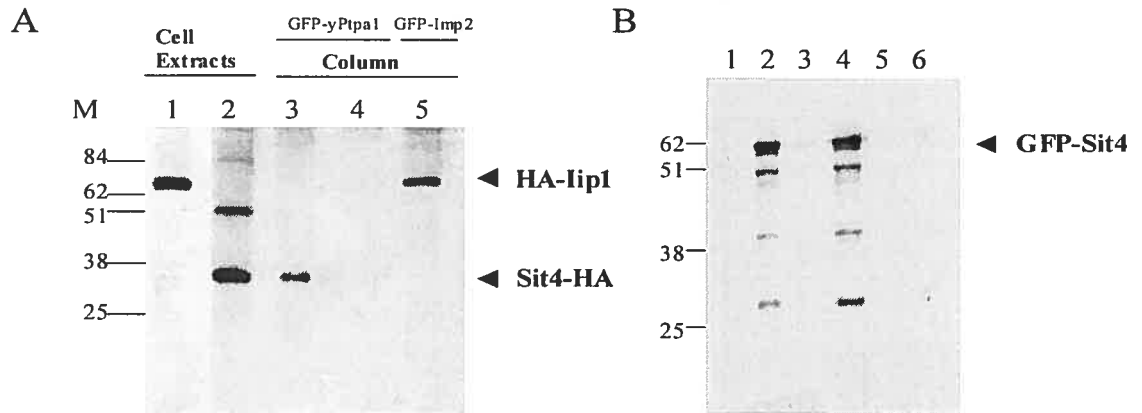


Figure 4: Sit4-yPtp1 interaction detected by affinity columns.

Panel A, Western blot analysis showing retention of Sit4-HA by GFP-yPtp1 affinity column. Lane 1, total cell extract derived from strain BY4741 expressing HA-Iip1; lane 2, total extracts derived from strain BY4741 expressing Sit4-HA; lanes 3 and 4, Sit4-HA and HA-Iip1 extracts loaded onto separate columns containing GFP-yPtp1, respectively; and lane 5, HA-Iip1 extract loaded onto a phenyl agarose column containing GFP-Imp2. Following extensive washing of the columns, the matrices were directly loaded on SDS gels and probed with anti-HA antibodies. Panel B, Western blot analysis showing retention of GFP-Sit4 by HIS-yPtp1 affinity column. Total cell extracts derived from strain BY4741 expressing either GFP-Rad52 or GFP-Sit4 were loaded onto separate Talon metal affinity columns prebound with HIS-yPtp1, washed extensively, and an aliquot of the matrices loaded on SDS gel followed by Western blot analysis probed with anti-GFP antibodies (lanes 1 and 2, respectively). Following washing the matrix-bound proteins were eluted with imidazole and an aliquot analyzed (lanes 3 and 4). Following elution, an aliquot of each matrix was analyzed (lanes 5 and 6).

retain the GFP-Sit4 protein, clearly indicating that binding of GFP-Sit4 to the Talon column requires yPtpa1. We conclude from these observations, which are consistent with a previous report (Mitchell and Sprague 2001), that Sit4 is physically associated with yPtpa1.

2.5.6 yPtpa1 and Sit4 share cellular compartment

The interaction of Sit4 and yPtpa1 suggests that both proteins may be localized in the same cell compartment. We therefore examined the cellular location of yPtpa1 and Sit4 and whether the distribution of these proteins is altered in response to 4-NQO exposure. To visualize the cellular location of yPtpa1 and Sit4, the proteins were tagged at the N-terminal end with GFP and placed under the control of the galactose inducible promoter *GALI* (see Materials and Methods). Both fusion proteins were expressed at the expected size and showed time-dependent induction when galactose was present in the media (Fig. 5A). In addition, GFP-yPtpa1 was expressed at a much higher level than GFP-Sit4 suggesting that the level of the latter protein might be tightly controlled in the cell (Fig. 5A)(Baharians and Schonthal 1998). Nonetheless, both fusion proteins GFP-yPtpa1 and GFP-Sit4 were functionally active, as they conferred 4-NQO resistance to the respective null mutants, that is, *yptpa1*Δ and *sit4*Δ, respectively (data not shown).

To examine the cellular location of GFP-yPtpa1 and GFP-Sit4, the parent strain BY4741 carrying the indicated plasmids was induced for 4 h to express the GFP-fusion proteins and then processed for fluorescent microscopy. The data

revealed that GFP-yPtpa1 was present mostly in the cytoplasm and that some of the protein was also localized to the nucleus (Fig. 5B). In contrast, the GFP-Sit4 protein showed a very intense cytoplasmic spot, as well as a diffuse staining throughout this organelle (Fig. 5B). The bright GFP-Sit4 spot in the cytoplasm could be the result of protein aggregation. However, this potential aggregation was not related to the degradation fragments observed after 4 hr induction in galactose (Fig. 5A), as the spot was also observed at shorter induction time (1 h) when there was no detectable degradation product (Fig. 5A, and data not shown). In these experiments, GFP-Rad52 was used as a control to monitor protein distribution in the nucleus. Thus, the localization of GFP-yPtpa1 and GFP-Sit4 to the cytoplasm suggests that the complex may mediate its function in this organelle.

We next examined if the cellular distribution of either GFP-yPtpa1 or GFP-Sit4 is affected when one partner is absent in the complex. Expression of GFP-yPtpa1 in a *sit4* Δ mutant showed the same cellular location as in the parent strain (data not shown). Likewise, GFP-Sit4 showed no alteration in cellular distribution in the *yptpa1* Δ mutant when compared to the parent (data not shown), suggesting that the cellular distribution of yPtpa1 or Sit4 is not dependent on the presence of the corresponding partner. Moreover, we found no evidence for alteration in cellular distribution or expressed amount or pattern of mobility of either GFP-yPtpa1 or GFP-Sit4 when cells were exposed to 4-NQO (data not shown). Thus, it would appear that 4-NQO treatment does not bring about any detectable changes to either yPtpa1 or Sit4. However, we have not exhaustively tested if other conditions exist to alter, for example, cellular distribution of these two proteins.

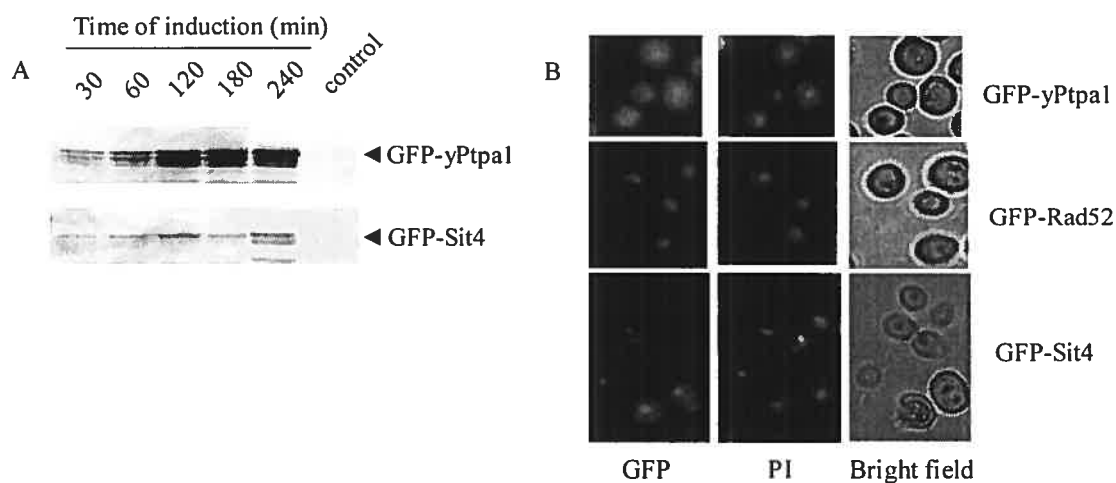


Figure 5: Expression and cellular location of GFP-yPtpa1 and GFP-Sit4 in yeast.

Panel A, the parent strain BY4741 carrying either the plasmid pGFP-yPTPA1 or pGFP-SIT4 was grown overnight in 2% raffinose SD medium followed by the addition of 0.5% galactose for the indicated time. Extracts were prepared and 50 μ g analyzed by Western blots probed with anti-GFP monoclonal antibodies. Control, extracts derived from the parent without any plasmid. Panel B, cellular distribution of GFP-yPtpa1, GFP-Sit4, and GFP-Rad52. Strain BY4741 expressing either GFP-yPtpa1, GFP-Sit4, or GFP-Rad52 was grown as in panel A and GFP-fusion protein induced for 4 h before processing for fluorescent microscopy (see Materials and Methods). GFP-Rad52 was used as a control to indicate nuclear localization. GFP, green fluorescent protein; and PI, propidium iodide to stain the nuclear DNA.

2.6 DISCUSSION

In this study, we demonstrated that yPtpa1 and Sit4 genetically and physically interact to execute a function in a pathway that protects yeast cells from the genotoxic effects caused by 4-NQO and UVA. Sit4 is a catalytic subunit that belongs to a family of conserved Ser/Thr protein phosphatases, PP2A (Stark 1996). This family also consists of several other catalytic subunits including Pph3p, Pph21p, Pph22p, and Ppg1p (Stark 1996). A given catalytic subunit together with a regulatory subunit A (Tpd3) and a variable subunit B (e.g. Cdc55 and Rts1) constitute a functional trimeric holoenzyme (Shu, et al. 1997; Zhao, et al. 1997). Thus, the various combinations of catalytic, regulatory, and variable subunits can result in a multitude of holoenzymes that are involved in diverse cellular functions including cell growth, cell cycle regulation, and signal transduction (Stark 1996). It is noteworthy that the variable subunit is believed to confer upon the trimeric holoenzyme its specific biological function and cellular distribution (Wera and Hemmings 1995). As such, we envision that yPtpa1 may associate with Sit4 to perform a function in DNA repair.

Previous studies demonstrated that Sit4 also interacts with at least three other proteins designated Sap190, Sap185, and Sap155 (for Sit4 associated protein) (Luke, et al. 1996). These three Sap proteins shared sequence identity at the amino acid level, as well as with a fourth protein Sap4 that has not been yet isolated as a Sit4 associated partner (Luke, et al. 1996). The Sap proteins, e.g., Sap190-185 and Sap155, compete with each other to form separate complexes with Sit4, and in the absence of Sit4, these proteins are hyperphosphorylated (Luke, et al. 1996). Cells

lacking all four Sap proteins showed similar phenotypes as a *sit4*Δ mutant (Luke, et al. 1996). It is believed that the Sap proteins function positively with Sit4, but it is not known if the various Sap-Sit4 subcomplexes exert unique functions. What seems puzzling is that this study, which used large scale immunoprecipitation to isolate the Sap proteins, did not report yPtpa1 as a protein that associates with Sit4. However, a closer examination of the data of Luke, et al. 1996 indicates that the immunoprecipitates of ³⁵S-labeled protein extracts indeed contained a polypeptide that corresponded to the size of yPtpa1 (see Fig. 3 within).

Mitchell and Sprague (2001) have shown that the C-terminal region of Sit4 predominantly interacts with yPtpa1, but its not know if this region also interacts with the Sap proteins. Because yPtpa1 is unrelated to the Sap proteins, it is expected to interact with Sit4 at a site distinct from the Sap proteins. Alternatively, yPtpa1 may compete for binding to the region of Sit4 that accommodates the Sap proteins. Although it is interesting to establish the region of Sit4 that interacts with yPtpa1 with respect to other proteins, it seems far more important to determine the exact biological role confer by Sit4-yPtpa1 interaction.

One clue to the biological function of the Sit4-yPtpa1 complex may reside at the G2/M stage of the cell cycle (Mitchell and Sprague 2001; Fellner, et al. 2003). It has been shown that deletion of either the *SIT4* or *yPTPA1* gene in a strain lacking the Cla4 kinase resulted in a synthetic lethal phenotype, suggesting that the Sit4-yPtpa1 complex and Cla4 kinase are executing a common essential function for the cell

(Mitchell and Sprague 2001). Although the function of Cla4 kinase is unknown, it has been documented to physically interact with the cyclin-dependent kinase Cdc28, and cells lacking Cla4 displayed hyperphosphorylated form of Cdc28 causing a severe G2/M delay (Mitchell and Sprague 2001). This delay can be rescued by either a deletion of the *SWE1* gene encoding a kinase that phosphorylates Cdc28 at the tyrosine amino acid residue located at position 19 or by an allele of *CDC28Y19F*, expressing a variant that cannot be phosphorylated (Mitchell and Sprague 2001). Since Swe1 also interacts with Cdc28 (Mitchell and Sprague 2001), it remains possible that the Sit4-yPtpa1 complex may play a role in negatively regulating Swe1 function. In short, one might envision a model whereby 4-NQO or UVA exposure triggers Swe1-induced hyperphosphorylation of Cdc28 to arrest cells in G1 and G2/M phases and activate the repair of the damaged DNA. However, in the absence of either Sit4 or yPtpa1 this response pathway is disrupted and the unrepaired DNA lesions lead to lethal mitosis and cell death. In fact, inhibition of PP2A phosphatase in human cell extracts prevents the repair of UV damaged DNA by the nucleotide excision DNA repair pathway, and expression of the CL100 serine/threonine phosphatase is rapidly induced by UVA (Ariza, et al. 1996; Fiscella, et al. 1997; Keyse and Emslie 1992; Yacoub, et al. 1997). However, the exact role of these phosphatases in DNA repair and UVA response remains unclear.

Another clue to the biological function of the Sit4-yPtpa1 complex is hinted by a more recent observation from a synthetic lethal screen revealing that a *sit4Δ rad52Δ* double mutant is inviable (Tong, et al. 2004). It is noteworthy that a *yptpa1Δ*

rad52 Δ double mutant is also synthetic lethal (DR., unpublished). Since Rad52 plays a major role in DNA double strand break repair, it is possible that the Sit4-yPtpa1 complex may also execute a role in this repair process. However, neither a *sit4* Δ or *yptpa1* Δ mutant is sensitive to γ -rays when compared to *rad52* Δ mutant or the parent strain, suggesting that the Sit4-yPtpa1 complex do not play a critical role in DNA double strand break repair, although other possibilities may exist (Ramotar, et al. 1998; DR, unpublished data). For example, the Sit4-yPtpa1 complex could play an indirect role in stabilizing the replication apparatus at sites of spontaneous oxidative DNA lesions. Thus, in the absence of Sit4 the replication complex becomes unstable and the oxidative DNA lesions are converted into double strand breaks, which cannot be repaired in the absence of Rad52.

We believe that finding the Sit4-yPtpa1 protein substrate(s) is likely to provide key information to better understand the mechanism of UVA defense in eukaryotic cells. This mechanism is critical as UVA is known to induce mutations in mammalian cells, and furthermore exposure to UVA has been linked specifically to the development of malignant melanoma (Drobetsky, et al. 1995; Moan, et al. 1999).

2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Anick Leduc for assistance with the microscope and Cyril Sabbah for reading the manuscript. This study was supported by a grant to D.R. from the Canadian Institutes of Health Research. During the tenure of this work D.R. was supported by a career scientist award from the NCIC, and currently by a senior fellowship from the Fonds de la Recherche en Sante du Quebec.

2.8 REFERENCES

- Ariza RR, Keyse SM, Moggs JG, Wood RD (1996) Reversible protein phosphorylation modulates nucleotide excision repair of damaged DNA by human cell extracts. *Nucleic Acids Res* 24: 433-440.
- Baharians Z, Schonthal AH (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem* 273: 19019-19024.
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115-132.
- Cayla X, Van Hoof C, Bosch M, Waelkens E, Vandekerckhove J, Peeters B, Merlevede W, Goris J (1994) Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 269: 15668-15675.
- Demple B, Amabile-Cuevas CF (1991) Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* 67: 837-839.
- Drobetsky EA, Turcotte J, Chateauneuf A (1995) A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2350-2354.
- Felkner IC, Kadlubar F (1968) Parallel between ultraviolet light and 4-nitroquinoline-1-oxide sensitivity in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 96: 1448-1449.

- Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, Vande Woude GF, O'Connor PM, Appella E (1997) Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6048-6053.
- Galiegue-Zouitina S, Bailleul B, Ginot YM, Perly B, Vigny P, Loucheux-Lefebvre MH (1986) N2-guanyl and N6-adenyl arylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res* 46: 1858-1863.
- Gershoni JM, Palade GE (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 131: 1-15.
- Gietz D, St. Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20: 1425.
- Goldstein AL, McCusker JH, Knop M, Siegers K, Pereira G, Zachariae W, Winsor B, Nasmyth K, Schiebel E, Pan X, Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. Heterologous URA3MX cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 1541-1553.
- Guthrie C, Fink GR (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Meth Enzymol* 194: 3-37.
- Hoeijmakers JH (1993) Nucleotide excision repair. II: From yeast to mammals. *Trends Genet* 9: 211-217.

- Keyse SM, Emslie EA (1992) Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* 359: 644-647.
- Kohda K, Tada M, Kasai H, Nishimura S, Kawazoe Y (1986) Formation of 8-hydroxyguanine residues in cellular DNA exposed to the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 139: 626-632.
- Leduc A, He CH, Ramotar D (2003) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* cell-wall pathway gene SLG1 causes hypersensitivity to the antitumor drug bleomycin. *Mol Gen Genomics* 269: 78-89.
- Luke MM, Della Seta F, Di Como CJ, Sugimoto H, Kobayashi R, Arndt KT (1996) The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol Cell Biol* 16: 2744-2755.
- Mitchell DA, Sprague GF, Jr. (2001) The phosphotyrosyl phosphatase activator, Ncs1p (Rrd1p), functions with Cla4p to regulate the G(2)/M transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21: 488-500.
- Moan J, Dahlback A, Setlow RB (1999) Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. *Photochem Photobiol* 70: 243-247.
- Nunoshiba T, Demple B (1993) Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res* 53: 3250-3252.
- Prakash S, Sung P, Prakash L (1993) DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 27: 33-70.
- Ramotar D, Belanger E, Brodeur I, Masson JY, Drobetsky EA (1998) A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is

implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Biol Chem* 273: 21489-21496.

Ruiz-Laguna J, Ariza RR, Prieto-Alamo MJ, Boiteux S, Pueyo C (1994) Fpg protein protects *Escherichia coli* K-12 from mutation induction by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis* 15: 425-429.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Eds) (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.

Sherman F, Fink G, Hicks J (Eds) (1983). *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor.

Shu Y, Yang H, Hallberg E, Hallberg R (1997) Molecular genetic analysis of Rts1p, a B' regulatory subunit of *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* 17: 3242-3253.

Stark MJ (1996) Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast* 12: 1647-1675.

Sugimura T, Otake H, Matsushima T (1968) Single strand scissions of DNA caused by a carcinogen, 4-hydroxylaminoquinoline 1-oxide. *Nature* 218: 392.

Tada M (1976) Main binding sites of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 454: 558-566.

Tong AH, Lesage G, Bader GD, Ding H, Xu H et al., (2004) Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303: 808-813.

- Vongsamphanh R, Fortier PK, Ramotar D (2001) Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Mol Cell Biol* 21: 1647-1655.
- Wang H, Ramotar D (2002) Cellular resistance to bleomycin in *Saccharomyces cerevisiae* is not affected by changes in bleomycin hydrolase levels. *Biochem Cell Biol* 80: 789-796.
- Wera S, Hemmings BA (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 311: 17-29.
- Yacoub A, Kelley MR, Deutsch WA (1997) The DNA repair activity of human redox/repair protein APE/Ref-1 is inactivated by phosphorylation. *Cancer Res* 57: 5457-5459.
- Yamamoto K, Inoue S, Kawanishi S (1993) Site-specific DNA damage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation by hydroxylamine and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in the presence of Cu(II): role of active oxygen species. *Carcinogenesis* 14: 1397-1401.
- Zhao Y, Boguslawski G, Zitomer RS, DePaoli-Roach AA (1997) *Saccharomyces cerevisiae* homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions. *J Biol Chem* 272: 8256-8262.

Chapitre 3

Article 2

The *Saccharomyces cerevisiae* phosphatase activator Rrd1 is required to modulate gene expression in response to rapamycin exposure

Julie Douville¹, Jocelyn David¹, Karine M. Lemieux²,

Luc Gaudreau² et Dindial Ramotar¹

¹Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415 de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada, H1T 2M4

Université de Montréal

²Département de Biologie, Université de Sherbrooke

ARTICLE PUBLIÉ DANS *GENETICS* (2006) 172(2):1369-72

3 ARTICLE #2

3.1 CONTRIBUTION PERSONNELLE

Cet article comprend les résultats obtenus par J. Douville et J. David. Au niveau de la planification et du design des expériences, j'évalue ma contribution à 30%. Au niveau de la réalisation des expériences, ma contribution a été de 50%. Au niveau de la rédaction de l'article, ma contribution a été de 80% et pour ce qui est des corrections subséquentes, ma contribution a été de 90%.

3.2 ABSTRACT

We show that mutants lacking either the phosphatase activator Rrd1 or the phosphatase Pph3 are resistant to rapamycin, and that double mutants exhibit a synergistic response. This phenotype could be related to an inability of the mutants to degrade RNA polymerase II leading to transcription of critical genes that sustain growth.

3.3 INTRODUCTION

The yPtpa1/Rrd1 protein shares 35% identity with the human phosphotyrosyl phosphatase activator, hPTPA, which has been proposed to function as a phosphatase activator (CAYLA *et al.* 1994b; JANSSENS *et al.* 1998; RAMOTAR *et al.* 1998). Rrd1 interacts with Sit4, a catalytic subunit belonging to the PP2A Ser/Thr phosphatase family (DOUVILLE *et al.* 2004; ZHENG and JIANG 2005), and both proteins participate in the same genetic pathway to mediate resistance to 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) and UVA (DOUVILLE *et al.* 2004). The Rrd1-Sit4 complex may function to activate gene expression, as Sit4 is required for expression of several genes, e.g., *SWI4* (FERNANDEZ-SARABIA *et al.* 1992).

*rrd1*Δ mutants are resistant to the immunosuppressant rapamycin, suggesting that Rrd1 plays a role in the cellular response to this drug (REMPOLA *et al.* 2000). In yeast, rapamycin binds to the peptidyl-prolyl isomerase Fpr1 and this complex inactivates the Tor1,2 kinases (HEITMAN *et al.* 1991), leading to the activation of Sit4 via dissociation from an inhibitor protein Tap42 (DI COMO and ARNDT 1996; JIANG and BROACH 1999a). The activated Sit4 dephosphorylates several targets including the nutrient-responsive transcriptional activator Gln3 (that translocates to the nucleus to activate *GLN1* and *MEP2* expression) and the Ser/Thr kinase Npr1 that regulates the amino acid permeases (SCHMIDT *et al.* 1998). In general, rapamycin generates a profound modification in the transcriptional profile of yeast. While some genes, e.g., the diauxic shift genes *CPA2* and *PYCI*, are upregulated by rapamycin exposure,

others such as the ribosomal protein genes including *RPS26A*, *RPL30*, and *RPL9* are down-regulated (HARDWICK *et al.* 1999; POWERS and WALTER 1999).

3.4 RESULTS

Here, we investigated the cellular response mechanism of *rrd1* Δ mutants to rapamycin. We first assessed if *rrd1* Δ mutants respond to the initial challenge of rapamycin by examining Npr1 kinase phosphorylation status and *MEP2* expression (SCHMELZLE *et al.* 2004). As shown in Fig. 1, rapamycin quickly triggered Npr1 dephosphorylation, as well as *MEP2* expression, in both the parent and the mutant, eliminating a role for Rrd1 in these early events. We next determined the effect of rapamycin on the growth rate of the *rrd1* Δ mutant. As shown in Fig. 2A, the parent and *rrd1* Δ mutant grew at nearly the same rate in the absence of rapamycin, but growth was reduced when the strains were challenged with rapamycin. Interestingly, growth of the parent ceased by 9h, while the mutant continued to grow (Fig. 2A) and divide (data not shown) in the presence of rapamycin. Thus, the mechanism by which rapamycin induces growth arrest appears to depend on Rrd1.

A genome-wide screen revealed that the Pph3 catalytic subunit of the PP2A family is involved in rapamycin resistance (CHAN *et al.* 2000). We therefore tested if Rrd1 might function via Pph3. As expected, growth of the parent ceased within 9h, while the *rrd1* Δ and *pph3* Δ single mutants continued growing in the presence of rapamycin (Fig. 2B). Importantly, the *rrd1* Δ *pph3* Δ double mutant showed a synergistic response (Fig. 2B), suggesting that Rrd1 and Pph3 are acting separately to mediate rapamycin-induced growth arrest. Whether Rrd1 acts via another member of the PP2A family, such as Pph21 and Pph22, is not known (STARK 1996).

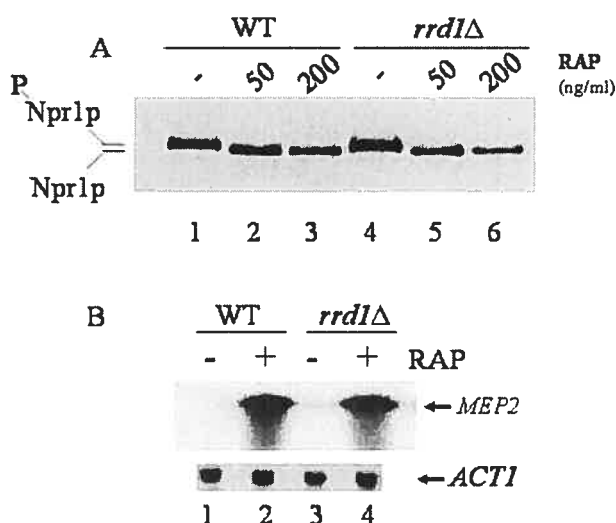


Figure 1: *rrd1Δ* mutant exhibit normal response to the early events of rapamycin exposure.

Panel A, rapamycin-induced dephosphorylation of the Npr1 kinase in the parent and *rrd1Δ* mutant. Exponentially growing wild type (WT, SEY6210)(*MATα*, *leu2-3 112*, *ura3-52*, *his3-Δ200*, *trp1-Δ901*, *lys2-801*, *suc2-Δ9*, *Mel⁻*) and the *rrd1Δ* mutant bearing the plasmid pHA-NPR1 (kindly provided by Michael Hall, Switzerland) expressing a HA-Npr1 fusion protein were treated without and with rapamycin (Sigma) (50 and 200 ng/ml for 15 min) and the phosphorylation status of the HA-Npr1 kinase was determined by Western blot using an anti-HA monoclonal antibody (Santa Cruz). Samples without rapamycin were treated with the drug vehicle (90% ethanol, 10% Tween 20). Panel B, rapamycin-induced expression of *MEP2* gene in the parent and *rrd1Δ* mutant. Cells were treated as in panel A and total RNA probed for expression of the *MEP2* and *ACT1* genes. The data is representative of three independent experiments. RAP, rapamycin.

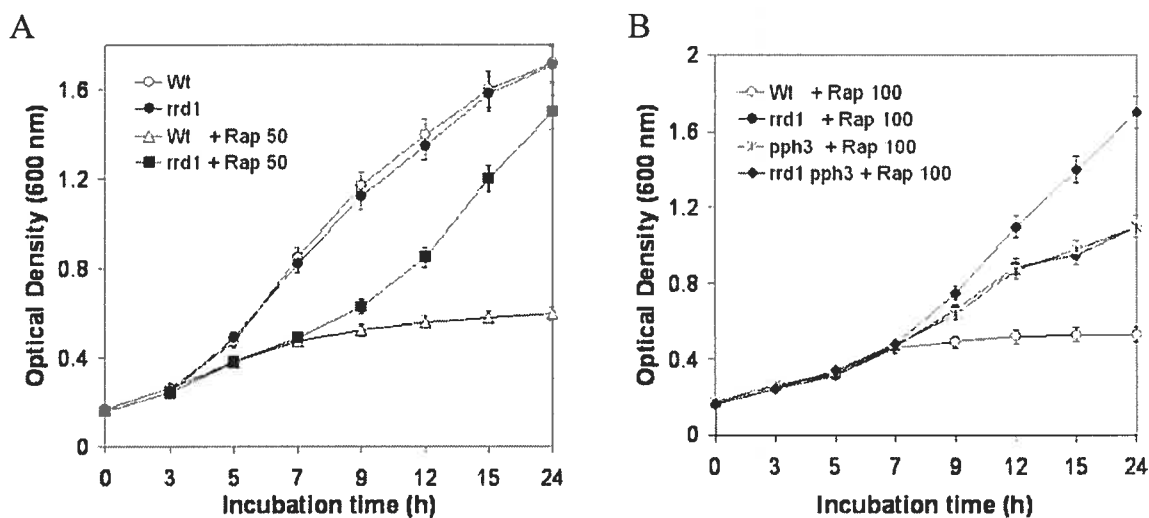


Figure 2: Growth of the parent and the mutants *rrd1* Δ , *pph3* Δ , and *rrd1* Δ *pph3* Δ in the absence or presence of rapamycin.

Panels A and B, exponential phase cells, wild type strain (SEY6210) and the indicated isogenic mutants, growing in YPD medium were diluted to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.2 in fresh YPD medium with the drug vehicle and with rapamycin (50 or 100 ng/ml). Growth of the cultures was monitored by measuring the OD₆₀₀ at the indicated time. The data is the average of three independent experiments. RAP, rapamycin.

We next tested if Rrd1 could influence expression of genes known to be regulated in response to rapamycin (HARDWICK *et al.* 1999). Expression of the *CPA2* and *PYC1* genes was induced in the parent strain, but not in the *rrd1*Δ mutant (Fig. 3A), suggesting that Rrd1 is required to mediate rapamycin-induced gene expression. Since rapamycin is also known to trigger the down-regulation of some genes, e.g., *RPS26A* and *RPL9A*, we tested if Rrd1 is involved in this process. The *RPS26A* gene was nearly completely down regulated in the parent strain, but remained partially expressed in the *rrd1*Δ mutant upon rapamycin exposure (Fig. 3B). Since *RPL9A* is down regulated in both strains, it appears that a subset of rapamycin responsive genes is under the control of Rrd1. In fact, Rrd1 is required to support activator-dependent *in vitro* transcription of a well characterized reporter E4 (data not shown) (WU *et al.* 1996), consistent with Rrd1 involvement in gene expression.

Since Rrd1 interacts with Sit4 and this complex has been shown to dephosphorylate the target proteins Sap185 and Gln3 (CRESPO *et al.* 2002; FELLNER *et al.* 2003a), it is reasonable to assume that Rrd1 could affect gene expression by modulating the phosphorylation status of the C-terminal domain (CTD) of the Rpb1 subunit of RNA polymerase II upon rapamycin exposure. As such, the parent strain and the isogenic single mutants *rrd1*Δ and *pph3*Δ, and the double mutant *rrd1*Δ *pph3*Δ were assessed for the phosphorylation status of Rpb1. As shown in Fig. 4A, the high molecular weight bands (~150 to 200-kDa), corresponding to a heterogeneous population of Rpb1 polypeptides, disappeared when the parent strain was treated with rapamycin. Interestingly, a polypeptide band of ~70-kDa was

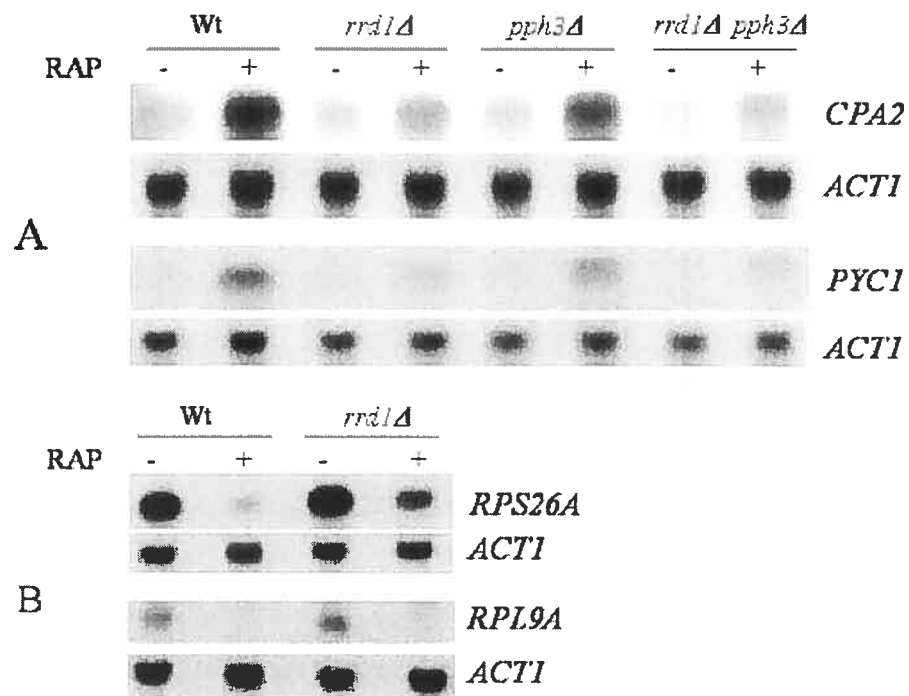


Figure 3: Northern blot analysis of rapamycin-responsive genes in the parent and the mutants *rrd1Δ*, *pph3Δ*, and *rrd1Δ pph3Δ*.

Panel A, rapamycin-induced expression of the *CPA2* and *PYC1* genes is Rrd1-dependent. Exponentially growing cells in YPD medium were treated with the drug vehicle and with rapamycin (200 ng/ml) for 30 minutes before extracting total RNA. Samples of these RNA were analysed by Northern blot for the expression of the *CPA2* and *PYC1* genes. Panel B, rapamycin-induced down-regulation of the ribosomal gene *RSP26A* is partially dependent on Rrd1. Cells were cultured as described in A, except they were treated for 2 hr. Total RNA was probed for expression of the *RSP26A* and *RPL9A* genes. For panels A and B, the actin gene *ACT1*, was used as a control for total RNA loaded on the gel. The data is representative of three independent experiments.

intensified following the drug treatment (Fig. 4A), suggesting that Rpb1 is not dephosphorylated, but proteolytically processed. It is noteworthy that rapamycin treatment caused degradation of both phosphorylated and non-phosphorylated form of Rpb1 (data not shown). When similar experiment was conducted with the *rrd1* Δ mutant, the phenomenon was significantly reduced, and more dramatically in the *rrd1* Δ *pph3* Δ double mutant (Fig. 4A), but not in a *gln3* Δ mutant, which also displays rapamycin resistance (data not shown) (CARDENAS *et al.* 1999; POWERS and WALTER 1999). These data are consistent with a model whereby both Rrd1 and Pph3 contribute separately to the molecular process that acts independently of the Gln3 signalling pathway to trigger degradation of Rpb1 upon rapamycin exposure. We note that the timing of Rpb1 degradation coincided with the reported kinetics of down-regulation of the ribosomal protein genes that occurred within 60 min following rapamycin treatment (CARDENAS *et al.* 1999; POWERS and WALTER 1999). At least, greater than 50% of Rpb1 was converted to the 70-kDa form after 75 min of rapamycin treatment (Fig. 4B). Thus, the down-regulation of the ribosomal protein genes triggered by rapamycin could be a consequence of increased degradation of Rpb1 in the parent strain.

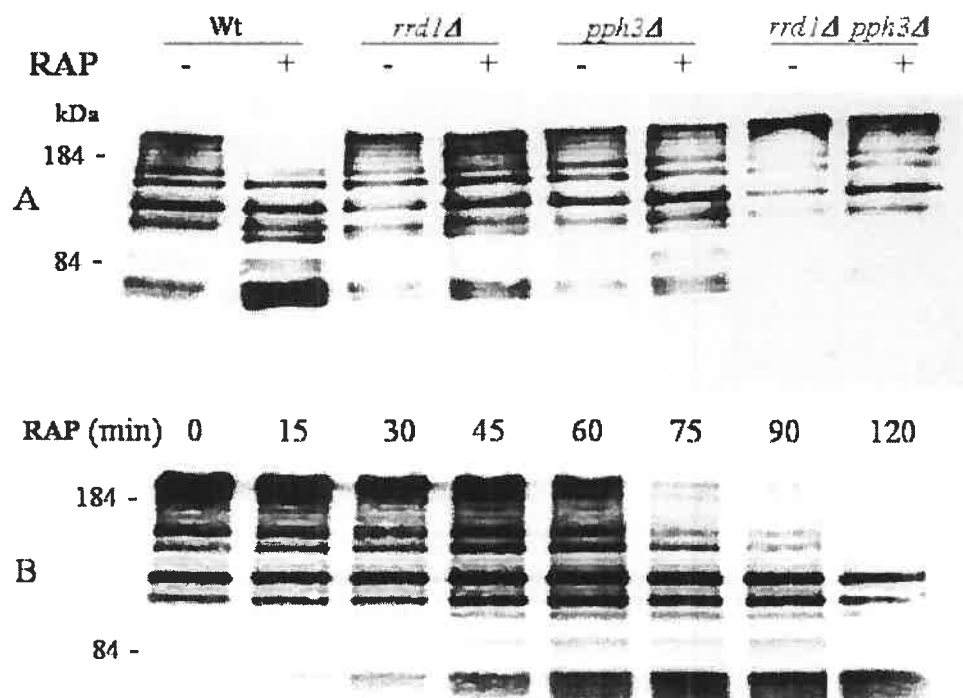


Figure 4: Rapamycin exposure triggers degradation of RNA polymerase II large subunit Rpb1.

Panel A, Rrd1 and Pph3 are required for rapamycin-induced degradation of Rpb1. Exponentially growing cells, wild type and the indicated mutant strains, were treated with the drug vehicle or with rapamycin (200 ng/ml) for 2 hr. Total protein extracts were derived from these samples and analyzed for the Rpb1 protein by Western blot using the H14 antibody (Covance), which recognizes phospho-Ser5 of the CTD of Rpb1. Panel B, time course analysis of Rpb1 degradation in the wild type strain exposed to rapamycin. Exponentially growing wild type cells were treated with a fixed concentration of rapamycin (200 ng/ml) and samples were taken at the indicated time points. Samples were processed for Western blot as in panel A. The data is representative of three independent experiments. RAP, rapamycin.

3.5 DISCUSSION

The rationale underlying the potential degradation of Rpb1 during rapamycin treatment may be a necessity of the cell to drastically reduce its metabolism. Since rapamycin mimics starvation conditions, drug-treated cells will adapt to a specific energy-saving response involving the down-regulation of several physiological processes, including transcription. In this context, destruction of an important fraction of Rpb1 would be an efficient mechanism to prevent unnecessary initiation of gene transcription. Although the half-life of Rpb1 (< 75 min) correlates with the timing of the down-regulation of the ribosomal protein genes triggered by rapamycin, the cell growth only ceased at a much later time, presumably due to the additional time required to dilute and turnover all the Rpb1 and various other molecules (CARDENAS *et al.* 1999). Thus, preventing the destruction of Rpb1, as in the case of *rrd1*Δ mutants and which is even more pronounced in *rrd1*Δ *pph3*Δ double mutants, is expected to permit continuous expression of critical genes required to promote growth in the presence of rapamycin.

The only other protein documented to be degraded in response to rapamycin is the translation initiation factor eIF-4G (BERSET *et al.* 1998). eIF-4G is degraded within 2-3h in response to rapamycin treatment, while other initiation factors, such as eIF-4E associated with eIF-4G, remain unaffected (BERSET *et al.* 1998). The degradation of eIF-4G requires a functional Tor1-kinase signalling pathway (BERSET *et al.* 1998). Since the time frame at which Rpb1 is degraded coincides with that of

eIF-4G, it is likely that Rpb1 degradation is also via the Tor1 pathway. If so, Rrd1 might execute a function downstream of the Tor1 pathway that culminates in the activated expression of a protease (e.g., those induced by rapamycin such as Lap3, Lap 4, Pep4, and Pbr1) that could degrade key proteins involved in translation and transcription (MEWES *et al.* 1999). Clearly, additional experiments are needed to unravel the exact molecular function by which Rrd1 controls rapamycin resistance.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant to D.R. from the Canadian Institutes of Health Research. During the tenure of this work D.R. was supported by a career scientist award from the NCIC, and currently by a senior fellowship from the Fonds de la Recherche en Sante du Quebec.

3.7 REFERENCES

- BERSET, C., H. TRACHSEL and M. ALTMANN, 1998 The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4264-4269.
- CARDENAS, M. E., N. S. CUTLER, M. C. LORENZ, C. J. DI COMO and J. HEITMAN, 1999 The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev* **13**: 3271-3279.
- CAYLA, X., C. VAN HOOF, M. BOSCH, E. WAELKENS, J. VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1994 Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **269**: 15668-15675.
- CHAN, T. F., J. CARVALHO, L. RILES and X. F. ZHENG, 2000 A chemical genomics approach toward understanding the global functions of the target of rapamycin protein (TOR). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13227-13232.
- CRESPO, J. L., T. POWERS, B. FOWLER and M. N. HALL, 2002 The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6784-6789.
- DI COMO, C. J., and K. T. ARNDT, 1996 Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev* **10**: 1904-1916.
- DOUVILLE, J., J. DAVID, P. K. FORTIER and D. RAMOTAR, 2004 The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator protein, yPtpa1/Rrd1, interacts with

Sit4 phosphatase to mediate resistance to 4-nitroquinoline-1-oxide and UVA.
Curr Genet **46**: 72-81.

FELLNER, T., D. H. LACKNER, H. HOMBAUER, P. PIRIBAUER, I. MUDRAK *et al.*, 2003
A novel and essential mechanism determining specificity and activity of
protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo. *Genes Dev* **17**: 2138-2150.

FERNANDEZ-SARABIA, M. J., A. SUTTON, T. ZHONG and K. T. ARNDT, 1992 SIT4
protein phosphatase is required for the normal accumulation of SWI4, CLN1,
CLN2, and HCS26 RNAs during late G1. *Genes Dev* **6**: 2417-2428.

HARDWICK, J. S., F. G. KURUVILLA, J. K. TONG, A. F. SHAMJI and S. L. SCHREIBER,
1999 Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-
sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc Natl
Acad Sci U S A* **96**: 14866-14870.

HEITMAN, J., N. R. MOVVA and M. N. HALL, 1991 Targets for cell cycle arrest by the
immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-909.

JANSSENS, V., C. VAN HOOF, W. MERLEVEDE and J. GORIS, 1998 PTPA regulating
PP2A as a dual specificity phosphatase. *Methods Mol Biol* **93**: 103-115.

JIANG, Y., and J. R. BROACH, 1999 Tor proteins and protein phosphatase 2A
reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *Embo J* **18**:
2782-2792.

MEWES, H. W., K. HEUMANN, A. KAPS, K. MAYER, F. PFEIFFER *et al.*, 1999 MIPS: a
database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res* **27**: 44-48.

POWERS, T., and P. WALTER, 1999 Regulation of ribosome biogenesis by the
rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Biol Cell **10**: 987-1000.

- RAMOTAR, D., E. BELANGER, I. BRODEUR, J. Y. MASSON and E. A. DROBETSKY, 1998
A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA
is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the
model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Biol Chem* **273**: 21489-21496.
- REMPOLA, B., A. KANIAK, A. MIGDALSKI, J. RYTKA, P. P. SLONIMSKI *et al.*, 2000
Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which
encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of
PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **262**: 1081-1092.
- SCHMELZLE, T., T. BECK, D. E. MARTIN and M. N. HALL, 2004 Activation of the
RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell
Biol* **24**: 338-351.
- SCHMIDT, A., T. BECK, A. KOLLER, J. KUNZ and M. N. HALL, 1998 The TOR nutrient
signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the
tryptophan permease. *Embo J* **17**: 6924-6931.
- STARK, M. J., 1996 Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and
diverse regulation. *Yeast* **12**: 1647-1675.
- WU, Y., R. J. REECE and M. PTASHNE, 1996 Quantitation of putative activator-target
affinities predicts transcriptional activating potentials. *Embo J* **15**: 3951-3963.
- ZHENG, Y., and Y. JIANG, 2005 The Yeast Phosphotyrosyl Phosphatase Activator Is
Part of the Tap42-Phosphatase Complexes. *Mol Biol Cell*.

Chapitre 4**Article 3****The isomerase Rrd1 mediates release of RNA polymerase II
from chromatin in response to specific stress conditions****Julie Douville and Dindial Ramotar***Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont**5415 de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada, H1T 2M4**Université de Montréal*ARTICLE SOUMIS À *GENES AND DEVELOPMENT*

4 ARTICLE #3

4.1 CONTRIBUTION PERSONNELLE

Cet article comprend les résultats obtenus par J. Douville. Au niveau de la planification et du design des expériences, j'évalue ma contribution à 90%. Au niveau de la réalisation des expériences, ma contribution a également été de 100%. Au niveau de la rédaction de l'article, ma contribution a été de 80% et pour ce qui est des corrections subséquentes, ma contribution a aussi été de 80%.

4.2 ABSTRACT

Treatment of cells with the immunosuppressant rapamycin engenders a profound modification in the transcriptional profile leading to growth arrest. Yeast mutants devoid of the PP2A phosphatase activator protein Rrd1, which possesses a peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase activity, display striking resistance to rapamycin. We demonstrate here that Rrd1 interacts directly with Rpb1, the large subunit of RNA pol II. *rrd1* Δ mutants challenged with rapamycin accumulate ubiquitinated Rpb1 which then cannot be efficiently released from chromatin for proteasomal degradation. Moreover these mutants, unlike the parental strain, are unable to undergo isomerization within the C-terminal domain (CTD) of Rpb1 *in vivo* when the cells are challenged with rapamycin. Our data reveal a novel role for Rrd1 whereby it acts to directly isomerize the CTD of Rpb1. In response to rapamycin stress this structural alteration is ostensibly required for efficient release of ubiquitinated RNA pol II from chromatin followed, in turn, by rapid shutdown of transcription and cell cycle arrest.

4.3 INTRODUCTION

The *Saccharomyces cerevisiae* *RRD1* (Rapamycin Resistance Deletion 1) gene (also known as *yPTPA1/YPA1/NCSI*) encodes a 47-kDa protein that was first reported to play a role *in vivo* by guarding the genome against oxidative DNA damage caused by 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO), a carcinogen, and by UVA (RAMOTAR *et al.* 1998). Rrd1 is conserved in eukaryotes and shares 35% identity with the human phosphotyrosyl phosphatase activator, hPTPA, which was initially isolated as a protein that stimulated the weak phosphotyrosyl phosphatase activity of the type 2A Ser/Thr phosphatase PP2A in an *in vitro* system (CAYLA *et al.* 1990; CAYLA *et al.* 1994b; JANSSENS *et al.* 1998). As such, Rrd1 has been proposed to function as a phosphatase activator (CAYLA *et al.* 1994b; JANSSENS *et al.* 1998). Indeed, we and others reported that Rrd1 can physically interact with the Ser/Thr phosphatase Sit4, a catalytic subunit of PP2A (DOUVILLE *et al.* 2004; MITCHELL and SPRAGUE 2001; VAN HOOF *et al.* 2005). Deletion of the *SIT4* gene in either a parent strain or a *rrd1* Δ mutant results in *sit4* Δ single and *rrd1* Δ *sit4* Δ double mutants, respectively, that displayed the same level of sensitivity to 4-NQO and UVA as the *rrd1* Δ single mutant, suggesting that Rrd1 and Sit4 function in the same pathway to mediate protection against oxidative DNA damage-induced cell death (Douville *et al.*, 2004). So far, the Rrd1-Sit4 complex has been shown to dephosphorylate Sap185, one of four Sit4 associated proteins (FELLNER *et al.* 2003a; LUKE *et al.* 1996). However, mutants lacking Sap185 do not display phenotypes related to *sit4* or *rrd1* nulls (D.R., unpublished), clearly indicating that Rrd1-Sit4 must act on other targets.

Rrd1 is also required to mediate the cellular response to the widely-used immunosuppressant rapamycin. Mutants deficient in Rrd1 are unable to undergo rapamycin-induced growth arrest and therefore exhibit marked resistance to the drug (REMPOLA *et al.* 2000). In yeast, rapamycin binds to the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase Fpr1 and this drug-protein complex inactivates the Tor kinases, Tor1 and Tor2 (Target of Rapamycin), causing a profound modification in the transcriptional profile, and culmination in G1 growth arrest (CRESPO and HALL 2002; HARDWICK *et al.* 1999; HEITMAN *et al.* 1991). It is noteworthy that inhibition of the Tor kinases leads to the activation of Sit4 which in turn dephosphorylates several targets including the nutrient-responsive transcriptional activator Gln3, that translocates to the nucleus to activate *GLN1* and *MEP2* expression, and the Ser/Thr kinase Npr1 that regulates amino acid permeases such as Tat2 (BECK and HALL 1999; CRESPO and HALL 2002; SCHMELZLE *et al.* 2004). However, these Sit4-dependent processes do not require the function of Rrd1 (DOUVILLE *et al.* 2006; HEITMAN *et al.* 1991; POWERS and WALTER 1999; ROHDE *et al.* 2001a). In fact, our recent data indicated that Rrd1 exerts an effect at the transcriptional level (DOUVILLE *et al.* 2006; HEITMAN *et al.* 1991; POWERS and WALTER 1999; ROHDE *et al.* 2001a). This was supported by the observation that genes known to be upregulated e.g., the diauxic shift genes *CPA2* and *PYCI* and down-regulated, e.g., the ribosomal protein genes including *RPS26A*, *RPL30*, and *RPL9* following rapamycin exposure showed an altered transcription pattern in the *rrd1*Δ mutants (DOUVILLE *et al.* 2006; HEITMAN *et al.* 1991; POWERS and WALTER 1999; ROHDE *et al.* 2001a). Interestingly, the altered gene expression pattern is associated with an inability of the *rrd1*Δ mutants to degrade Rpb1, the large

subunit of RNA polymerase II (DOUVILLE *et al.* 2006). However, the exact function executed by Rrd1 in the rapamycin response pathway remains to be unravelled.

Recently, Rrd1 and its mammalian counterpart PTPA have been shown to possess an *in vitro* peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) activity on model substrates (JORDENS *et al.* 2006b). PPIases are ubiquitous proteins, present in both prokaryotes and eukaryotes, which act catalytically to facilitate the *cis/trans* isomerization of peptide bonds N-terminal to proline residues within polypeptide chains (FISCHER *et al.* 1984; SCHMID 1995). The work of Jordens *et al.* (2006) demonstrated that Rrd1 and PTPA can independently change the structure of synthetic short peptides, and that this activity is stimulated by the addition of ATP and Mg^{2+} , two previously known cofactors of PTPA (CAYLA *et al.* 1990; JANSSENS *et al.* 1998; JORDENS *et al.* 2006b). Moreover, one of the synthetic substrates (186 LQEPHEGPMCDL 198) representing a conserved sequence amongst PP2A could be efficiently isomerised by PTPA (JORDENS *et al.* 2006b). As such, it has been suggested that this PPIase activity could represent the mechanism by which PTPA activates PP2As (JORDENS *et al.* 2006b). Nonetheless to date, neither the *in vivo* target nor the biological function of the PPIase activity of PTPA has been elucidated.

In this study, we reveal a new role for Rrd1 in the cellular response to rapamycin. We show that Rrd1 interacts with Rpb1, as well as with other members of the transcriptional machinery, suggesting that Rrd1 plays an intimate role in transcription. Upon challenge with rapamycin, Rpb1 is shown to undergo ubiquitination in both the parental strain and the *rrd1* Δ mutant, a phenomenon that

has not been previously documented under this stress condition. However, levels of ubiquitinated Rpb1 were substantially higher in the *rrd1* Δ mutant when compared to the parental strain. Since ubiquitinated Rpb1 is known to be destined for proteasomal degradation, we attribute the high levels in the *rrd1* Δ mutant to reflect reduced turnover of RNA pol II, which then remains poised for transcription of critical genes that bypass rapamycin-induced growth arrest. We further show that the *rrd1* Δ mutant is unable to efficiently evict Rpb1 from the chromatin in response to rapamycin exposure. Finally, with substantial implications regarding this latter observation, we document for the first time that the CTD of RNA pol II undergoes isomerization in the parent, but not in the *rrd1* Δ mutant, in response to rapamycin treatment. On the basis of the above findings, we propose a novel mechanism to explain rapamycin-induced growth arrest whereby RNA pol II is stalled upon exposure to the drug followed by ubiquitination of Rpb1 and its isomerization by Rrd1. As such, RNA pol II is released prematurely from chromatin and degraded causing rapid shut-down of global transcription and profound growth arrest.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Construction of TAP-tagged Rrd1

Primers:

GTGCAAAAGAACGCACATATGAACAAGCATTAAACGAGCAAAGA

AGAACAAAAGCTGGAGCTCAT and

CGTAGAGAAGGTGGCGTGCGGCCAAT CTACACGAT

CCAGAGACATCTTATCGTCATCATCAAGTG were used to amplify the N-

terminal TAP tagging cassette from the plasmid pBS1761 (RIGAULT *et al.* 1999). The resulting fragment was then introduced into yeast strain YDL401 by standard TE/LiAc transformation procedure, followed by plating onto synthetic complete medium lacking tryptophan. Expression of the fusion protein was verified by western blot using PAP antibody (Sigma).

4.4.2 Purification of the TAP complex

Purification of the complex under native conditions was done as described (Rigault *et al.*, 1999), except the IgG column purification step was omitted. Briefly, extracts were prepared from 2 liters of yeast cells grown to late log phase. Cell pellet was washed once with water and resuspended in yeast extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol) containing a protease inhibitor cocktail (one tablet/10 ml, Roche). Cells were spun down and resuspended in 10 ml of yeast extraction buffer. Ten ml of glass beads were added and total

protein extracts were prepared using a bead-beater (Zymotex, Montreal, Canada). Cells were burst twelve times for 20 s at 5000 rpm, with 2-min intervals on ice. The extracts were centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 3 min and 50 mg of the extract prepared from the YDL401 strain without a TAP tag or YDL401 carrying TAP-Rrd1 was loaded onto 150 µl of packed calmodulin affinity resin (Stratagene) pre-equilibrated with 10 ml of calmodulin binding buffer (CBB) (25 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM Mg acetate, 1 mM imidazole, 2 mM CaCl₂, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.1% NP-40). Three ml of CBB and 150 µl of 200 mM CaCl₂ were added to the resin and the column was allowed to rotate 1 hour at 4°C. Two washes were performed using 10 ml of CBB followed by one wash with CBB containing 300 mM NaCl. Elution of the complex was achieved by adding 1.5 ml of calmodulin elution buffer (CEB) (25 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.2% NP-40, 1 mM magnesium acetate, 1 mM imidazole, 20 mM EGTA, 10 mM β-mercaptoethanol) and collecting 10 fractions. Fractions were then pooled and concentrated using centricon filter devices (Millipore) to a final volume of 50 µl. Samples were then loaded onto 10% SDS-PAGE and the gels were processed for Western blot analysis or silver staining. Sit4 polyclonal antibody was a generous gift from Kim Arndt (New Jersey, USA), and TFIIE antibody was a generous gift from Luc Gaudreau (University of Sherbrooke, Quebec, Canada).

4.4.3 Construction of the myc-tagged Rrd1 and Swel strains

To create a genomic integration of the myc-tag in the *RRD1* gene the pFA6a-myc plasmid (kindly provided by J.-Y. Masson, Laval University, Quebec, Canada)

was used to amplify the fragments (RRD1-myc and SWE1-myc) by polymerase chain reaction (PCR) by using the following primers: RRD1-myc-F1 5'-

GCTGCACCGGAACCAG

ACTTCTTTTTCAAGAGATAGACTACGTAGACGGATCCCCGGGTAAATTA

-3', RRD1-myc-R1 5'-

AGAAGTCATAATGCTTGTGCATACACATTTATATGTTTAATT

AATAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC -3', SWE1-myc-F1 5'-

CCAGGAAGACGAC

TTTGGACCTAAGCCAAAATTTTTTATACGGATCCCCGGGTAAATTA -3'

and SWE1-myc-R1 5'-

AAGTATGTAAATAAAACAAGGTTTTTTGTTCCATTTATCA

GAATTCGAGCTCGTTTAAAC -3'. The resulting 2.1-kb fragment was integrated

in frame into wild-type BY4741 strain, transformants were selected on synthetic complete media lacking histidine, and the correct integration verified by PCR and Western blotting using c-myc antibodies (9E10, SantaCruz).

4.4.4 Co-Immunoprecipitation experiments

Antibodies directed against TFIIE, Srb5, Gal11, TFIIB, Snf6, Snf2 (kindly provided by Luc Gaudreau, Sherbrooke), or against Rpb1 (8WG16, Covance) were covalently coupled to AminoLink matrix (Pierce) and used to precipitate 1 mg of total protein extracts from cells expressing tagged form of Rrd1, Swe1, Sit4, Rad52, or Apj1, or from wild type or *rrd1*Δ cells. The input (5%) used in the co-immunoprecipitation experiment as well as half the volume of the matrix were loaded

onto an 8% SDS-PAGE and the presence of the protein of interest in the precipitates was assessed by Western blot using either c-myc (9E10, Santa Cruz), GFP (Clontech), or Ubiquitin (Rockland) antibodies. The remaining half of the matrix was analysed separately by Western blot probed with 8WG16 antibodies.

4.4.5 Plasmid to express GFP fusion proteins

Construction of pGFP-Sit4, pGFP-Rad52, pGFP-Rrd1 was previously described (DOUVILLE *et al.* 2004). The plasmid to express GFP-Apj1 was created using the same strategy as described (DOUVILLE *et al.* 2004).

4.4.6 Extraction of Chromatin-Associated Proteins

Extraction of proteins bound to chromatin was done in small scale using a previously described procedure (SVEJSTRUP *et al.* 2003). Briefly, 50 ml of cells expressing either Rrd1-myc or Swe1-myc as a control, or wild type cells or *rrd1* Δ were subcultured to an optical density (O.D. 600) of \sim 0.8. Cultures were spun down then resuspended in 6.25 ml of 100 mM PIPES/KOH, pH 9.4, 10 mM DTT, and incubated at 30°C for 10 minutes with agitation. Cells were spun down, and resuspended in 2.5 ml of YPD containing 0.6 M sorbitol, 25 mM Tris-HCl pH 7.5 and 100 μ l of 25 mg/ml lyticase was added. Cells were incubated at 30° for 30 min with agitation, spheroplasts were spun down 2 minutes at 1800 rpm, resuspended in 2.5 ml YPD containing 0.7 M sorbitol, 25 mM Tris-HCl pH 7.5 and incubated for another 20 min at 30° with agitation. Cells were spun 2 minutes at 1800 rpm and the pellet was washed 3 times with 1 ml of lysis buffer (0.4 M sorbitol, 150 mM

potassium acetate, 2 mM magnesium chloride, 20 mM PIPES/KOH pH 6.8, containing the protease inhibitor cocktail; 1 tablet/10 ml), each time spinning cells out as above. Pellets were resuspended with 300 μ l of lysis buffer and Triton X-100 10% was added to a final concentration of 1% to achieve lysis. The lysed material (90 μ l) was removed and 45 μ l of 2X protein loading buffer was added to make the “whole cell extract” sample. Another 100 μ l of the lysed material was removed and spun down at 4^o, maximum speed in a microcentrifuge. Protein loading buffer (45 μ l of 2X) was added to the supernatant to make the “soluble low salt” fraction, and the pellet was resuspended in 90 μ l of lysis buffer to which 45 μ l of 2X protein loading buffer was added to yield the “chromatin low salt” fraction. Finally, another 100 μ l was taken from the lysed starting material, 7.5 μ l of 5 M potassium acetate pH 7.0 was added, and the sample was incubated for 20 minutes on ice. Sample was then spun at 4^o, maximum speed in a microcentrifuge followed by the addition of 45 μ l of 2X protein loading buffer to the supernatant to make the “soluble high salt” fraction. The pellet was resuspended in 90 μ l of lysis buffer and 45 μ l of 2X protein loading buffer to yield the “chromatin high salt” fraction. A volume of 35-50 μ l of each samples were run on 8% SDS-PAGE and processed for Western blotting using anti-myc (9E10, Santa Cruz). To assess the distribution of RNA pol II and its ubiquitinated form, whole cell extract and high salt soluble and chromatin samples were prepared as described above but with volumes scaled up three times. The various fractions obtained were desalted using centricon filter devices (Millipore) and resuspended in 300 μ l of yeast extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol). One milligram of total proteins were immunoprecipitated with anti-Rpb1 8WG16 antibody as described above and

immunocomplexes were run on 6% SDS-PAGE, followed by Western blotting using anti-Rpb1 8WG16 antibody or anti-ubiquitin polyclonal antibodies (Rockland). To ensure that same amount of total proteins were used to do the IP, 100 µg of each sample were run onto 6% SDS-PAGE followed by standard Coomassie staining.

4.4.7 Construction of GST-CTD

Primers:

TTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGA
 AGGTGCTATGTCTCCAGCTACTC and TTCAGTATCTACGATTCATAGATC
 TCTGCAGGTC GACGGATCCCCGGCAGATCGTCAGTCAGTCAC were used to
 amplify by PCR murine CTD using plasmid pGCTD as template, kindly provided by
 Luc Gaudreau (University of Sherbrooke) (PETERSON *et al.* 1992). Plasmid pTW340
 (kindly provided by Tom Wilson, Michigan) was digested with EcoRI and Bam HI to
 remove the *OGGI* gene. The digested product was electrophorized on a 1% agarose
 gel and the fragment corresponding to the linearized vector backbone was excised
 and purified. To generate the fusion by GAP repair, 100 ng of the linearized vector
 and 1 µg of the CTD PCR product were co-transformed into *S. cerevisiae* strain
 YW607. Transformants were selected on –Ura minimal media agar plates. The
 resulting plasmid bearing the GST-CTD fusion under the control of the copper-
 inducible promoter P_{CUP1} was amplified in *E. coli*, and re-introduced into either wild
 type or the *rrd1Δ* mutant BY4741 strain by using the standard lithium acetate
 transformation.

4.4.8 GST-CTD purification

Strains of interest bearing the pGST-CTD plasmid were subcultured in selective media (100 ml) to an OD₆₀₀ of ~ 1.0, then treated with the appropriate drug for the indicated time. Cells were spun down and washed once with water and resuspended in yeast extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol) containing a protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were spun down and resuspended in 200 µl of yeast extraction buffer. Glass beads (200 µl) were added and total protein extracts were prepared using a mini-bead-beater (Zymotex, Montreal, Canada). Cells were burst five times for 20 s at 5000 rpm, with 1-min intervals on ice. The extracts were centrifuged at 3000 rpm in an Eppendorf centrifuge at 4°C for 3 min. Lysates were diluted 3-4 folds in PBS and Triton X-100 was added to a final concentration of 0.2%. One ml of glutathione sepharose 4B matrix (Pharmacia) was equilibrated with 50 ml of PBS in 50 ml Falcon tube then the lysate (3.5 mg) was added and allowed to bind for one hour at room temperature on a rotating platform. The matrix was washed 3 times with PBS then transferred to 10 ml disposable column (BioRad). Excess of PBS was allowed to flow through, then GST-CTD was eluted with 5 fractions of 500 µl of 50 mM Tris-HCl pH 9.0, 20 mM reduced glutathione (Sigma). Purity of the samples was verified by SDS-PAGE followed by silver staining. Typically, fractions 2 and 3 were used for further analysis by CD spectroscopy or chymotrypsin assay (see below).

4.4.9 Circular dichroism spectroscopy

Continuous far-UV circular dichroism spectra (197-250 nm) of the GST-CTD fusion protein (4 μ M protein in 10 mM phosphate buffer pH 7.0, 50 mM NaCl) were collected using a Jasco-810 spectropolarimeter. The measurements were carried out at room temperature using a 1 mm path-length cuvette (Hellma) and a 1 nm bandwidth. Three spectra were collected for each sample and averaged. The spectral contribution of the buffer was corrected for by subtraction. Relative ellipticity was converted to mean residue molar ellipticity $[\Theta]$ according to Fasman (FASMAN 1996).

4.4.10 Limited chymotrypsin digestion assay

The purified GST-CTD (~100 ng) derived from wild type cells untreated or treated with rapamycin (200 ng/ml for 2h) was subjected to digestion with chymotrypsin (5 ng, Roche) by the addition of 1 mM CaCl_2 , and incubated at 37°C for the indicated time. Digestion was stopped by the addition of SDS-PAGE loading buffer and boiling of the samples. Processing of the GST-CTD was analyzed using 8% SDS-PAGE followed by staining with silver.

4.4.11 Interaction between Rrd1-myc and GST-CTD

Total protein extracts derived from wild type cells (100 ml) expressing GST-CTD, untreated or treated with rapamycin (200 ng/ml for 2h) were allowed to bind to GST affinity matrix (1 ml slurry) as described for the purification, except samples were not eluted from the columns. A second protein extract (1 mg) derived from a

strain expressing the fusion protein Rrd1-myc was applied on both columns and allowed to bind for 1 hour at room temperature on a rotating platform. Columns were then washed with 20 bed volumes of PBS and an aliquot of the beads (30 μ l) was loaded onto an 8% SDS-PAGE and processed for Western blot. Presence of GST-CTD on both columns was detected using polyclonal anti-GST (Sigma) and binding of Rrd1-myc was observed using monoclonal anti-myc antibody (SantaCruz).

4.4.12 Gradient plate assay

This assay was performed as described previously (RAMOTAR and MASSON 1996).

Table 1. Strains used in this study

YDL401	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ1 trp1 ura3-52 gal2 galΔ108</i>	Lafontaine and Tollervey, 1996
YDL401 TAP-Rrd1	Isogenic to YDL401, except <i>TRP1-TAP-Rrd1</i>	This study
BY4741	<i>Mat a, his3-1, leu2-0, met15-0, ura3-0</i>	C. Roberts
BY4741 (<i>rrd1</i> Δ)	Isogenic to BY4741, except <i>rrd1</i> Δ :: <i>LEU2</i>	Douville J. et al, 2004
BY4741 Rrd1-myc	Isogenic to BY4741, except <i>RRD-myc HIS3</i>	This study
BY4741 Swe1-myc	Isogenic to BY4741, except <i>SWE1-myc HIS3</i>	This study
CY4029	W303 background, SSD1-v1, <i>MATa, ade2-1, can1-100, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1</i>	K. Arndt
DR500	Isogenic to CY4029, except <i>rrd1</i> Δ :: <i>LEU2</i>	Douville J. et al., 2004

4.5 RESULTS

4.5.1 Affinity purification of Rrd1 reveals its association with several proteins

To examine if Rrd1 is associated with proteins other than the Sit4 phosphatase, we exploited the tandem affinity purification (TAP) tag strategy (see Materials and Methods) (RIGAUT *et al.* 1999). Although this approach uses two affinity purification steps that involved binding to successive columns (IgG and then calmodulin or *vice versa*), only calmodulin was used since the yield, but not the overall number, of proteins was sharply reduced with the application of both columns. As shown in Fig. 1A, several proteins were found to be associated with TAP-Rrd1. Identical protein pattern was observed from three independent experiments (Fig. 1A). No protein from the control strain, without the TAP tag, bound to the calmodulin column (Fig. 1A), suggesting that Rrd1 associated proteins are not the result of non-specific interaction with the column. In addition, the proteins eluted with TAP-Rrd1 did not bind onto a second calmodulin column containing only purified TAP-Apn1, a DNA repair enzyme (data not shown), indicating that the proteins might be specifically associated with Rrd1. To validate if this approach identified relevant interacting proteins, we tested if the fractions from the calmodulin column would cross react with the anti-Sit4 antibodies. As shown in Fig. 1B, the Sit4 protein was indeed present in the complex.

Since our recent findings indicate that Rrd1 is required to modulate gene expression in response to rapamycin exposure (DOUVILLE *et al.* 2006), we assessed if any transcription factors could be associated with the complex by using antibodies

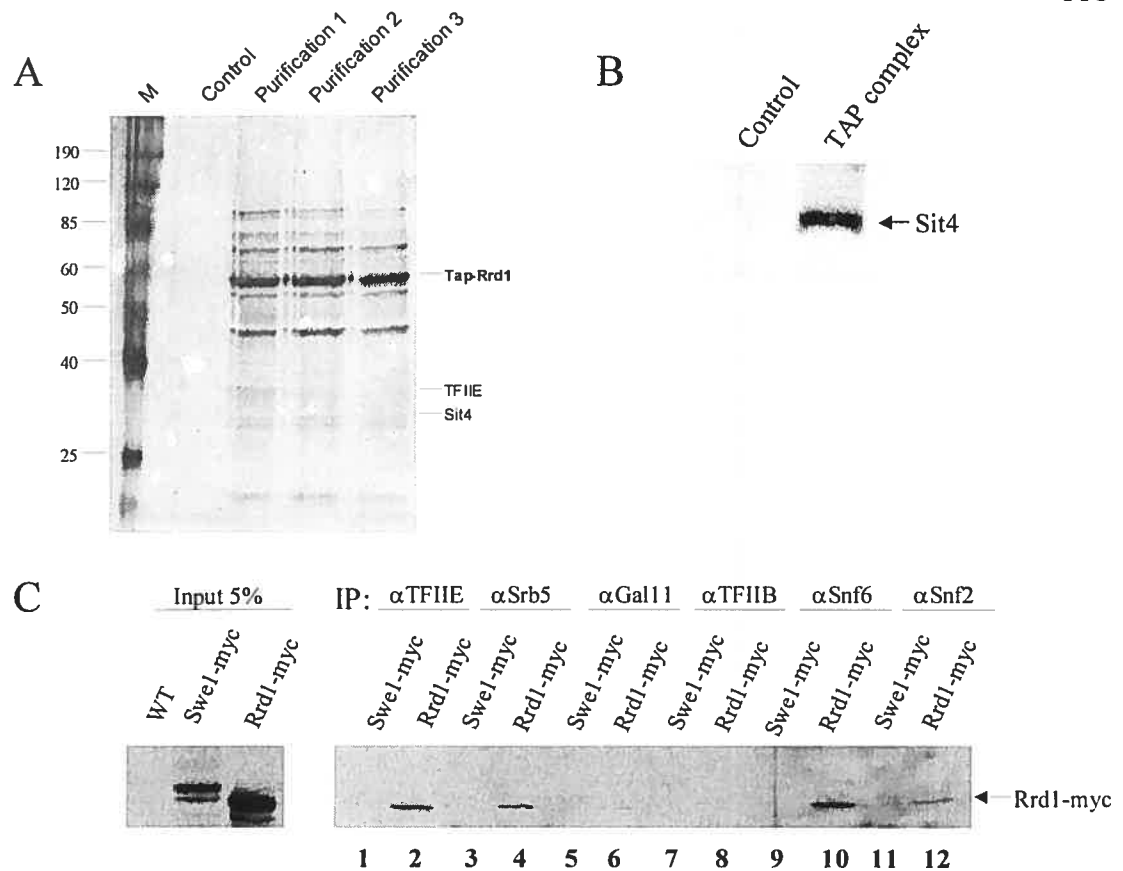


Figure 1: Rrd1 is part of the transcriptional machinery complex

A) SDS PAGE analysis of Rrd1 complex from three independent preparations. Total protein extracts derived from strain YDL401 expressing TAP-Rrd1 fusion protein was loaded onto calmodulin affinity column. Following protein binding and washing, sample was eluted, analyzed by 10% SDS-PAGE and detected by silver staining. The control is extract derived from the YDL401 strain without a TAP tagged protein. **B)** Western blot probed with anti-Sit4 antibodies. Samples from A were loaded on a SDS-PAGE and probed with anti-Sit4 polyclonal antibodies. **C)** Anti-TFIIB, anti-TFIIE, anti-Gal11, anti-Srb5, anti-Snf2 or anti-Snf6 was used to perform immunoprecipitation with extracts derived from cells expressing either Rrd1-myc or Swe1-myc (as a negative control). The presence of the myc-tagged Rrd1 or Swe1 protein in the precipitates was determined by Western blotting using anti-myc. The data is representative of two independent analyses.

directed against several members of the transcriptional machinery including the general transcription factors TFIIE and TFIIB, a component Gal11 of the Mediator complex, two members Snf2 and Snf6 of the Swi/Snf chromatin remodeling complex, and a subunit Srb5 of RNA pol II (LEE and YOUNG 2000). Amongst these factors, only TFIIE was detected in the complex as assessed by Western blot analysis (data not shown), raising the possibility that Rrd1 could be associated with the transcriptional machinery. The fact that the other transcription factors were not detected by Western blot could be related to the amount of protein in the complex which might be below the detection limit of the antibodies.

4.5.2 Rrd1-myc is co-immunoprecipitated by anti-TFIIE, -Srb5, -Gal11, -Snf6, and -Snf2

To assess more rigorously whether Rrd1 interacts with the transcriptional apparatus, we performed co-immunoprecipitation (co-IP) analysis of total extract prepared from cells expressing a functional form of Rrd1 endogenously tagged with myc. This was achieved with the same set of antibodies mentioned above followed by Western blot probed with anti-myc. As shown in Fig. 1C, anti-TFIIE, -Srb5, Gal11, -Snf6, and -Snf2 immunoprecipitated the Rrd1-myc protein, but not a control protein Swe1-myc (a cell cycle kinase). Amongst the antibodies tested, anti-TFIIB did not immunoprecipitate the Rrd1-myc protein. On the basis of these experiments, we strongly suggest that Rrd1 is a component of the transcriptional machinery. Moreover, the fact that Rrd1 interacts with TFIIE, Gal11, Snf2 and Snf6 indicates that it is present in the initiation complex (LEE and YOUNG 2000).

4.5.3 Rrd1 and associated proteins interact with the large subunit Rpb1 of RNA pol II

Our preliminary finding that Rrd1 is required for Rpb1 degradation in response to rapamycin (DOUVILLE *et al.* 2006), and that Rrd1 interacts with several component of the transcriptional machinery, prompted us to examine if Rrd1 could also interact with Rpb1. To do this, we performed co-IP with extracts from cells expressing endogenous Rrd1-myc and a control protein Swe1-myc (a nuclear protein kinase that regulates the G2/M transition by inhibiting Cdc28 kinase) using the 8WG16 antibody which recognizes the C-terminal domain (CTD) of RNA pol II (Fig. 2A). This antibody recognizes primarily the unphosphorylated form of the CTD, but it also has affinity to the phosphorylated form (JONES *et al.* 2004). Interestingly, the 8WG16 antibody immunoprecipitated the Rrd1-myc, but not the Swe1-myc protein, suggesting that Rrd1 is also associated with RNA pol II.

Since Rrd1 is known to interact with Sit4 (DOUVILLE *et al.* 2004; MITCHELL and SPRAGUE 2001; VAN HOOF *et al.* 2005; ZHENG and JIANG 2005), as well as a member (Apj1) of the DnaJ family (J.D. *et al.*, in preparation), we tested if these proteins could also be associated with Rpb1. The two proteins, Sit4 and Apj1, as well as a negative control protein Rad52, were tagged with Gfp and expressed from the galactose inducible promoter *GALI* (VONGSAMPHANH *et al.* 2001). While Sit4 and Apj1 were immunoprecipitated from total extract with the 8WG16 antibody, the Rad52 control protein was not found to be associated with the complex (Fig. 2B).

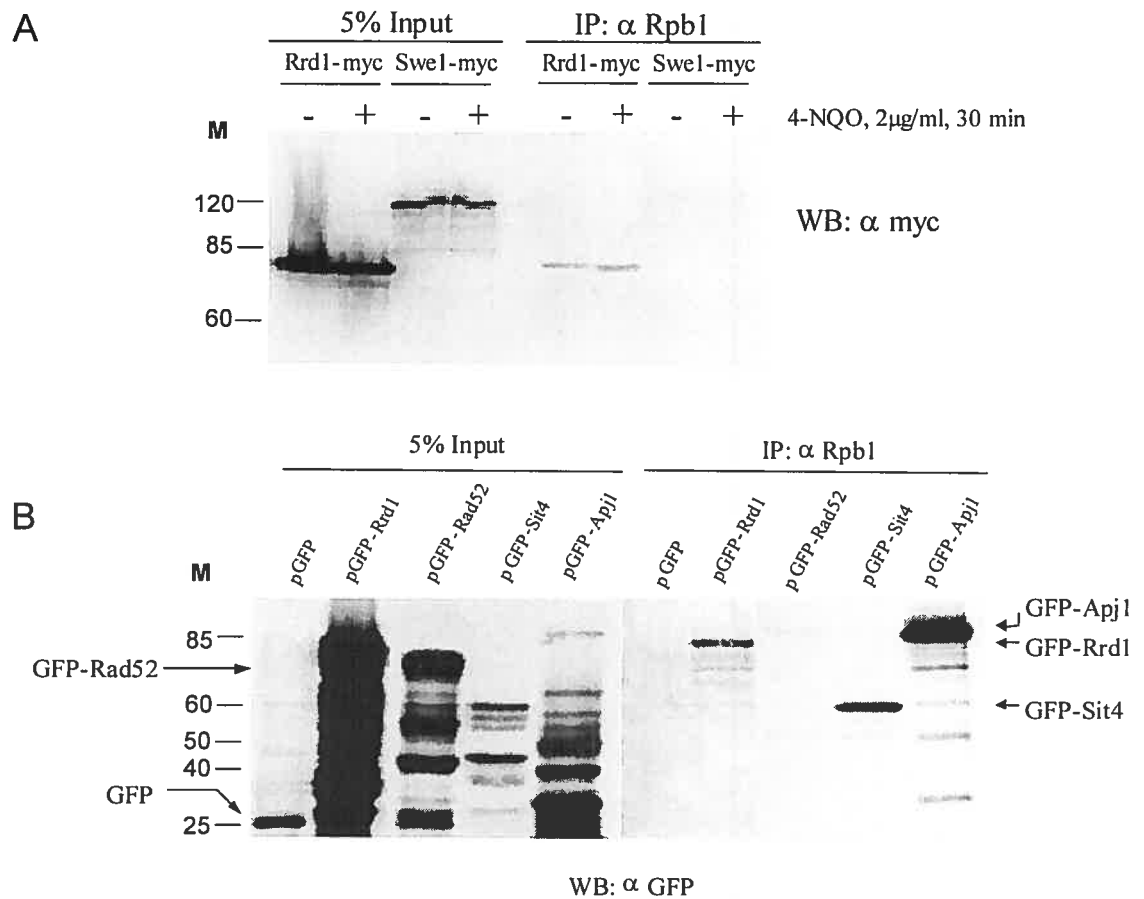


Figure 2: Rrd1 and its partners interact with RNA polymerase II.

A) Rpb1 pull-down of Rrd1. Anti-Rpb1 (8WG16) was used to immunoprecipitate extracts from cells expressing either functional Rrd1-myc or the negative control Swe1-myc. The presence of the myc-tagged Rrd1 protein in the precipitates was determined using 8% SDS-PAGE followed by anti-myc Western blotting. **B)** Specificity of Rpb1 pull-down of GFP tagged proteins. Anti-Rpb1 (8WG16) was used to precipitate extracts from cells expressing either GFP-Rrd1, GFP-Sit4, GFP-Apj1 (Sit4 and Apj1 are two Rrd1-interacting proteins) or GFP-Rad52 as a negative control. The presence of the GFP-tagged proteins in the precipitates was determined using 10% SDS-PAGE followed by anti-GFP Western blotting. The data is representative of three independent analyses.

These co-IP experiments reinforce the notion that Rrd1, as well as its partners are indeed tightly associated with RNA pol II.

4.5.4 Rrd1 is tightly bound to the chromatin

Since Rpb1 is known to be bound to the chromatin, we checked if Rrd1 is also present in the chromatin fraction. To do this, we used an established approach to prepare chromatin fractions from exponentially growing cells expressing either Rrd1-myc or the control protein Swe1-myc (SVEJSTRUP *et al.* 2003). As shown in Fig. 3, Swe1-myc was present in the soluble low salt (SLS) fraction (lane 2), but not in either the chromatin low salt (CLS) (lane 3) or chromatin high salt (CHS) (lane 5) fraction. In contrast, the Rrd1-myc protein was not completely extracted from the chromatin by low salt (lane 7) and a substantial fraction remained bound to the chromatin (Fig. 3, lane 8 or 10). This finding suggests that Rrd1 is tightly associated with the chromatin and asserts its association with Rpb1.

4.5.5 Rrd1 is required to mediate degradation of Rbp1 in response to rapamycin and 4-nitroquinoline-1-oxide exposure

RNA pol II degradation has been documented to occur when cells are exposed to DNA damaging agents such as 254nm UVC, 4-NQO, H₂O₂, and cisplatin, and that defect in this process can lead to sensitivity to these agents (BEAUDENON *et al.* 1999; BREGMAN *et al.* 1996; INUKAI *et al.* 2004; JUNG and LIPPARD 2006). Since we recently reported the first preliminary evidence that rapamycin can trigger Rpb1

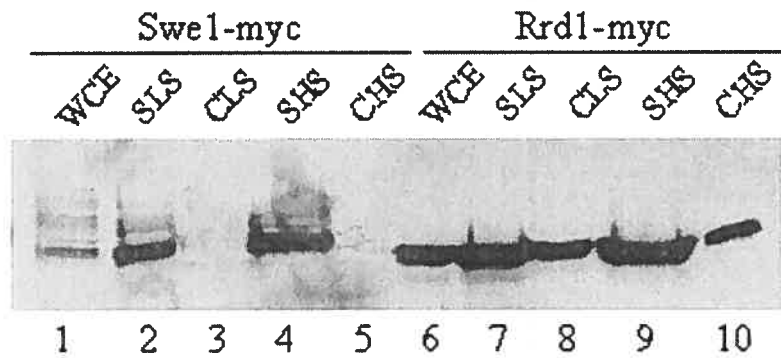


Figure 3 : Rrd1-myc is tightly bound to the chromatin.

Extraction of chromatin-associated proteins was done as described (see Material and Methods) using cells expressing either Rrd1-myc or Swe1-myc as a negative control. Distribution of the myc-tagged proteins was examined by loading the fractions onto 8% SDS-PAGE and probing with anti-myc antibody. WCE, whole cell extract, SLS, soluble low salt fraction, CLS, chromatin low salt fraction, SHS, soluble high salt fraction and CHS, chromatin high salt fraction. The data is representative of two independent analyses.

degradation, we set out to characterize the molecular basis of this phenomenon (DOUVILLE *et al.* 2006). We examined if the drug phenotypes, i.e., resistance to rapamycin and sensitivity to 4-NQO, of *rrd1* Δ mutant might be correlated with a defect in Rpb1 degradation. In this experiment, both the parent and the *rrd1* Δ mutant were treated with the indicated drugs and Rpb1 was immunoprecipitated from equal amount of the total cell extracts using 8WG16 antibodies. The relative amount of immunoprecipitated Rpb1 was assessed by Western blot using the same antibody (Fig. 4). Treatment with rapamycin (200 ng/ml for 2h) triggered the loss of nearly 80% of the total Rpb1 in the parent strain, but to a lesser extent (~30%) in the *rrd1* Δ mutant (Fig. 4, bar 4 vs. 10). Re-introduction of a plasmid pEB1, carrying the native *RRD1* gene, into the *rrd1* Δ mutant restored parental level of Rpb1 degradation, as well as sensitivity, when exposed to rapamycin (data not shown). On the basis of this finding, it would appear that a major portion of the rapamycin-induced RNA pol II degradation is dependent upon Rrd1 function.

As in the case of rapamycin, cells treated with 4-NQO (2 μ g/ml for 30 min) showed that >90% of the total Rpb1 was degraded in the parent (Fig. 4, bar 2). In contrast, substantially less Rpb1 (< 20%) was loss in the *rrd1* Δ mutant (Fig. 4, bar 8). We interpret this result to indicate that the sensitivity of the *rrd1* Δ mutant to 4-NQO might be due to an inability to process stalled Rpb1 at sites of DNA lesions, thereby preventing DNA repair (RAMOTAR *et al.* 1998). If this were the case, then treatment with agents (e.g., H₂O₂ and UVC) that do not show differential survival of the *rrd1* Δ mutant *versus* the parent is expected to cause similar losses of Rpb1 in both

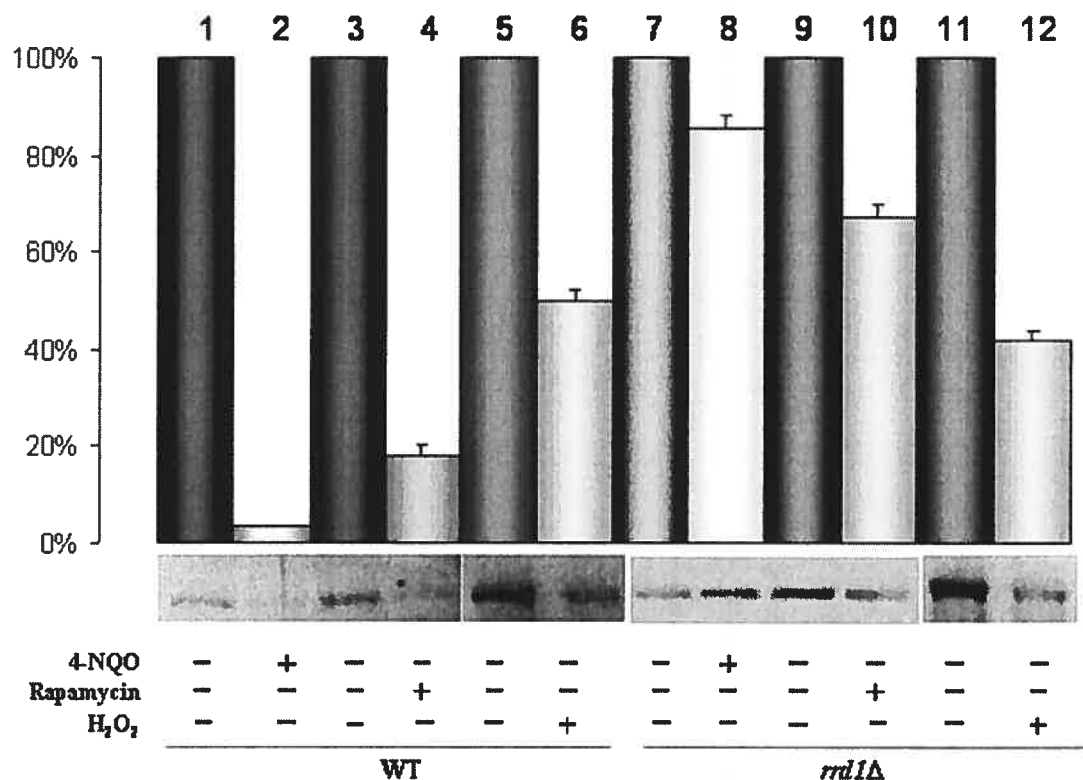


Figure 4 : *rrd1Δ* mutant displays stabilization of RNA pol II upon treatment with rapamycin or 4-NQO.

Exponentially growing wild type (WT) and *rrd1Δ* mutant were either untreated or treated with rapamycin (200 ng/ml, 2h), 4-NQO (2μg/ml, 30 min), or H₂O₂ (10 mM for 1h). Total protein extract was prepared and equal amounts were immunoprecipitated with anti-Rpb1 (8WG16) to pull-down Rpb1. Western blot using the same Rpb1 antibody was performed to assess stability of RNA pol II with the indicated treatments. Results were quantified using the MultiGauge analysis software from Fuji. The data is representative of three independent analyses.

strains. Indeed, treatment with H₂O₂ caused degradation of Rpb1 to same extent in both strains (Fig. 4, bar 6 vs 12), indicating that under this genotoxic stress condition Rpb1 degradation is independent of Rrd1 function. Thus, the role of Rrd1 in mediating Rpb1 degradation might depend upon the type of blocking lesions encountered by RNA pol II. However, rapamycin is not known to create genotoxic lesions, suggesting that this drug might signal a distinct mechanism that involves Rrd1-mediated Rpb1 degradation.

4.5.6 The ubiquitinated form of Rpb1 accumulates in the *rrd1*Δ mutant in response to stress

It has been previously demonstrated that Rpb1 degradation in response to DNA damage is mediated by the ubiquitin/proteasome system (BREGMAN *et al.* 1996; RATNER *et al.* 1998). We therefore checked if Rrd1 deficiency interfered with this process such that it would prevent degradation of Rpb1. To do this, we used the anti-Rpb1 8WG16 antibody to immunoprecipitate RNA pol II from the same amount of total protein extract derived from either the wild type or the *rrd1*Δ mutant cells that were untreated (zero min) or treated with rapamycin (200 ng/ml for 60 and 120 min). The immunoprecipitates were processed by Western blot using anti-ubiquitin polyclonal antibodies to specifically detect the ubiquitinated form of Rpb1 (Ub-Rpb1) (BEAUDENON *et al.* 1999). At time zero min, the ubiquitinated form of Rpb1 was only weakly detected in the parent strain, but became apparent following 60 min of rapamycin treatment (Fig. 5A, upper panel). The intensity of the Ub-Rpb1 was not

significantly increased with additional treatment time (120 min) (Fig. 5A, upper panel), perhaps representing a balance between ubiquitination and degradation. In contrast, at time zero min there was already a significant level of Ub-Rpb1 in the *rrd1Δ* mutant, as compared to the parent, suggesting that (i) the process of ubiquitination of Rpb1 is functional and (ii) there is spontaneous accumulation of Ub-Rpb1 in this mutant (Fig. 5A). Interestingly, when the *rrd1Δ* mutant was treated with rapamycin for 120 min, the Ub-Rpb1 accumulated to a greater extent (at least 4-fold more than the parent), consistent with the notion that the mutant has a defect in eliminating the Ub-Rpb1. Similar results were also obtained if the cells were treated with 4-NQO (2 μg/ml for 0 to 60 min; data not shown). In contrast, *rrd1Δ* mutant exposed to 254nm UVC showed the same increased level of Ub-Rpb1 as the parent (Fig. 5C). This result suggests that processing of Ub-Rpb1 is normal in the *rrd1Δ* mutant under this treatment, consistent with the strain showing parental sensitivity to 254nm UVC. As such, it is unlikely that the *rrd1Δ* mutant harbors a general defect in the proteasome function to cause accumulation of Ub-Rpb1 in response to rapamycin or 4-NQO. In fact, simply accumulating Ub-Rpb1 by blocking the proteasome function with MG132, which has been documented to reversibly inhibit the 26S proteasome complex (LEE and GOLDBERG 1998) and thus allowing the accumulation of Ub-Rpb1, did not cause parental cells to become resistant to rapamycin (data not shown). On the basis of these findings, we believe that the stress-induced accumulation of Ub-Rpb1 in the *rrd1Δ* mutant is due to a defect further downstream in the processing pathway.

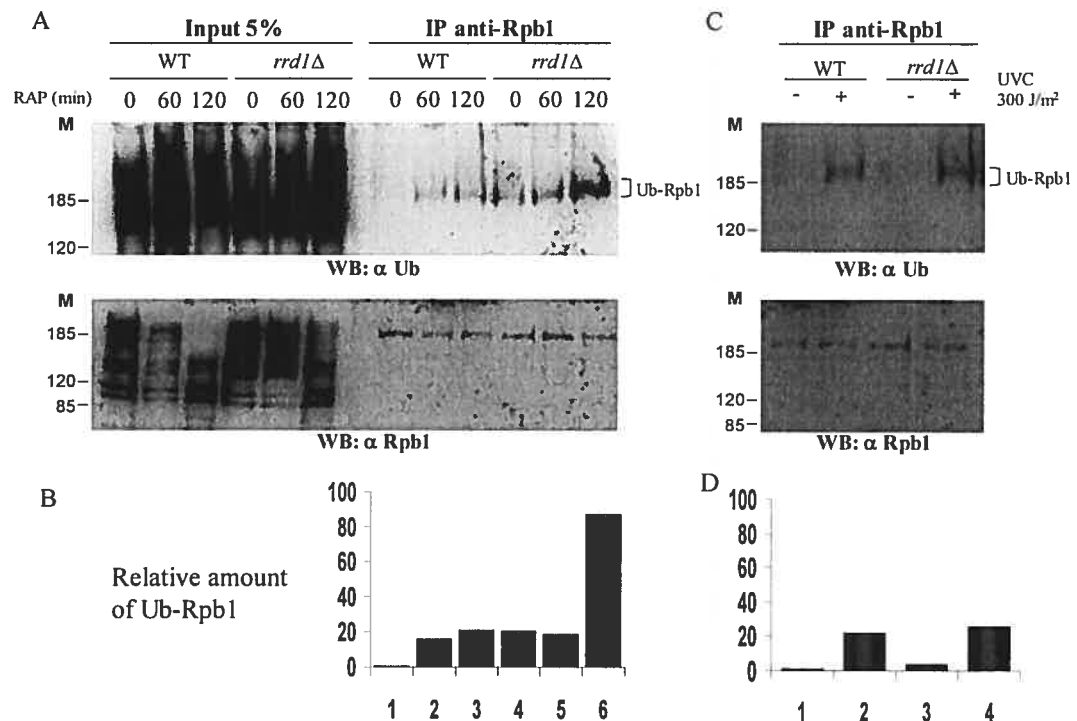


Figure 5 : Ub-Rpb1 accumulates in *rrd1Δ* mutant upon specific stress conditions.

A) Accumulation of Ub-Rpb1 in the *rrd1Δ* mutant following rapamycin treatment. Anti-Rpb1 (8WG16) was used to immunoprecipitate extracts from either wild type or *rrd1Δ* cells treated with rapamycin (200 ng/ml for 0, 60 and 120 min). The amount of ubiquitinated Rpb1 (upper panel) and total Rpb1 (lower panel) in the immunoprecipitates were assessed by Western blot using anti-Ub and 8WG16 anti-Rpb1 antibodies, respectively. **B)** Quantitative analysis of the relative amount of Ub-Rpb1 immunoprecipitated. Signal obtained in A was quantified using the Multi Gauge analysis software from Fuji. **C)** UVC-induced ubiquitination of Rpb1 in wild type and *rrd1Δ* mutant. Anti-Rpb1 (8WG16) was used to immunoprecipitate total extracts derived from either wild type or *rrd1Δ* mutant untreated or treated with 254nm UVC (300 J/m²). The amount of ubiquitinated Rpb1 (upper panel) and total Rpb1 (lower panel) were assessed as in panel A. **D)** Quantitative analysis of the relative amount of UVC-induced Ub-Rpb1 in the wild type and *rrd1Δ* mutant. Quantification was done as in panel B. The data is representative of two independent analyses.

4.5.7 Rrd1 is required to release Rpb1 from the chromatin

Following ubiquitination of Rpb1 the modified protein must be released from chromatin for degradation (JUNG and LIPPARD 2006), although the mechanism by which the eviction process occurs has not been previously elucidated. Since Ub-Rpb1 is accumulated in the *rrd1* Δ mutant in response to rapamycin or DNA damage caused by 4-NQO and that this process is unrelated to a proteasomal defect, we therefore tested if the mutant might be defective in releasing Rpb1 from the chromatin. As such, we prepared chromatin fractions from the parent and the *rrd1* Δ mutant in the absence and presence of rapamycin and examined for the distribution of Rpb1 by immunoprecipitation using 8WG16 antibody. As shown in Fig. 6, a fraction of Rpb1 was easily extracted from the chromatin in the parent strain after 2 hours of rapamycin treatment (Fig. 6A, upper panel, lane 8). In contrast, and under the same conditions, no detectable Rpb1 was extracted from the chromatin of the *rrd1* Δ mutant (Fig. 6B, upper panel, lane 8). Quantitative analysis revealed that at least 35% of Rpb1 was extracted in the soluble chromatin fraction from the rapamycin treated parent, whereas significantly less (<5%) was extracted into the same fraction derived from the treated *rrd1* Δ mutant. This difference could not be attributed to a lower input used to perform the immunoprecipitation as staining a gel containing 10% of the total protein extracts from the input showed similar intensity across the samples (Fig. 6 A and B, lower panels). Similar results were obtained if the cell were treated with 4-NQO (data not shown). These data strongly suggest that Rrd1 plays a role in

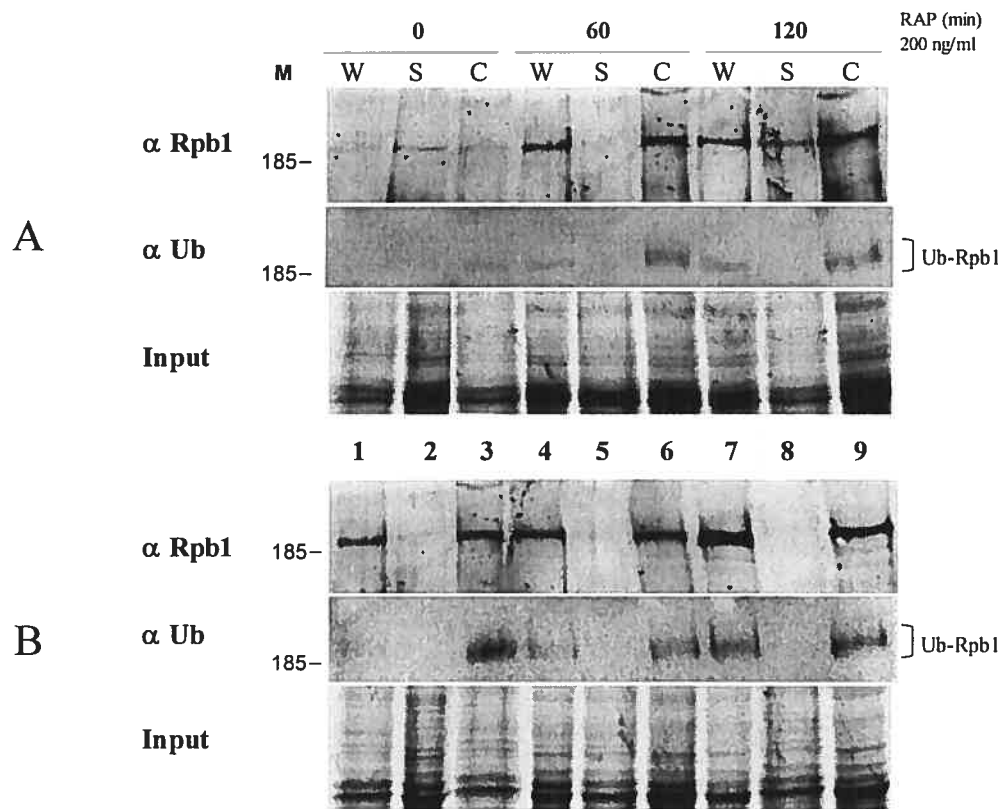


Figure 6: Rrd1 is required to release RNA polymerase II from the chromatin following rapamycin exposure.

Extraction of chromatin-associated proteins was done as described in Material and Methods from either the wild type (panel A) or *rrd1* Δ mutant cells (panel B). Distribution of RNA pol II was examined by immunoprecipitation of the fractions using anti-Rpb1 8WG16 antibody, followed by 6% SDS-PAGE and Western blot with 8WG16 antibody (A and B, top panels). The membranes were stripped and reprobed with anti-ubiquitin polyclonal antibodies to assess the form of the polymerase retained on the chromatin (A and B, middle panels). 10% of the total protein extracts used for the IP were loaded onto 6% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue to ensure that equal amount of proteins were used in the IP (A and B, lower panels). W, whole cell extract, S, soluble high salt fraction, C, chromatin high salt fraction. Representative results of three independent analyses.

triggering the release of Rpb1 from the chromatin. This phenomenon is not dependent upon the phosphorylation status of the CTD of Rpb1, as similar results were obtained with the H14 and 8WG16 antibodies, which detect the phosphorylated and unphosphorylated forms of Rpb1, respectively (JONES *et al.* 2004). We extend these observations to further suggest that it is unlikely that a major dephosphorylation process involving Rrd1 and its phosphatase interacting partner Sit4 play a role in the release of Rpb1 from the chromatin, as *sit4* Δ mutants are not resistant to rapamycin and do not accumulate Ub-Rpb1 (data not shown).

To demonstrate that the turnover of Ub-Rpb1 is dependant upon its release from the chromatin, the membranes were reprobbed with anti-ubiquitin polyclonal antibodies. As shown in Fig. 6 A and B, middle panel, the chromatin extracted from both the parent strain and the *rrd1* Δ mutant contained a significant amount of Ub-Rpb1 detectable after rapamycin treatment (lanes 6 and 9). These results suggest that the form of RNA pol II that is retained on the chromatin by the *rrd1* Δ mutant is the ubiquitinated form.

4.5.8 Rrd1 alters the structure of the CTD of RNA pol II in response to stress

While it has recently been shown that Rrd1 possesses an *in vitro* peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) activity on synthetic peptides (JORDENS *et al.* 2006b), no *in vivo* experiments were conducted to confirm this observation nor to identify *in vivo* targets of this activity. Since the CTD of Rpb1 is a repeated sequence

(YSPTSPS) rich in proline residues, and that it was previously shown to bind to the isomerase Ess1 or Pin1 (MORRIS *et al.* 1999), we reasoned that Rrd1 could function to isomerize the CTD such that the structure is altered triggering Rpb1 release from the chromatin.

To assess if the CTD of RNA pol II could be a substrate for the PPIase activity of Rrd1 *in vivo*, we first engineered a plasmid pGST-CTD to drive the expression of the CTD portion fused to GST. This design was facilitated by using a previously reported CTD, which consisted of 52 repeats of YSPTSPS and shown to be functional in many biological assays (BIENKIEWICZ *et al.* 2000; MOISAN *et al.* 2004; PETERSON *et al.* 1992). Introduction of the pGST-CTD plasmid into the parent and *rrd1* Δ mutant strains directed the expression of the expected size (95-kDa) of the GST-CTD fusion protein (Fig. 7A). No difference was observed in the size or pattern of expression of the GST-CTD, whether it was derived from the parent or the *rrd1* Δ mutant or from cells that were pretreated with rapamycin (Fig. 7A), supporting the notion that the CTD is not undergoing any significant changes in its phosphorylation status.

Since we hypothesized that CTD of RNA pol II could be a substrate for the PPIase activity of Rrd1, we investigated whether Rrd1 induces conformational changes in the GST-CTD fusion protein. To monitor this we utilized circular dichroism (CD) spectroscopy, a method that is very sensitive to changes in the secondary structure of polypeptides and proteins (FASMAN 1996). CD spectra

obtained for the purified GST-CTD derived from either the untreated parent or the untreated *rrd1Δ* mutant were indistinguishable, and displayed a minimum at 202 nm corresponding to a random coil structure (Fig. 7B). In contrast, the purified GST-CTD derived from the parent cells treated with rapamycin exhibited a spectrum with a minimum at 208 nm and shoulder at ~225 nm, typical of a protein with increased alpha-helical content (Fig. 7B). This structural alteration resulted in a form that was more resistant to limited chymotrypsin digestion consistent with a structural reorganization of the protein (Fig. 7E; see Material and Methods). Remarkably, the purified GST-CTD derived from the *rrd1Δ* mutant challenged with rapamycin produced a spectral pattern that showed no detectable difference as compared to the purified GST-CTD obtained from the untreated mutant cells (Fig. 7B). This observation was not limited to rapamycin treatment, as nearly identical data were obtained with purified GST-CTD derived from the parent and *rrd1Δ* mutant cells exposed to 4-NQO (Fig. 7C). In these experiments, 4-NQO also induced a shift from the random coil structure of GST-CTD to the more helical structure observed in the parent, but not in the *rrd1Δ* mutant, protein (Fig. 7C). In addition, GST-CTD showed no structural changes when derived from either the parent or the *rrd1Δ* mutant that was treated with a control DNA damaging agent methyl methane sulfonate (MMS) at the same equitoxic dose as 4-NQO (Fig. 7D). Unlike 4-NQO, MMS does not induce ubiquitination of Rpb1. We interpret these data to indicate that the CTD of RNA pol II is an *in vivo* target for the PPIase activity of Rrd1, which acts to trigger a structural change in the CTD in response to stress caused by rapamycin and the DNA damaging agent 4-NQO (see discussion).

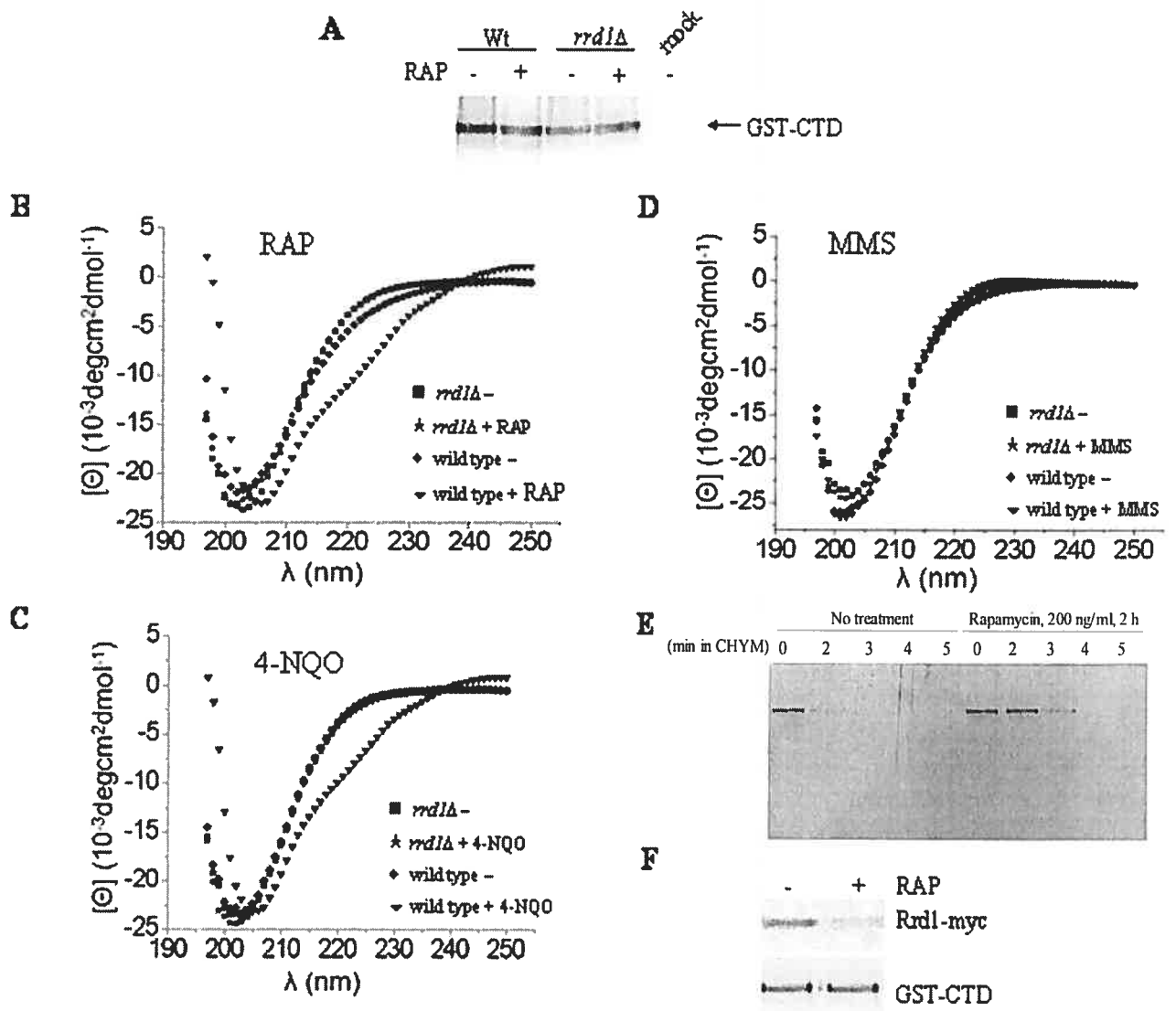


Figure 7: Rrd1 induces a conformational change in the C-terminal domain of RNA pol II upon specific stress conditions.

Figure 7: Rrd1 induces a conformational change in the C-terminal domain of RNA pol II upon specific stress conditions.

A) Western blot analysis of the expressed GST-CTD. Exponentially growing cells harbouring the pGST-CTD plasmid were either untreated or treated with rapamycin and total extracts were prepared and assessed for GST-CTD expression by Western blot using anti-GST antibodies. **B-D)** Far-UV circular dichroism spectral analysis of purified GST-CTD derived from cells exposed to different treatment conditions. GST-CTD was purified as in **(A)** from either wild type or *rrd1* Δ mutant that were untreated or treated with rapamycin (200 ng/ml, 120 min) **(B)**, or 4-NQO (2 μ g/ml for 30 min) **(C)** or MMS (1% for 60 min) **(D)**. Secondary structure content of purified samples was monitored using far-UV circular dichroism spectroscopy at room temperature using 4 μ M GST-CTD, 1mm path-length, 1 nm bandwidth and 1 nm resolution (see Materials and Methods). Results shown are the averages of two independent experiments. **E)** Limited proteolysis of purified GST-CTD derived from wild type cells untreated or treated with rapamycin. The purified GST-CTD was subjected to partial chymotrypsin digestion as described in Material and Methods. Samples were run on SDS-PAGE and stained by silver. **F)** Comparison of the retention of Rrd1-myc onto affinity columns composed of purified GST-CTD derived from wild type cells untreated or treated with rapamycin. Total extracts obtained from the wild type cells expressing Rrd1-myc was loaded onto the GST-CTD affinity columns. Following washing, the matrix was directly assessed for the retention of Rrd1-myc by Western blot using anti-Myc antibodies. Anti-GST was used to ensure that the affinity columns contained the same amount of GST-CTD.

We next tested if Rrd1 would interact with the modified GST-CTD. To carry out this experiment, we attached the purified GST-CTD derived from untreated and rapamycin treated cells onto separate GST –affinity columns followed by the addition of total extracts obtained from cells expressing the endogenous Rrd1-myc (see Materials and Methods). The columns were extensively washed and the beads were examined for the presence of the Rrd1-myc fusion protein. As shown in Fig. 7F, the column containing the purified GST-CTD derived from untreated cells trapped significant amount of the Rrd1-myc, as opposed to the column containing the modified form of the CTD obtained from rapamycin treated cells. This data strongly suggests that following the isomerization reaction, Rrd1 is released from the CTD.

4.5.9 Overexpression of the isomerase Ess1 partially substitutes for Rrd1

Ess1 is an essential protein in yeast and can be substituted by its conserved counterparts such as human Pin1 (BEAMISH *et al.* 1996; MALESZKA *et al.* 1996). It binds hyperphosphorylated CTD via its WW domain, and believed to isomerize the bond between Ser5 and Pro6 within the first half of the CTD in order to regulate the various stages of transcription (WU *et al.* 2003). We therefore tested if overproduction of Ess1 could complement the drug phenotypes of the *rrd1*Δ mutant. In this experiment, the multicopy plasmid pESS1 was introduced into both the parent and the *rrd1*Δ mutant and the resulting transformants were tested for increased resistance to 4-NQO using gradient plate assay (RAMOTAR *et al.* 1998; RAMOTAR and MASSON 1996). As shown in Fig. 8, introduction of pESS1 into the *rrd1*Δ mutant partially restored 4-NQO

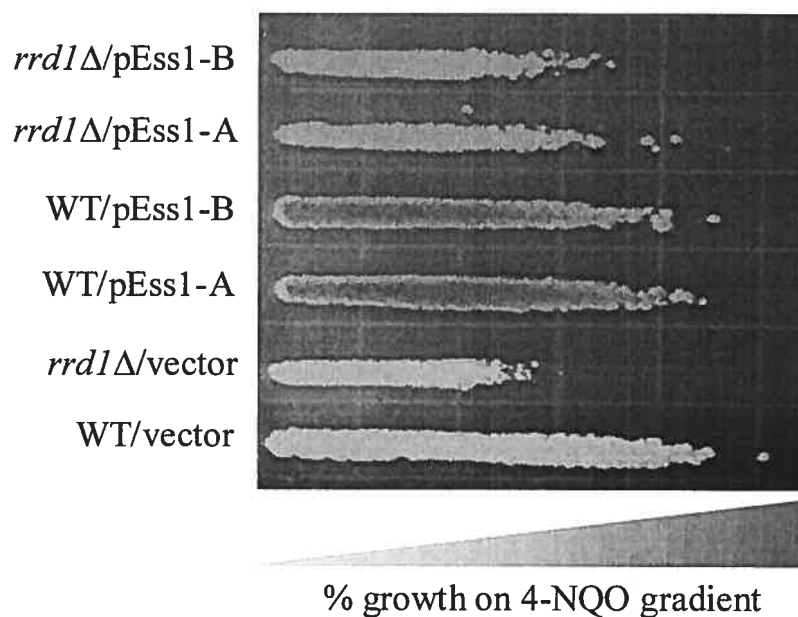


Figure 8: Increased *ESS1* gene dosage partially restores 4-NQO resistance to the *rrd1*Δ mutant.

Exponentially growing cells, strains CY4029 (WT) and DR500 (*rrd1*Δ) harbouring either the empty vector or the multicopy plasmid carrying the *ESS1* gene, were replicated onto a gradient where the bottom layer contained 15 μg of 4-NQO.

Growth along the gradient is considered to be 100%. Cells were photographed after 2 days of incubation at 30°C. The result is representative of two independent assays.

resistance, when compared to the resistance exhibited by the parent. This observation is consistent with Rrd1 functioning as an isomerase *in vivo*. The partial 4-NQO-resistance displayed by the *rrd1* Δ mutant carrying the pESS1 might be explained if both Ess1 and Rrd1 carry out independent biological functions or possess different substrate specificity.

4.6 DISCUSSION

In this study, we demonstrated that the phosphatase activator Rrd1, which possesses a *cis/trans* isomerase activity, interacts with several proteins including the large subunit of RNA pol II, Rpb1. This novel interaction of Rrd1 with Rpb1 serves to permit isomerization of the CTD, a key step that appears necessary to trigger the release of stalled RNA pol II from the chromatin for degradation under specific stress conditions. Our results therefore provide the first direct evidence that Rrd1 acts *in vivo* as an isomerase, and moreover establish a physiological function for this activity. There is a distinct possibility that the isomerase activity of Rrd1 could act on other substrates resulting in additional biological functions, as shown for the human Pin1 *cis/trans* isomerase which can associate with many targets including the CTD and c-Fos (MONJE *et al.* 2005; VERDECIA *et al.* 2000). These substrates may reside already within the Rrd1-TAP complex, which contains several proteins in addition to transcriptional factors (e.g., TFIIE) and the phosphatase Sit4.

The steps involving ubiquitination and degradation of stalled RNA pol II appear to be intact in the *rrd1* Δ mutant when the cells are exposed, for example, to known DNA damaging agents such as 254nm UVC and H₂O₂ that trigger these processes (BEAUDENON *et al.* 1999; BREGMAN *et al.* 1996; INUKAI *et al.* 2004; JUNG and LIPPARD 2006). While 4-NQO is also known to elicit these events in parental cells, the degradation of stalled RNA pol II was hindered in the *rrd1* Δ mutant. We reasoned that this impediment is due to the defective release of the stalled RNA pol II

from the chromatin in the *rrd1* Δ mutant. As such, we believe that the inability to evict stalled RNA pol II from the chromatin is a direct cause of the mutant sensitivity to 4-NQO. At the moment, it is unclear why 4-NQO, but not 254nm UVC or H₂O₂, -induced lesions would require the function of the Rrd1 isomerase to remove stalled RNA pol II. One possible explanation might reside in the type of lesions encountered by RNA pol II, as 4-NQO creates primarily bulky lesions at the exocyclic N2 and N6 positions of guanine and adenine, respectively, while 254nm UVC produces helix distorting lesions (e.g., pyrimidine dimers) (FRIEDBERG *et al.* 1995; GALIEGUE-ZOUITINA *et al.* 1986). We have not explored whether the *rrd1* Δ mutant is specifically sensitive to an array of DNA damaging agents that create only bulky lesions. Nonetheless, a more provocative issue is to determine the sensory mechanism that communicates with Rrd1 such that it proceeds to isomerize the CTD in response to the stalled RNA pol II.

Interestingly, our data also reveal for the first time that rapamycin can mimic the events of DNA damaging agents by triggering ubiquitination and degradation of Rpb1 in parent cells. So far, there is no evidence that rapamycin is a DNA damaging agent that can create RNA pol II blocking lesions, and thus the drug must activate ubiquitination of Rpb1 via a different mechanism. Rapamycin has been shown to induce expression of starvation genes, and to cause a drastic reduction, e.g., of the expression of ribosomal protein genes (HARDWICK *et al.* 1999; POWERS and WALTER 1999). Therefore, rapamycin-induced ubiquitination of Rpb1 followed by its degradation would seem to be a very efficient strategy to rapidly shut down the high

energy requirement of expressing unnecessary genes. However, the challenging task that lies ahead is to determine how rapamycin signals ubiquitination of RNA pol II. One possibility is that starvation conditions induced by rapamycin may lower the pool of nucleosides triphosphate and cause stalling of the transcriptional machinery. Indeed, nucleotide starvation has been shown to cause RNA pol II ubiquitination and degradation (YANG *et al.* 2003). Moreover, it is noteworthy that rapamycin has been reported to inhibit the intracellular transport of nucleoside (Huang *et al.*, 2003). There is no reason to suspect that rapamycin might act directly (as in the case of α -amanitin) to inhibit elongation of transcription by RNA pol II and to promote its degradation (NGUYEN *et al.* 1996). If so, the ribosomal gene expression pattern would have been equally affected in both the parent and the *rrd1* Δ mutant following rapamycin exposure, but this is not the case (DOUVILLE *et al.* 2006).

Our recent observation that *rrd1* Δ mutants were defective in down-regulating a subset of ribosomal genes upon rapamycin treatment may now be explained in the context of the present findings (DOUVILLE *et al.* 2006). We believe that the fraction of Ub-Rpb1 remained bound to the chromatin in the *rrd1* Δ mutant is capable of continuing transcription such that it bypasses the growth arrest signal induced by rapamycin. In fact, a recent study demonstrated that Ub-Rpb1 stalled at cisplatin-induced lesions in the DNA can resume transcription if the block is removed (JUNG and LIPPARD 2006).

In addition to Rrd1, there is one other closely related isomerase Rrd2, which we previously shown to functionally substitute for Rrd1 in protecting cells against 4-NQO exposure (JORDENS *et al.* 2006b; RAMOTAR *et al.* 1998). Since there is a modest loss of Rpb1 in the *rrd1* Δ mutant following rapamycin or 4-NQO treatment, we suggest that it could be mediated by the Rrd2 isomerase activity (Fig. 4). Thus, the reported synthetic lethal phenotype of the *rrd1* Δ *rrd2* Δ double mutant might be caused by a complete loss of isomerase activity resulting in a substantial accumulation of stalled RNA pol II arising, for example, at sites of spontaneous DNA lesions. At the moment, we cannot test this possibility as temperature-sensitive alleles of either *RRD1* or *RRD2* have not yet been created. Nonetheless, we note that the single *rrd1* Δ mutant possesses a higher level of Ub-Rbp1 in the absence of any drug challenges (Fig. 5).

It is noteworthy that during the final preparation of this manuscript, a 1.6 Å resolution crystal structure of the human PTPA was reported (MAGNUSDOTTIR *et al.* 2006). However, the investigators could not detect any significant binding of the crystal or obtain co-crystallization structure with peptides corresponding to Glu188-Glu192 of PP2A bearing the scissile proline (Pro190) suggested to be isomerized by hPTPA (JORDENS *et al.* 2006b). At the same time, another group reported the crystal structure of hPTPA as well as of Rrd1 and Rrd2 (Leuillot *et al.*, 2006). CocrySTALLISATION attempts with the same short substrate peptide were successful only with Rrd1, suggesting that a better suited ligand existed (Leuillot *et al.*, 2006). On the basis of our findings, we suggest that the CTD heptad sequence YSPTSPS might

prove to be the relevant peptide binding to hPTPA in crystal soaks. In fact, X-ray crystallography revealed that the *cis/trans* proline isomerase Pin1 can bind to a single heptad sequence phosphorylated at both Ser 2 and 5, and which has been performed to understand the structural basis of how the WW domain of Pin1 recognizes phosphoserine-proline containing proteins (VERDECIA *et al.* 2000). Other proteins that bind to the CTD such as the capping enzyme, guanylyltransferase (Ctg1) and a component of the mRNA cleavage factor 1A (Pcf11) make specific contact with only two repeats or two overlapping repeats, respectively (FABREGA *et al.* 2003; NOBLE *et al.* 2005).

The CTD does not exist in a preformed state, but largely in the disordered structure which adopts a static conformation upon interaction with target proteins such as the Mediator complex that regulates transcription initiation, histone methyltransferases, as well as enzymes that modify the 5' and 3'-ends of mRNA (HAMPSEY and REINBERG 2003; HE *et al.* 2003). Binding of these proteins to the CTD is dictated by at least three features, Ser phosphorylation, proline isomerization, and the existence of a multitude of interaction sites (NOBLE *et al.* 2005). A given heptad repeat could give rise to sixteen different conformations with the various combination of phosphorylated Ser 2 and 5 and the *cis/trans* isomerization of the two prolines (BURATOWSKI 2003). Far many more conformations would be expected when considering the full length CTD and the possibility of additional conformations arising from combining the repeats. These various combinations dubbed the CTD code could generate an impressive diversity of binding sites and allow precise and dynamic association with various factors. At least three CTD interacting proteins

(Pcf1, Pin1 and Ctg-1 from *C. albicans*) have been shown to bind exclusively the all-*trans* conformer, providing support for the hypothesis that proline isomerization of the CTD plays a key regulatory role (BURATOWSKI 2003). We documented here that this role is fulfilled in part by the isomerase activity of Rrd1. We extend this finding to suggest that following the isomerization reaction, Rrd1 is displaced as it only binds weakly to the isomerized CTD (Fig. 7).

Although we presented the first *in vivo* evidence that the CTD of RNA pol II undergoes Rrd1-dependent conformational isomerization, and that this is required to enable the eviction of the polymerase from the chromatin, several questions remain unanswered: (i) What is the underlying mechanism by which the specific DNA damaging agent 4-NQO, and not MMS, signals Rrd1 to act on the CTD? (ii) Is there any post-translational modification of Rrd1, induced by either 4-NQO or rapamycin, such that it increases specificity towards the CTD? (iii) How does Rrd1 scan the CTD to switch the *cis* isomers to *trans* and does the phosphorylation of Ser 2 or 5 influences this role? and (iv) Does generation of the *trans* isomers serves as a platform to recruit specialized proteins to evict RNA pol II from the chromatin? These and other questions will be addressed in future studies to better understand the molecular mechanism of Rrd1 action on the CTD.

4.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Annie Moisan and Luc Gaudreau for providing us with the GST-CTD vector and the many antibodies used in this study, as well as for their useful comments. We also thank Nathalie Jouvét for providing Figure 2A. We would like to thank Ivan Topisirovic for assistance with the circular dichroism analysis performed at IRIC and supported by a grant from the CFI. We would also like to thank Katherine Borden, Elliot Drobetsky and Xiang-jiao Yang for careful reading of the manuscript. This work was supported by a grant (#) from the Canadian Institutes of Health Research to D.R.

4.8 REFERENCES

- Beamish, H., R. Williams, P. Chen, K.K. Khanna, K. Hobson, D. Watters, Y. Shiloh, and M. Lavin. 1996. Rapamycin resistance in ataxia-telangiectasia. *Oncogene* **13**: 963-70.
- Beaudenon, S.L., M.R. Huacani, G. Wang, D.P. McDonnell, and J.M. Huibregtse. 1999. Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 6972-9.
- Beck, T. and M.N. Hall. 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-92.
- Bienkiewicz, E.A., A. Moon Woody, and R.W. Woody. 2000. Conformation of the RNA polymerase II C-terminal domain: circular dichroism of long and short fragments. *J Mol Biol* **297**: 119-33.
- Bregman, D.B., R. Halaban, A.J. van Gool, K.A. Henning, E.C. Friedberg, and S.L. Warren. 1996. UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11586-90.
- Buratowski, S. 2003. The CTD code. *Nat Struct Biol* **10**: 679-80.
- Cayla, X., J. Goris, J. Hermann, P. Hendrix, R. Ozon, and W. Merlevede. 1990. Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activator from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry* **29**: 658-67.
- Cayla, X., C. Van Hoof, M. Bosch, E. Waelkens, J. Vandekerckhove, B. Peeters, W. Merlevede, and J. Goris. 1994. Molecular cloning, expression, and

le cas du 4-nitroquinoline-1-oxide, un inhibiteur de l'activité de la tyrosine phosphatase combinée à l'activité de la phosphatase 2A. *J Biol Chem* **269**: 15668-75.

Crespo, J.L. and M.N. Hall. 2002. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 579-91, table of contents.

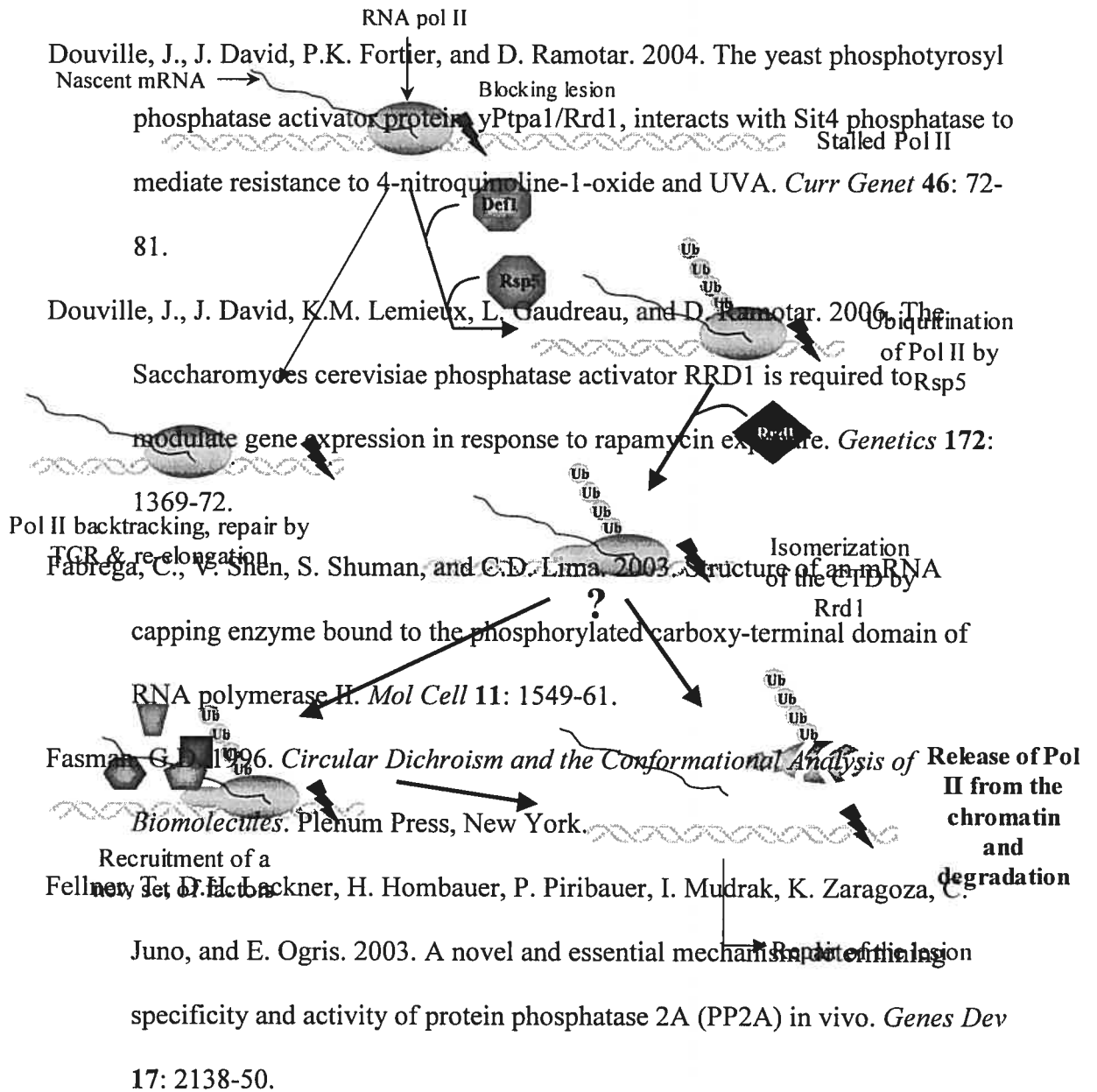


Figure 1 : Modèle illustrant le rôle de Rrd1 dans le déplacement de l'ARN polymérase II bloquée pendant l'élongation

- Fischer, G., H. Bang, E. Berger, and A. Schellenberger. 1984. Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim Biophys Acta* **791**: 87-97.
- Friedberg, E.C., G.C. Walker, and W. Siede. 1995. DNA Repair and Mutagenesis. In. ASM Press, Washington, D.C.
- Galiegue-Zouitina, S., B. Bailleul, Y.M. Ginot, B. Perly, P. Vigny, and M.H. Loucheux-Lefebvre. 1986. N2-guanyl and N6-adenyl arylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res* **46**: 1858-63.
- Hampsey, M. and D. Reinberg. 2003. Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* **113**: 429-32.
- Hardwick, J.S., F.G. Kuruvilla, J.K. Tong, A.F. Shamji, and S.L. Schreiber. 1999. Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14866-70.
- He, X., A.U. Khan, H. Cheng, D.L. Pappas, Jr., M. Hampsey, and C.L. Moore. 2003. Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1. *Genes Dev* **17**: 1030-42.
- Heitman, J., N.R. Movva, and M.N. Hall. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-9.
- Huang, M., Y. Wang, S.B. Cogut, B.S. Mitchell, and L.M. Graves. 2003. Inhibition of nucleoside transport by protein kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* **304**: 753-60.

- Inukai, N., Y. Yamaguchi, I. Kuraoka, T. Yamada, S. Kamijo, J. Kato, K. Tanaka, and H. Handa. 2004. A novel hydrogen peroxide-induced phosphorylation and ubiquitination pathway leading to RNA polymerase II proteolysis. *J Biol Chem* **279**: 8190-5.
- Janssens, V., C. Van Hoof, W. Merlevede, and J. Goris. 1998. PTPA regulating PP2A as a dual specificity phosphatase. *Methods Mol Biol* **93**: 103-15.
- Jones, J.C., H.P. Phatnani, T.A. Haystead, J.A. MacDonald, S.M. Alam, and A.L. Greenleaf. 2004. C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J Biol Chem* **279**: 24957-64.
- Jordens, J., V. Janssens, S. Longin, I. Stevens, E. Martens, G. Bultynck, Y. Engelborghs, E. Lescrinier, E. Waelkens, J. Goris, and C. Van Hoof. 2006. The Protein Phosphatase 2A Phosphatase Activator Is a Novel Peptidyl-Prolyl cis/trans-Isomerase. *J Biol Chem* **281**: 6349-6357.
- Jung, Y. and S.J. Lippard. 2006. RNA polymerase II blockage by cisplatin-damaged DNA. Stability and polyubiquitylation of stalled polymerase. *J Biol Chem* **281**: 1361-70.
- Lee, D.H. and A.L. Goldberg. 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**: 397-403.
- Lee, T.I. and R.A. Young. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* **34**: 77-137.
- Leulliot, N., G. Vicentini, J. Jordens, S. Quevillon-Cheruel, M. Schiltz, D. Barford, H. van Tilbeurgh, and J. Goris. 2006. Crystal structure of the PP2A

- phosphatase activator: implications for its PP2A-specific PPIase activity. *Mol Cell Biol* **23**: 413-24.
- Luke, M.M., F. Della Seta, C.J. Di Como, H. Sugimoto, R. Kobayashi, and K.T. Arndt. 1996. The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol Cell Biol* **16**: 2744-55.
- Magnusdottir, A., P. Stenmark, S. Flodin, T. Nyman, M. Hammarstrom, M. Ehn, H.M. Bakali, H. Berglund, and P. Nordlund. 2006. The crystal structure of a human PP2A phosphatase activator reveals a novel fold and highly conserved cleft implicated in protein-protein interactions. *J Biol Chem*.
- Maleszka, R., S.D. Hanes, R.L. Hackett, H.G. de Couet, and G.L. Miklos. 1996. The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 447-51.
- Mitchell, D.A. and G.F. Sprague, Jr. 2001. The phosphotyrosyl phosphatase activator, Ncs1p (Rrd1p), functions with Cla4p to regulate the G(2)/M transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 488-500.
- Moisan, A., C. Larochele, B. Guillemette, and L. Gaudreau. 2004. BRCA1 can modulate RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation levels. *Mol Cell Biol* **24**: 6947-56.
- Monje, P., J. Hernandez-Losa, R.J. Lyons, M.D. Castellone, and J.S. Gutkind. 2005. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem* **280**: 35081-4.

- Morris, D.P., H.P. Phatnani, and A.L. Greenleaf. 1999. Phospho-carboxyl-terminal domain binding and the role of a prolyl isomerase in pre-mRNA 3'-End formation. *J Biol Chem* **274**: 31583-7.
- Nguyen, V.T., F. Giannoni, M.F. Dubois, S.J. Seo, M. Vigneron, C. Keding, and O. Bensaude. 1996. In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res* **24**: 2924-9.
- Noble, C.G., D. Hollingworth, S.R. Martin, V. Ennis-Adeniran, S.J. Smerdon, G. Kelly, I.A. Taylor, and A. Ramos. 2005. Key features of the interaction between Pcf11 CID and RNA polymerase II CTD. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 144-51.
- Peterson, S.R., A. Dvir, C.W. Anderson, and W.S. Dynan. 1992. DNA binding provides a signal for phosphorylation of the RNA polymerase II heptapeptide repeats. *Genes Dev* **6**: 426-38.
- Powers, T. and P. Walter. 1999. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 987-1000.
- Ramotar, D., E. Belanger, I. Brodeur, J.Y. Masson, and E.A. Drobetsky. 1998. A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Biol Chem* **273**: 21489-96.
- Ramotar, D. and J.Y. Masson. 1996. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant defines a new locus essential for resistance to the antitumour drug bleomycin. *Can J Microbiol* **42**: 835-43.

- Ratner, J.N., B. Balasubramanian, J. Corden, S.L. Warren, and D.B. Bregman. 1998. Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem* **273**: 5184-9.
- Rempola, B., A. Kaniak, A. Migdalski, J. Rytka, P.P. Slonimski, and J.P. di Rago. 2000. Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **262**: 1081-92.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**: 1030-2.
- Rohde, J., J. Heitman, and M.E. Cardenas. 2001. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem* **276**: 9583-6. Epub 2001 Feb 2.
- Schmelzle, T., T. Beck, D.E. Martin, and M.N. Hall. 2004. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* **24**: 338-51.
- Schmid, F.X. 1995. Protein folding. Prolyl isomerases join the fold. *Curr Biol* **5**: 993-4.
- Svejstrup, J.Q., T.G. Petrakis, and J. Fellows. 2003. Purification of elongating RNA polymerase II and other factors from yeast chromatin. *Methods Enzymol* **371**: 491-8.
- Van Hoof, C., E. Martens, S. Longin, J. Jordens, I. Stevens, V. Janssens, and J. Goris. 2005. Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *Biochem J* **386**: 93-102.

- Verdecia, M.A., M.E. Bowman, K.P. Lu, T. Hunter, and J.P. Noel. 2000. Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol* **7**: 639-43.
- Vongsamphanh, R., P.K. Fortier, and D. Ramotar. 2001. Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Mol Cell Biol* **21**: 1647-55.
- Wu, X., A. Rossetini, and S.D. Hanes. 2003. The ESS1 prolyl isomerase and its suppressor BYE1 interact with RNA pol II to inhibit transcription elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**: 1687-702.
- Yang, L.Y., H. Jiang, and K.M. Rangel. 2003. RNA polymerase II stalled on a DNA template during transcription elongation is ubiquitinated and the ubiquitination facilitates displacement of the elongation complex. *Int J Oncol* **22**: 683-9.
- Zheng, Y. and Y. Jiang. 2005a. The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator is part of the Tap42-phosphatase complexes. *Mol Biol Cell* **16**: 2119-27.

Chapitre 5

DISCUSSION

5 DISCUSSION

5.1 INTERACTION SIT4-RRD1: RÔLE BIOLOGIQUE

À la lumière des résultats présentés dans les articles 2 et 3, il apparaît nécessaire de revoir les conclusions tirées dans le premier article. Puisque Rrd1 et Sit4 agissent à l'unisson pour médier la protection cellulaire contre les dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif, et prenant en considération les résultats de Jordens et al. (2006), il est probable que Rrd1 active Sit4 via l'isomérisation de la proline 187. Cette activation apparaît essentielle pour la réponse au stress oxydatif puisque la délétion indépendante de *RRD1* ou *SIT4* confère aux cellules une hypersensibilité au dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif. De plus, la délétion combinée des deux gènes n'entraîne pas une sensibilité plus grande, indiquant que les deux protéines fonctionnent de concert.

L'activation de Sit4 semble faire partie d'une voie distincte de la voie de dégradation des polymérase bloquées. En effet, il est peu probable que Sit4 agisse sur l'ARN pol II ou sur son CTD, puisque le statut de phosphorylation de celui-ci ne paraît pas jouer de rôle prépondérant dans le processus de dégagement de la polymérase de la chromatine. De plus, les expériences de dichromisme circulaire présentées dans le troisième article démontrent clairement que Rrd1 agit seul sur le CTD. En addition, les mutants *sit4* Δ ne sont pas résistants à la rapamycine, une autre indication de la dualité des fonctions de Rrd1 (J. Douville et D. Ramotar, données non publiées).

Sit4 doit donc avoir d'autres cibles cellulaires via lesquelles la réponse au stress oxydatif est médiée. Il est intéressant de noter que Sit4 est impliqué dans la transcription de plusieurs gènes, et des mutations dans *SIT4* sont synthétique létales avec des mutations dans *RPB1* et *RPB2*, suggérant un rôle général potentiel pour Sit4 dans la régulation de la transcription (ARNDT *et al.* 1989; SUTTON *et al.* 1991). Il est donc plausible que l'activation de Sit4 par Rrd1 serve à permettre l'expression de gènes essentiels pour la réparation des dommages induits par le stress oxydatif. À cet égard, les protéines Sap, partenaires de Sit4, pourraient jouer un rôle clé. En effet, il a été démontré que les protéines Sap étaient impliquées dans la transcription de gènes dont l'expression est régulée par la voie TOR (ROHDE *et al.* 2004).

Une étude a démontré que Sit4 était relié à la fonction du protéasome. En effet, une mutation de *SIT4* combinée à une mutation rendant le protéasome inactif pour la protéolyse est synthétique létale (SINGER *et al.* 2003). Toutefois, Sit4 n'est pas une cible pour la protéolyse via le protéasome, et Sit4 ne contrôle pas directement l'activité du protéasome (SINGER *et al.* 2003). Cette étude rapporte aussi qu'une souche portant une mutation sur la cystéine 51 de Sit4 devient résistante à un traitement à la rapamycine, contrairement à une souche portant une délétion complète du gène qui est hypersensible à cet agent. Il s'agit d'une observation troublante, puisque les résultats présentés dans cet article démontrent que la fonction de Sit4 est liée à la voie d'ubiquitination par Ubc2/Ubc3, alors que la dégradation de l'ARN pol II en réponse à l'irradiation aux UV passe par la voie Ubc5 (SINGER *et al.* 2003; SOMESH *et al.* 2005). Par ailleurs, initialement on a identifié Rsp5 comme étant l'ubiquitine ligase responsable d'attacher les résidus ubiquitine sur l'ARN pol II en

réponse aux UV, mais récemment on a attribué le même rôle à Elc1. Il y aurait donc plus d'une ubiquitine ligase ciblant l'ARN pol II (BEAUDENON *et al.* 1999; RIBAR *et al.* 2006). De plus, il a été rapporté qu'au moins deux voies différentes existent pour l'ubiquitination et la protéolyse de l'ARN pol II, et la voie empruntée semble dépendre du type de lésions bloquant la polymérase (INUKAI *et al.* 2004). Il est donc envisageable que toutes les voies médiant l'ubiquitination de l'ARN pol II n'aient pas encore été caractérisées, et Sit4 est peut-être impliqué dans l'une d'elles. Cette possibilité pourrait être facilement testée en traitant des cellules mutantes pour Sit4 à la rapamycine ou au 4-NQO et en vérifiant si la polymérase est ubiquitinée et dégradée dans ces cellules de la même façon que dans des cellules sauvages.

5.2 ARRÊT DE L'ARN POLYMERASE II PAR LA RAPAMYCINE

Une des questions intéressantes soulevées par l'article 3 concerne l'effet de la rapamycine sur l'ARN pol II. En effet, le phénomène de protéolyse de l'ARN pol II est assez bien caractérisé dans le cas de la réponse aux agents qui entravent la progression de l'enzyme, principalement les UV, le 4-NQO, le cisplatine, l' α -amanitine et le peroxyde d'hydrogène, par contre la rapamycine ne semble pas directement endommager l'ADN (J. Douville et D. Ramotar, données non publiées).

Il est connu que la rapamycine a comme cible intracellulaire la protéine FKBP12 (HEITMAN *et al.* 1991) C'est le complexe FKBP12-rapamycine qui inactive les kinases Tor. Il est intéressant de noter que tout comme Rrd1, FKBP12 est une

peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase. Il est donc possible, en théorie, que la rapamycine reconnaisse un segment de la séquence en acides aminés présent dans les deux protéines, ou encore une structure commune. La rapamycine pourrait ainsi lier Rrd1 et l'inactiver, ce qui rendrait les cellules plus sensibles aux dommages endogènes spontanés. Cependant, cette situation serait comparable à ce qu'on retrouve dans une souche mutante pour Rrd1. Bien qu'il est possible d'envisager que les lésions spontanées bloquent l'ARN pol II et provoquent éventuellement un arrêt de la transcription assez important pour mener à l'arrêt du cycle cellulaire en G1, ce modèle n'explique pas pourquoi les mutants *rrd1Δ* sont résistants à la rapamycine. La seule explication plausible serait si on considère qu'il existe une différence dans une souche *rrd1Δ* comparativement à une souche sauvage où Rrd1 est subitement inactivé. Il est possible que dans une souche où Rrd1 est absent, les cellules favorisent un mécanisme de bypass des lésions par l'ARN pol II, ce qui permet à la transcription de se poursuivre et évite l'arrêt des cellules en G1. Dans des cellules où Rrd1 serait brusquement inactivé, les protéines nécessaires pour le bypass des lésions ne sont peut-être pas présentes en quantité suffisante pour permettre le bypass de toutes les lésions spontanées, ce qui amène un blocage de l'ARN pol II, qui ne peut être déplacée de la chromatine, entraînant un arrêt de la transcription et l'arrêt subséquent en G1 du cycle cellulaire. Cependant, plusieurs arguments affaiblissent ce modèle. Premièrement, il existe très peu d'homologie entre Rrd1 et FKBP12, et la liaison de la rapamycine à cette dernière est très bien caractérisée. De plus, selon la littérature publiée à ce sujet, FKBP12 est la seule protéine liée par la rapamycine. La rapamycine semble donc cibler de façon très spécifique FKBP12. Également, la

modification du profil transcriptionnel en réponse à la rapamycine n'est pas aléatoire comme on pourrait s'y attendre si l'ARN pol II est bloquée par des lésions endogènes, qui peuvent se produire un peu partout dans le génome. La rapamycine va plutôt induire des changements ordonnés dans des familles de gènes, plus représentatifs d'une situation où la cellule ajuste son métabolisme d'une façon organisée en réponse au traitement. Ce modèle apparaît donc difficilement probable.

L'inactivation de la voie TOR par la rapamycine peut provoquer un changement dans la conformation ou dans l'activité d'une protéine liant l'ADN, provoquant la liaison irréversible de la protéine sur l'ADN. Le complexe protéine-ADN peut représenter un obstacle bloquant la progression de l'ARN pol II. En liant l'isomérase FKBP12, la rapamycine bloque la fonction de cette dernière (HEITMAN *et al.* 1991). Il est donc possible que certaines protéines substrats de FKBP12 n'adoptent plus la bonne conformation afin de leur permettre d'être recrutées sur l'ADN puis relâchées au moment opportun. Il a d'ailleurs été démontré que FKBP12 interagissait avec le facteur de transcription YY1, une protéine à doigts de zinc qui régule positivement et négativement la transcription en liant le promoteur de plusieurs gènes (YANG *et al.* 1995). De plus, un autre article a rapporté l'interaction de FKBP12 avec Hmo1, une protéine de la famille HMG (High Mobility Group) (DOLINSKI and HEITMAN 1999). Les protéines du groupe HMG sont des protéines qui lient la chromatine avec très peu de spécificité de séquence, reconnaissant plutôt des structures dans l'ADN comme les repliements, les structures cruciformes et l'ADN simple-brin, et sont impliquées dans la régulation de la structure de la chromatine, la réplication et la transcription (DOLINSKI and HEITMAN 1999). Les

résultats présentés dans cette étude suggèrent que FKBP12 régule l'oligomérisation de Hmo1 et/ou l'interaction de Hmo1 avec l'ADN, et l'interaction FKBP12-Hmo1 est bloquée par l'ajout de FK506, un autre inhibiteur de FKBP12 (DOLINSKI and HEITMAN 1999). L'ensemble de ces observations font de Hmo1 un excellent candidat pour être piégé de façon permanente sur l'ADN lorsque FKBP12 est inhibé par la rapamycine, bloquant le passage subséquent de l'ARN pol II. Des études supplémentaires seraient requises pour mieux tester cette hypothèse, par exemple traiter les cellules à la rapamycine, puis faire une immunoprécipitation de la chromatine avec des anticorps contre l'ARN polymérase II et Hmo1. En faisant des PCR sur un certain nombre de gènes, on pourrait voir si il y a enrichissement pour l'ARN pol II aux sites où Hmo1 est piégé.

Tel que mentionné dans la discussion du troisième article, une autre hypothèse est que les conditions de carence nutritionnelle mimées par la rapamycine provoque une baisse du pool de nucléotides, entraînant par conséquent l'arrêt de l'élongation de la transcription. Deux études appuient cette possibilité. Dans la première, on démontre que le transport intracellulaire de [³H]uridine et de [³H]thymidine est réduit de façon dose-dépendante dans des cellules traitées à la rapamycine (HUANG *et al.* 2003). La seconde est une étude où on a établi le profil transcriptionnel de lymphocytes humains et murins en réponse à la rapamycine. Les résultats obtenus révèlent que plusieurs gènes de biosynthèse *de novo* des nucléotides sont downrégulés (PENG *et al.* 2002). Cette étude est également en accord avec l'étude de Hardwick *et al.*, qui ont établi le profil transcriptionnel de la levure en réponse à la rapamycine (HARDWICK *et al.* 1999). Puisqu'il a été démontré que la déprivation en

nucléotides induit l'ubiquitination de l'ARN pol II et dans un système de transcription *in vitro*, cette hypothèse est hautement plausible (YANG *et al.* 2003). On pourrait tester la validité de ce modèle *in vivo* en construisant des mutants thermosensibles pour les gènes terminaux de biosynthèse des nucléotides et en vérifiant si l'ARN pol II est ubiquitinée et dégradée suite à l'incubation des souches à la température restrictive. On pourrait par la suite combiner ces mutations avec une mutation *rrd1Δ* et comparer les résultats obtenus avec une souche simple mutant *rrd1Δ* traitée à la rapamycine pour vérifier si la déplétion en nucléotides provoque un blocage de la l'ARN pol II qui est susceptible d'être pris en charge par Rrd1.

5.3 LE RÔLE DE RRD1 DÉPEND DU TYPE DE LÉSIONS

Une observation qui demeure troublante est que le mutant *rrd1Δ* est fonctionnel pour l'ubiquitination et la dégradation subséquente de l'ARN pol II suite à un traitement aux UVC et au H₂O₂. Bien que ce résultat soit en accord avec le fait que les mutants *rrd1Δ* présentent une sensibilité parentale aux UVC et au H₂O₂, le mécanisme par lequel Rrd1 est actif dans certains cas et dispensable dans d'autres n'est pas clair. Il semblerait que le type de lésions joue un rôle prépondérant puisque les agents testés induisent des lésions fondamentalement différentes. Le 4-NQO doit être activé métaboliquement sous la forme de 4-(hydroxyamino)quinoline 1-oxide (4-HAQO) pour pouvoir réagir avec l'ADN. Les principales lésions formées sont des adduits 3-(N2-guanyl)-4-aminoquinoline 1-oxide (N2-guanine) à 50%, N-(guan-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide (C8-guanine) à 30% et 3-(N6-adenyl)-4-

aminoquinoline 1-oxide (N6-adenyl) à 10% (GALIEGUE-ZOUITINA *et al.* 1986; GALIEGUE-ZOUITINA *et al.* 1985). Les UVC produisent quant à eux deux types de dommages très bien caractérisés : les dimères cyclobutane pyrimidines (CPD) et les photoproduits 6-4 pyrimidine pyrimidone (6-4PP). Il s'agit de deux lésions encombrantes, cependant les photoproduits 6-4 produisent une distorsion beaucoup plus importante de l'hélice d'ADN (HANAWALT 2002). Il est envisageable que bien que toutes ces lésions bloquent l'élongation de la l'ARN pol II, différents facteurs soient requis selon le type de dommage exact afin de supporter les étapes subséquentes permettant la réparation. Par exemple, une lésion très encombrante comme celles générées par les UV requiert peut-être que la l'ARN pol II recrute une autre isomérase que Rrd1, parce qu'elle n'est possiblement pas piégée de la même façon sur la chromatine. Dans le cas de la rapamycine, puisque l'événement initial provoquant l'arrêt de la l'ARN pol II n'est pas connu, il est difficile de voir si ce modèle s'applique. Cependant, si l'on considère que la rapamycine induit soit une déplétion du pool de nucléotides ou soit la liaison irréversible d'une protéine sur l'ADN, il s'agit là de deux situations où l'encombrement sur l'ADN est plutôt faible. Il semble donc que Rrd1 soit requis pour déloger l'ARN pol II qui est arrêtée par des lésions relativement peu encombrante, mais qui bloquent la progression de l'ARN polymérase II. Par ailleurs, une lésion telle que celles générées par le peroxyde d'hydrogène ne requiert peut-être pas Rrd1 parce que le dommage se situe principalement au niveau de la base, ne distorsionne pas l'hélice, et la plupart du temps l'ARN pol II n'est même pas arrêtée par ce type de lésion. De fait, le mutant *rrd1Δ* n'est pas sensible à cet agent. Il a d'ailleurs été rapporté que l'ubiquitination et

la protéolyse de l'ARN pol II en réponse au H₂O₂ se faisait par un mécanisme distinct de celui impliqué dans la réponse aux UV (INUKAI *et al.* 2004). De plus, les résultats de dichromisme circulaire que nous avons obtenus suite à un traitement au MMS montrent qu'il n'y a pas de changement dans la conformation du CTD. Ces observations sont aussi en accord avec le modèle puisque le type de lésions générées par le MMS ne cause pas de blocage de l'ARN pol II, ni de sensibilité particulière chez le mutant *rrd1Δ*. Finalement, l'essai de complémentation du mutant *rrd1Δ* avec un plasmide exprimant l'isomérase Ess1 n'a permis de corriger que partiellement les phénotypes, ce qui argumente en faveur de la possibilité que différentes isomérases sont requises pour faire face aux polymérases bloquées par des types de lésions variés. Il serait bien sûr fort intéressant de cribler plus spécifiquement le comportement du mutant *rrd1Δ* face à chaque agent qui est connu pour induire l'ubiquitination et la protéolyse de l'ARN polymérase II (cisplatine, α -amanitine, déplétion en nucléotide). On pourrait ainsi mieux définir la gamme de lésions qui requièrent Rrd1 pour isomériser le CTD.

5.4 ÉJECTION DE L'ARN POLYMÉRISE II BLOQUÉE SUR L'ADN

Les résultats présentés dans le troisième article montrent que l'ARN pol II ubiquitinée reste piégée sur la chromatine dans les extraits provenant du mutant *rrd1Δ*. Ce blocage est corrélé avec l'incapacité du mutant à isomériser le CTD de l'ARN pol II. Une question intéressante à poser est que se passe-t-il suite à l'isomérisation ? Quelles sont les étapes suivantes qui permettent à la polymérase

d'être délogée de son site de blocage sur la chromatine ? Il existe deux hypothèses principales. Premièrement, il est possible que l'isomérisation du CTD change les sites de reconnaissance sur le CTD, et provoque le détachement de certains facteurs et le recrutement d'autres facteurs. Cette hypothèse est directement dérivée de la proposition de Buratowski (2003), qui suggère que l'isomérisation du CTD ajoute un autre niveau de complexité au code du CTD, permettant le recrutement spécifique d'un plus grand nombre de facteurs (BURATOWSKI 2003). Un des nouveaux facteurs recrutés pourrait provoquer le détachement de l'ARN pol II de la chromatine. L'autre possibilité est que le changement de conformation du CTD induit par l'isomérisation altère directement l'affinité de l'ARN pol II pour la chromatine, provoquant du même coup le relâchement passif de la polymérase. Afin de tester ces deux hypothèses, il serait intéressant de purifier dans des conditions natives le CTD isomérisé par Rrd1 et d'identifier les facteurs qui co-purifient avec le CTD. En comparant ces partenaires avec ceux obtenus d'une purification du CTD non isomérisé, on pourrait déterminer si un ou des nouveaux facteurs sont associés au CTD suite à l'isomérisation.

5.5 RÔLES ALTERNATIFS DE L'UBIQUITINATION

La polyubiquitination via la lysine 48 de l'ubiquine signale la dégradation protéosomale de la chaîne polypeptique modifiée. Cependant, d'autres modifications post-traductionnelles par l'ubiquitine, soit la monoubiquitination et la polyubiquitination via d'autres résidus lysine stimulent des voies de signalisation bien distinctes de la dégradation protéique. Il a par ailleurs été démontré que l'ubiquitination de l'ARN pol II en réponse aux dommages à l'ADN pouvait se faire

via différents résidus lysine, soit la Lys-6, la Lys-48 et la Lys-63 (JUNG and LIPPARD 2006). Plusieurs ubiquitine ligases pourraient ainsi agir sur l'ARN pol II, affectant non seulement sa demi-vie mais également sa stabilité et/ou son activité (NISHIKAWA *et al.* 2004). Il a été suggéré que les différentes chaînes de polyubiquitines ajoutées sur l'ARN pol II suite à un dommage à l'ADN pouvaient varier en fonction de l'environnement de l'ARN pol II bloquée, mais les conséquences de ces modifications ne sont pas encore bien comprises (JUNG and LIPPARD 2006) Nos études n'ont pas directement adressé cette question, cependant il serait intéressant de revoir les résultats présentés dans le second article à la lumière de ces récentes observations. En effet, en plus d'observer que la rapamycine induisait la dégradation Rrd1-dépendante de l'ARN pol II, nous avons vu que certains gènes étaient uprégulés différemment dans la souche *rrd1*Δ suite à une exposition à la rapamycine. Ce phénomène peut être expliqué par l'hypothèse que la rapamycine provoque différents types de polyubiquitination sur l'ARN pol II, et que selon l'environnement précis de chaque gène un type particulier de polyubiquitination est favorisé. Ainsi, dans certains cas la polyubiquitination pourrait influencer l'activité de l'ARN polymérase plutôt que provoquer sa dégradation, menant ainsi à l'uprégulation spécifique de certains gènes.

5.6 RÔLE ALTERNATIF DE RRD1

Les résultats présentés dans le troisième article suggèrent que Rrd1 catalyse l'isomérisation de l'ARN pol II bloquée sur la chromatine, permettant son

déplacement et sa dégradation subséquente. Puisque l'étape de relâchement de l'ARN pol II bloquée et ubiquitinée n'avait pas encore été caractérisée, cette conclusion quant au rôle de Rrd1 semble la plus évidente. Cependant, nos études ne permettent pas d'éliminer une seconde possibilité. En effet, il est envisageable que l'isomérisation de l'ARN pol II par Rrd1 se produise suite au relâchement et serve plutôt à altérer la conformation de la polymérase afin que celle-ci soit plus efficacement clivée lors de sa dégradation. Il est connu que la structure tertiaire d'une protéine influence grandement sa sensibilité à la digestion par des protéases, et les expériences que nous avons réalisées ne permettent pas d'éliminer complètement cette possibilité puisqu'il nous a été impossible d'évaluer la conformation de l'ARN pol II directement sur la chromatine.

5.7 COMPLEXITÉ DE LA VOIE DE SIGNALISATION

La voie de signalisation menant à l'ubiquitination suivie de la dégradation de l'ARN pol II est plus complexe qu'il n'y paraît au premier abord, et fait appel à des facteurs qui n'ont été que brièvement mentionnés dans cette thèse. Cependant, leur rôle n'en demeure pas moins capital lorsqu'on envisage de façon globale les conséquences d'un arrêt prolongé de l'ARN pol II lors de la transcription. La protéine Def1, dont la fonction moléculaire est inconnue, est un facteur de dégradation de l'ARN pol II en réponse aux dommages. On sait toutefois que les mutants de Def1 sont incapables d'ubiquitiner et de dégrader la polymérase suivant un traitement aux UV, ce qui suggère que Def1 fonctionne dans la même voie que Rrd1 (WOUDSTRA *et al.* 2002). Par ailleurs, Rsp5 est une ubiquitine ligase dont un

des substrats est Rpb1, et cette protéine est requise pour l'ubiquitination de l'ARN pol II en réponse aux dommages à l'ADN (BEAUDENON *et al.* 1999). *RSP5* est un gène essentiel, mais des allèles thermosensibles ont été créés et sont maintenant disponibles (e.g., *rsp5-1*). Afin de démontrer clairement que ces trois protéines agissent de concert dans une voie alternative au TCR, il serait intéressant de tester la résistance des mutants *rsp5-1* et *def1* à la rapamycine. En principe, ces deux mutants devraient présenter la même résistance à la rapamycine que le mutant *rrd1* Δ , tout comme des mutants doubles *rrd1* Δ *def1* Δ et *rrd1* Δ *rsp5-1*.

5.8 MODÈLE PROPOSÉ

La page suivante présente un modèle simplifié du rôle cellulaire de Rrd1 proposé par l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de mon projet de recherche. Brièvement, lorsque l'élongation de la transcription est bloquée par la rapamycine ou par une lésion induite par le 4-NQO, si la cellule ne peut recourir au TCR pour déplacer l'ARN pol II et éliminer la cause du blocage, les facteurs de la voie d'ubiquitination sont recrutés afin de marquer l'ARN polymérase II pour la dégradation. Suite à l'ubiquitination de l'ARN pol II, Rrd1 catalyse l'isomérisation du CTD pour permettre soit le relâchement passif de l'ARN pol II du site de dommage, soit le recrutement de facteurs spécifiques qui délogent la polymérase du site de blocage. L'ARN polymérase II sera par la suite dégradée par le protéasome. Ainsi, dans le cas d'un traitement à la rapamycine, la transcription est interrompue afin de permettre à la cellule de s'adapter aux nouvelles conditions du milieu. Dans

le cas du 4-NQO, ce mécanisme permet à la cellule d'éliminer les dommages encombrants qui bloquent la transcription.

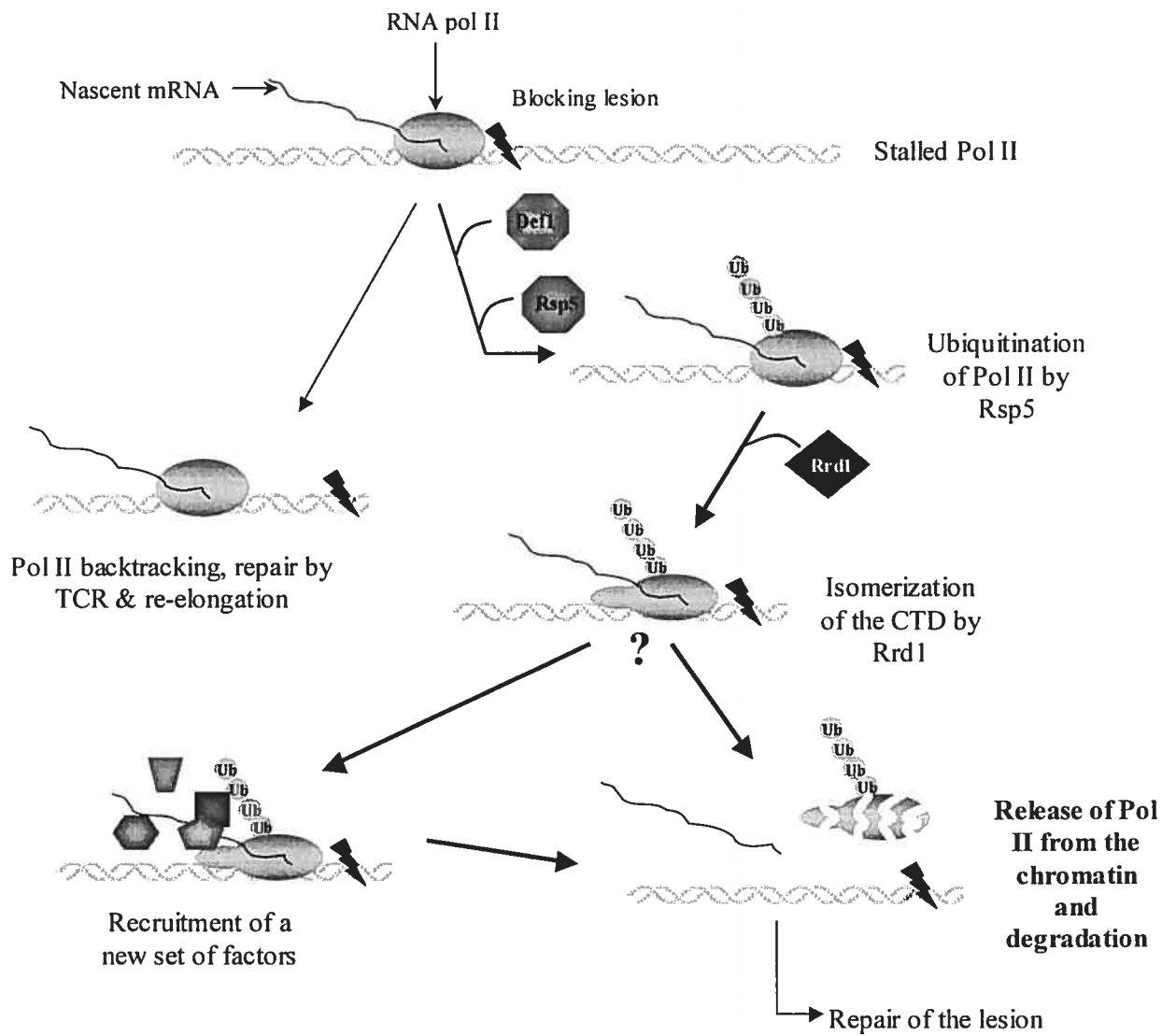


Figure 1 : Modèle illustrant le rôle de Rrd1 dans le déplacement de l'ARN polymérase II bloquée pendant l'élongation

6 CONCLUSION

L'intégrité du génome est constamment menacée par des dommages causés par des sources endogènes aussi bien qu'exogènes. Afin d'assurer un transfert fidèle de l'information génétique aux générations futures, il est essentiel pour la cellule de rigoureusement vérifier que chaque mutation ne passe pas inaperçue. Plusieurs mécanismes sont apparus au cours de l'évolution pour limiter les conséquences délétères des dommages à l'ADN. Puisque la transcription est l'un des processus les plus fréquents impliquant la lecture de l'information génétique, il n'est pas étonnant de constater que ce mécanisme joue également un rôle prépondérant dans la détection et la signalisation des dommages à l'ADN. Il s'agit d'un moyen efficace pour la cellule de contrôler l'intégrité de son ADN, en plus de constituer une mesure de la sévérité des dommages et de déterminer si le dommage sera réparé ou si la mort cellulaire doit être enclenchée.

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que lorsque l'ARN pol II ne trouve pas de moyen pour éliminer le blocage qu'elle rencontre au cours de l'élongation de la transcription, un mécanisme différent est initié. Ce processus alternatif permet de prévenir des dommages encore plus grands qui seraient causés par des collisions entre le complexe transcriptionnel arrêté et d'autres complexes actifs sur le même gène, ou encore avec une fourche de réplication. Nous avons démontré que ce processus survenait non seulement dans le cas de certaines lésions encombrantes comme celles induites par le 4-NQO, mais aussi dans le cas où la transcription est interrompue par la rapamycine, un agent qui n'endommage pas

directement l'ADN. Nous avons démontré que suite à l'ubiquitination de l'ARN polymérase II bloquée, celle-ci doit être déplacée de la chromatine, et ce déplacement dépend de la fonction de Rrd1. En isomérisant le CTD de l'ARN pol II, Rrd1 permet le dégagement de la chromatine, soit pour interrompre définitivement la transcription dans le cas d'un traitement à la rapamycine, soit pour réparer le dommage causé par un traitement au 4-NQO.

Les implications de nos découvertes sont grandes. Premièrement, pour la première fois, nous proposons un modèle pour expliquer la fonction cellulaire de Rrd1. Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec les plus récentes publications sur la biochimie de Rrd1, qui proposaient que Rrd1 agissait comme une isomérase *in vivo*. De plus, bien que l'isomérisation du CTD était généralement acceptée dans la littérature, nous présentons la première démonstration de ce phénomène *in vivo*. Par ailleurs, nous avons également pu établir au moins deux situations dans lesquelles cette isomérisation est importante pour le fonctionnement cellulaire, et nous proposons pour la première fois un rôle pour l'isomérisation du CTD dans la réponse aux dommages à l'ADN.

En terminant, il est important de mentionner que les mécanismes explorés dans cette thèse sont très bien conservés dans les cellules de mammifères. Nos résultats suggèrent que l'homologue humain de Rrd1, hPTPA, pourrait jouer le même rôle chez l'humain, et ainsi prévenir la carcinogénèse induite par le stress oxydatif, notamment l'exposition aux rayons solaires.

7 RÉFÉRENCES

- AHN, S. H., M. KIM and S. BURATOWSKI, 2004 Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* **13**: 67-76.
- ALBIG, A. R., and C. J. DECKER, 2001 The target of rapamycin signaling pathway regulates mRNA turnover in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **12**: 3428-3438.
- ARINO, J., C. W. WOON, D. L. BRAUTIGAN, T. B. MILLER, JR. and G. L. JOHNSON, 1988 Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunit isotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4252-4256.
- ARNDT, K. T., C. A. STYLES and G. R. FINK, 1989 A suppressor of a HIS4 transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell* **56**: 527-537.
- BEAMISH, H., R. WILLIAMS, P. CHEN, K. K. KHANNA, K. HOBSON *et al.*, 1996 Rapamycin resistance in ataxia-telangiectasia. *Oncogene* **13**: 963-970.
- BEAUDENON, S. L., M. R. HUACANI, G. WANG, D. P. McDONNELL and J. M. HUIBREGTSE, 1999 Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 6972-6979.
- BECK, T., and M. N. HALL, 1999 The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692.

- BECK, T., A. SCHMIDT and M. N. HALL, 1999 Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J Cell Biol* **146**: 1227-1238.
- BERSET, C., H. TRACHSEL and M. ALTMANN, 1998 The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4264-4269.
- BIENKIEWICZ, E. A., A. MOON WOODY and R. W. WOODY, 2000 Conformation of the RNA polymerase II C-terminal domain: circular dichroism of long and short fragments. *J Mol Biol* **297**: 119-133.
- BJORNSTI, M. A., and P. J. HOUGHTON, 2004 The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**: 335-348.
- BOOTSMA, D., KRAEMER, K.H., CLEAVER, J., HOEIJMAKERS, J.H.J., 1998 Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy., pp. 245-274 in *The Genetic Basis of Human Cancer*, edited by B. VOGELSTEIN, KINZLER, K.W. McGraw-Hill, New York.
- BREGMAN, D. B., R. HALABAN, A. J. VAN GOOL, K. A. HENNING, E. C. FRIEDBERG *et al.*, 1996 UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11586-11590.
- BURATOWSKI, S., 2003 The CTD code. *Nat Struct Biol* **10**: 679-680.
- CARDENAS, M. E., N. S. CUTLER, M. C. LORENZ, C. J. DI COMO and J. HEITMAN, 1999 The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev* **13**: 3271-3279.

- CAYLA, X., J. GORIS, J. HERMANN, P. HENDRIX, R. OZON *et al.*, 1990 Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activator from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry* **29**: 658-667.
- CAYLA, X., C. VAN HOOF, M. BOSCH, E. WAEKENS, J. VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1994a Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **269**: 15668-15675.
- CAYLA, X., C. VAN HOOF, M. BOSCH, E. WAEKENS, J. VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1994b Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **269**: 15668-15675.
- CHAMBERS, R. S., B. Q. WANG, Z. F. BURTON and M. E. DAHMUS, 1995 The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J Biol Chem* **270**: 14962-14969.
- CHAN, T. F., J. CARVALHO, L. RILES and X. F. ZHENG, 2000 A chemical genomics approach toward understanding the global functions of the target of rapamycin protein (TOR). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13227-13232.
- CHEN, R. H., V. M. MAHER, J. BROUWER, P. VAN DE PUTTE and J. J. MCCORMICK, 1992 Preferential repair and strand-specific repair of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in the HPRT gene of diploid human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5413-5417.
- CHERNOFF, J., H. C. LI, Y. S. CHENG and L. B. CHEN, 1983 Characterization of a phosphotyrosyl protein phosphatase activity associated with a phosphoseryl

- protein phosphatase of Mr = 95,000 from bovine heart. *J Biol Chem* **258**: 7852-7857.
- CHO, H., T. K. KIM, H. MANCEBO, W. S. LANE, O. FLORES *et al.*, 1999 A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev* **13**: 1540-1552.
- COHEN, P. T., N. D. BREWIS, V. HUGHES and D. J. MANN, 1990 Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett* **268**: 355-359.
- CONAWAY, J. W., A. SHILATIFARD, A. DVIR and R. C. CONAWAY, 2000 Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **25**: 375-380.
- CONAWAY, R. C., S. E. KONG and J. W. CONAWAY, 2003 TFIIS and GreB: two like-minded transcription elongation factors with sticky fingers. *Cell* **114**: 272-274.
- CONNELLY, S., and J. L. MANLEY, 1988 A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes Dev* **2**: 440-452.
- COOPER, P. K., T. NOUSPIKEL and S. G. CLARKSON, 2005 Retraction. *Science* **308**: 1740.
- COOPER, P. K., T. NOUSPIKEL, S. G. CLARKSON and S. A. LEADON, 1997 Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science* **275**: 990-993.
- CORDEN, J. L., 1990 Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **15**: 383-387.
- CRESPO, J. L., and M. N. HALL, 2002 Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 579-591, table of contents.

- CRESPO, J. L., T. POWERS, B. FOWLER and M. N. HALL, 2002 The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6784-6789.
- DE LA MATA, M., C. R. ALONSO, S. KADENER, J. P. FEDEDA, M. BLAUSTEIN *et al.*, 2003 A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol Cell* **12**: 525-532.
- DE LAAT, W. L., N. G. JASPERS and J. H. HOEIJMAKERS, 1999 Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**: 768-785.
- DI COMO, C. J., and K. T. ARNDT, 1996 Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev* **10**: 1904-1916.
- DOLINSKI, K. J., and J. HEITMAN, 1999 Hmo1p, a high mobility group 1/2 homolog, genetically and physically interacts with the yeast FKBP12 prolyl isomerase. *Genetics* **151**: 935-944.
- DONAHUE, B. A., S. YIN, J. S. TAYLOR, D. REINES and P. C. HANAWALT, 1994 Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8502-8506.
- DOUVILLE, J., J. DAVID, P. K. FORTIER and D. RAMOTAR, 2004 The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator protein, yPtpa1/Rrd1, interacts with Sit4 phosphatase to mediate resistance to 4-nitroquinoline-1-oxide and UVA. *Curr Genet* **46**: 72-81.
- DOUVILLE, J., J. DAVID, K. M. LEMIEUX, L. GAUDREAU and D. RAMOTAR, 2006 The *Saccharomyces cerevisiae* phosphatase activator RRD1 is required to

- modulate gene expression in response to rapamycin exposure. *Genetics* **172**: 1369-1372.
- DUMONT, F. J., M. J. STARUCH, S. L. KOPRAK, M. R. MELINO and N. H. SIGAL, 1990
Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol* **144**: 251-258.
- EISEN, J. A., K. S. SWEDER and P. C. HANAWALT, 1995 Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res* **23**: 2715-2723.
- FABREGA, C., V. SHEN, S. SHUMAN and C. D. LIMA, 2003 Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* **11**: 1549-1561.
- FASMAN, G. D., 1996 *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Plenum Press, New York.
- FELLNER, T., D. H. LACKNER, H. HOMBAUER, P. PIRIBAUER, I. MUDRAK *et al.*, 2003a
A novel and essential mechanism determining specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo. *Genes Dev* **17**: 2138-2150.
- FELLNER, T., D. H. LACKNER, H. HOMBAUER, P. PIRIBAUER, I. MUDRAK *et al.*, 2003b
A novel and essential mechanism determining specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo. *Genes Dev* **17**: 2138-2150.
- FERNANDEZ-SARABIA, M. J., A. SUTTON, T. ZHONG and K. T. ARNDT, 1992 SIT4 protein phosphatase is required for the normal accumulation of SWI4, CLN1, CLN2, and HCS26 RNAs during late G1. *Genes Dev* **6**: 2417-2428.

- FISCHER, G., H. BANG, E. BERGER and A. SCHELLENBERGER, 1984 Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim Biophys Acta* **791**: 87-97.
- FRIEDBERG, E. C., G. C. WALKER and W. SIEDE (Editors), 1995 *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, D.C.
- GALIEGUE-ZOUITINA, S., B. BAILLEUL, Y. M. GINOT, B. PERLY, P. VIGNY *et al.*, 1986 N2-guanyl and N6-adenyl arylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res* **46**: 1858-1863.
- GALIEGUE-ZOUITINA, S., B. BAILLEUL and M. H. LOUCHEUX-LEFEBVRE, 1985 Adducts from in vivo action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats and from in vitro reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. *Cancer Res* **45**: 520-525.
- GARCIA, A., X. CAYLA and E. SONTAG, 2000 Protein phosphatase 2A: a definite player in viral and parasitic regulation. *Microbes Infect* **2**: 401-407.
- GERBER, H. P., M. HAGMANN, K. SEIPEL, O. GEORGIEV, M. A. WEST *et al.*, 1995 RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* **374**: 660-662.
- GOWEN, L. C., A. V. AVRUTSKAYA, A. M. LATOUR, B. H. KOLLER and S. A. LEADON, 1998 BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science* **281**: 1009-1012.
- GOWEN, L. C., A. V. AVRUTSKAYA, A. M. LATOUR, B. H. KOLLER and S. A. LEADON, 2003 Retraction. *Science* **300**: 1657.

- GU, W., and D. REINES, 1995 Identification of a decay in transcription potential that results in elongation factor dependence of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **270**: 11238-11244.
- HAMPSEY, M., and D. REINBERG, 2003 Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* **113**: 429-432.
- HANAWALT, P. C., 2002 Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* **21**: 8949-8956.
- HARDWICK, J. S., F. G. KURUVILLA, J. K. TONG, A. F. SHAMJI and S. L. SCHREIBER, 1999 Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14866-14870.
- HE, X., A. U. KHAN, H. CHENG, D. L. PAPPAS, JR., M. HAMPSEY *et al.*, 2003 Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1. *Genes Dev* **17**: 1030-1042.
- HEALY, A. M., S. ZOLNIEROWICZ, A. E. STAPLETON, M. GOEBL, A. A. DEPAOLI-ROACH *et al.*, 1991 CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol Cell Biol* **11**: 5767-5780.
- HEITMAN, J., N. R. MOVVA and M. N. HALL, 1991 Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-909.

- HEMMINGS, B. A., C. ADAMS-PEARSON, F. MAURER, P. MULLER, J. GORIS *et al.*, 1990
alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a
similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry* **29**: 3166-3173.
- HIROSE, Y., R. TACKE and J. L. MANLEY, 1999 Phosphorylated RNA polymerase II
stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **13**: 1234-1239.
- HOEIJMAKERS, J. H., 1993 Nucleotide excision repair I: from *E. coli* to yeast. *Trends*
Genet **9**: 173-177.
- HOUCHEMS, D. P., A. A. OVEJERA, S. M. RIBLET and D. E. SLAGEL, 1983 Human
brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *Eur J Cancer*
Clin Oncol **19**: 799-805.
- HUANG, M., Y. WANG, S. B. COGUT, B. S. MITCHELL and L. M. GRAVES, 2003
Inhibition of nucleoside transport by protein kinase inhibitors. *J Pharmacol*
Exp Ther **304**: 753-760.
- INUKAI, N., Y. YAMAGUCHI, I. KURAOKA, T. YAMADA, S. KAMIJO *et al.*, 2004 A
novel hydrogen peroxide-induced phosphorylation and ubiquitination pathway
leading to RNA polymerase II proteolysis. *J Biol Chem* **279**: 8190-8195.
- JANSSENS, V., and J. GORIS, 2001 Protein phosphatase 2A: a highly regulated family
of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling.
Biochem J **353**: 417-439.
- JANSSENS, V., C. VAN HOOF, W. MERLEVEDE and J. GORIS, 1998 PTPA regulating
PP2A as a dual specificity phosphatase. *Methods Mol Biol* **93**: 103-115.
- JIANG, Y., 2006 Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in
Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 440-449.

- JIANG, Y., and J. R. BROACH, 1999a Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *Embo J* **18**: 2782-2792.
- JIANG, Y., and J. R. BROACH, 1999b Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *Embo J* **18**: 2782-2792.
- JONES, J. C., H. P. PHATNANI, T. A. HAYSTEAD, J. A. MACDONALD, S. M. ALAM *et al.*, 2004 C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J Biol Chem* **279**: 24957-24964.
- JONES, J. C., W. P. ZHEN, E. REED, R. J. PARKER, A. SANCAR *et al.*, 1991 Gene-specific formation and repair of cisplatin intrastrand adducts and interstrand cross-links in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **266**: 7101-7107.
- JORDENS, J., V. JANSSENS, S. LONGIN, I. STEVENS, E. MARTENS *et al.*, 2006a The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol Chem* **281**: 6349-6357.
- JORDENS, J., V. JANSSENS, S. LONGIN, I. STEVENS, E. MARTENS *et al.*, 2006b The Protein Phosphatase 2A Phosphatase Activator Is a Novel Peptidyl-Prolyl cis/trans-Isomerase. *J Biol Chem* **281**: 6349-6357.
- JUNG, Y., and S. J. LIPPARD, 2006 RNA polymerase II blockage by cisplatin-damaged DNA. Stability and polyubiquitylation of stalled polymerase. *J Biol Chem* **281**: 1361-1370.
- JURICA, M. S., and M. J. MOORE, 2003 Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell* **12**: 5-14.

- KARAIKOU, A., C. JESSUS, T. BRASSAC and R. OZON, 1999 Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci* **112 (Pt 21)**: 3747-3756.
- KETTENBERGER, H., K. J. ARMACHE and P. CRAMER, 2003 Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* **114**: 347-357.
- KHEW-GOODALL, Y., R. E. MAYER, F. MAURER, S. R. STONE and B. A. HEMMINGS, 1991 Structure and transcriptional regulation of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes. *Biochemistry* **30**: 89-97.
- 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.
- KREMMER, E., K. OHST, J. KIEFER, N. BREWIS and G. WALTER, 1997 Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol Cell Biol* **17**: 1692-1701.
- KRISHNAMURTHY, S., X. HE, M. REYES-REYES, C. MOORE and M. HAMPSEY, 2004 Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol Cell* **14**: 387-394.
- KUMAR, K. P., S. AKOULITCHEV and D. REINBERG, 1998 Promoter-proximal stalling results from the inability to recruit transcription factor IIH to the transcription complex and is a regulated event. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9767-9772.
- LE PAGE, F., E. E. KWOH, A. AVRUTSKAYA, A. GENTIL, S. A. LEADON *et al.*, 2000 Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* **101**: 159-171.

- LE PAGE, F., E. E. KWOH, A. AVRUTSKAYA, A. GENTIL, S. A. LEADON *et al.*, 2005
Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH,
and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* **123**: 711.
- LEADON, S. A., and P. K. COOPER, 1993 Preferential repair of ionizing radiation-
induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective
in Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10499-10503.
- LEE, D. H., and A. L. GOLDBERG, 1998 Proteasome inhibitors: valuable new tools for
cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**: 397-403.
- LEE, K. B., D. WANG, S. J. LIPPARD and P. A. SHARP, 2002 Transcription-coupled and
DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro. *Proc
Natl Acad Sci U S A* **99**: 4239-4244.
- LEE, T. I., and R. A. YOUNG, 2000 Transcription of eukaryotic protein-coding genes.
Annu Rev Genet **34**: 77-137.
- LEHMANN, A. R., 2003 DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum,
Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **85**: 1101-1111.
- LEULLIOT, N., G. VICENTINI, J. JORDENS, S. QUEVILLON-CHERUEL, M. SCHILTZ *et al.*,
2006 Crystal Structure of the PP2A Phosphatase Activator: Implications for
Its PP2A-Specific PPIase Activity. *Mol Cell* **23**: 413-424.
- LICATALOSI, D. D., G. GEIGER, M. MINET, S. SCHROEDER, K. CILLI *et al.*, 2002
Functional interaction of yeast pre-mRNA 3' end processing factors with RNA
polymerase II. *Mol Cell* **9**: 1101-1111.
- LIN, P. S., M. F. DUBOIS and M. E. DAHMUS, 2002a TFIIIF-associating carboxyl-
terminal domain phosphatase dephosphorylates phosphoserines 2 and 5 of
RNA polymerase II. *J Biol Chem* **277**: 45949-45956.

- LIN, P. S., N. F. MARSHALL and M. E. DAHMUS, 2002b CTD phosphatase: role in RNA polymerase II cycling and the regulation of transcript elongation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 333-365.
- LIN, X. H., J. WALTER, K. SCHEIDTMANN, K. OHST, J. NEWPORT *et al.*, 1998 Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14693-14698.
- LOGAN, J., E. FALCK-PEDERSEN, J. E. DARNELL, JR. and T. SHENK, 1987 A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8306-8310.
- LOMMEL, L., M. E. BUCHELI and K. S. SWEDER, 2000 Transcription-coupled repair in yeast is independent from ubiquitylation of RNA pol II: implications for Cockayne's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9088-9092.
- LONGIN, S., J. JORDENS, E. MARTENS, I. STEVENS, V. JANSSENS *et al.*, 2004 An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methylesterase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator. *Biochem J* **380**: 111-119.
- LUKE, M. M., F. DELLA SETA, C. J. DI COMO, H. SUGIMOTO, R. KOBAYASHI *et al.*, 1996 The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol Cell Biol* **16**: 2744-2755.
- MAGNUSDOTTIR, A., P. STENMARK, S. FLODIN, T. NYMAN, M. HAMMARSTROM *et al.*, 2006 The crystal structure of a human PP2A phosphatase activator reveals a novel fold and highly conserved cleft implicated in protein-protein interactions. *J Biol Chem*.

- MALESZKA, R., S. D. HANES, R. L. HACKETT, H. G. DE COUET and G. L. MIKLOS, 1996 The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 447-451.
- MAYER-JAEKEL, R. E., and B. A. HEMMINGS, 1994 Protein phosphatase 2A--a 'menage a trois'. *Trends Cell Biol* **4**: 287-291.
- MAYER, R. E., P. HENDRIX, P. CRON, R. MATTHIES, S. R. STONE *et al.*, 1991 Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform. *Biochemistry* **30**: 3589-3597.
- MEINHART, A., T. KAMENSKI, S. HOEPPNER, S. BAUMLI and P. CRAMER, 2005 A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* **19**: 1401-1415.
- MELLON, I., 2005 Transcription-coupled repair: a complex affair. *Mutat Res* **577**: 155-161.
- MELLON, I., and P. C. HANAWALT, 1989 Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* **342**: 95-98.
- MELLON, I., G. SPIVAK and P. C. HANAWALT, 1987 Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* **51**: 241-249.
- MERMOUD, J. E., P. T. COHEN and A. I. LAMOND, 1994 Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *Embo J* **13**: 5679-5688.
- MEWES, H. W., K. HEUMANN, A. KAPS, K. MAYER, F. PFEIFFER *et al.*, 1999 MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res* **27**: 44-48.

- MISTELI, T., J. F. CACERES and D. L. SPECTOR, 1997 The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* **387**: 523-527.
- MITCHELL, D. A., and G. F. SPRAGUE, JR., 2001 The phosphotyrosyl phosphatase activator, Ncs1p (Rrd1p), functions with Cla4p to regulate the G(2)/M transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 488-500.
- MITCHELL, J. R., J. H. HOEIJMAKERS and L. J. NIEDERNHOFER, 2003 Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 232-240.
- MOISAN, A., C. LAROCHELLE, B. GUILLEMETTE and L. GAUDREAU, 2004 BRCA1 can modulate RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation levels. *Mol Cell Biol* **24**: 6947-6956.
- MONJE, P., J. HERNANDEZ-LOSA, R. J. LYONS, M. D. CASTELLONE and J. S. GUTKIND, 2005 Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem* **280**: 35081-35084.
- MORRIS, D. P., H. P. PHATNANI and A. L. GREENLEAF, 1999 Phospho-carboxyl-terminal domain binding and the role of a prolyl isomerase in pre-mRNA 3'-End formation. *J Biol Chem* **274**: 31583-31587.
- MOTEKI, S., and D. PRICE, 2002 Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Mol Cell* **10**: 599-609.
- NANCE, M. A., and S. A. BERRY, 1992 Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet* **42**: 68-84.
- NEUMAN, K. C., E. A. ABBONDANZIERI, R. LANDICK, J. GELLES and S. M. BLOCK, 2003 Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell* **115**: 437-447.

- NGUYEN, V. T., F. GIANNONI, M. F. DUBOIS, S. J. SEO, M. VIGNERON *et al.*, 1996 In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res* **24**: 2924-2929.
- NISHIKAWA, H., S. OOKA, K. SATO, K. ARIMA, J. OKAMOTO *et al.*, 2004 Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**: 3916-3924.
- NOBLE, C. G., D. HOLLINGWORTH, S. R. MARTIN, V. ENNIS-ADENIRAN, S. J. SMERDON *et al.*, 2005 Key features of the interaction between Pcf11 CID and RNA polymerase II CTD. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 144-151.
- NUNOSHIBA, T., and B. DEMPLE, 1993 Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res* **53**: 3250-3252.
- ORPHANIDES, G., and D. REINBERG, 2000 RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* **407**: 471-475.
- ORPHANIDES, G., and D. REINBERG, 2002 A unified theory of gene expression. *Cell* **108**: 439-451.
- PARK, J. S., M. T. MARR and J. W. ROBERTS, 2002 E. coli Transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation. *Cell* **109**: 757-767.
- PAYNE, J. M., and M. E. DAHMUS, 1993 Partial purification and characterization of two distinct protein kinases that differentially phosphorylate the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase subunit IIa. *J Biol Chem* **268**: 80-87.

- PENG, T., T. R. GOLUB and D. M. SABATINI, 2002 The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol Cell Biol* **22**: 5575-5584.
- PETERSON, S. R., A. DVIR, C. W. ANDERSON and W. S. DYNAN, 1992 DNA binding provides a signal for phosphorylation of the RNA polymerase II heptapeptide repeats. *Genes Dev* **6**: 426-438.
- POWERS, T., and P. WALTER, 1999 Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 987-1000.
- PRAKASH, S., P. SUNG and L. PRAKASH, 1993 DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **27**: 33-70.
- PRICE, D. H., 2000 P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **20**: 2629-2634.
- PRICE, D. H., A. E. SLUDER and A. L. GREENLEAF, 1989 Dynamic interaction between a *Drosophila* transcription factor and RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **9**: 1465-1475.
- PROUDFOOT, N., 2004 New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 272-278.
- PROUDFOOT, N. J., A. FURGER and M. J. DYE, 2002 Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**: 501-512.
- RAMOTAR, D., E. BELANGER, I. BRODEUR, J. Y. MASSON and E. A. DROBETSKY, 1998 A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Biol Chem* **273**: 21489-21496.

- RAMOTAR, D., and J. Y. MASSON, 1996 A *Saccharomyces cerevisiae* mutant defines a new locus essential for resistance to the antitumour drug bleomycin. *Can J Microbiol* **42**: 835-843.
- RATNER, J. N., B. BALASUBRAMANIAN, J. CORDEN, S. L. WARREN and D. B. BREGMAN, 1998 Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem* **273**: 5184-5189.
- REMPOLA, B., A. KANIAK, A. MIGDALSKI, J. RYTKA, P. P. SLONIMSKI *et al.*, 2000 Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **262**: 1081-1092.
- RIBAR, B., L. PRAKASH and S. PRAKASH, 2006 Requirement of ELC1 for RNA polymerase II polyubiquitylation and degradation in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 3999-4005.
- RIGAUT, G., A. SHEVCHENKO, B. RUTZ, M. WILM, M. MANN *et al.*, 1999 A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**: 1030-1032.
- ROHDE, J., J. HEITMAN and M. E. CARDENAS, 2001a The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem* **276**: 9583-9586. Epub 2001 Feb 9582.
- ROHDE, J., J. HEITMAN and M. E. CARDENAS, 2001b The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem* **276**: 9583-9586.
- ROHDE, J. R., S. CAMPBELL, S. A. ZURITA-MARTINEZ, N. S. CUTLER, M. ASHE *et al.*, 2004 TOR controls transcriptional and translational programs via Sap-Sit4 protein phosphatase signaling effectors. *Mol Cell Biol* **24**: 8332-8341.

- RONNE, H., M. CARLBERG, G. Z. HU and J. O. NEHLIN, 1991 Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol Cell Biol* **11**: 4876-4884.
- RUEDIGER, R., M. HENTZ, J. FAIT, M. MUMBY and G. WALTER, 1994 Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens. *J Virol* **68**: 123-129.
- RUEDIGER, R., D. ROECKEL, J. FAIT, A. BERGQVIST, G. MAGNUSSON *et al.*, 1992 Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol Cell Biol* **12**: 4872-4882.
- SAHA, A., J. WITTMAYER and B. R. CAIRNS, 2002 Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev* **16**: 2120-2134.
- SCHMELZLE, T., T. BECK, D. E. MARTIN and M. N. HALL, 2004 Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* **24**: 338-351.
- SCHMID, F. X., 1995 Protein folding. Prolyl isomerases join the fold. *Curr Biol* **5**: 993-994.
- SCHMIDT, A., T. BECK, A. KOLLER, J. KUNZ and M. N. HALL, 1998 The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *Embo J* **17**: 6924-6931.
- SCHROEDER, S. C., B. SCHWER, S. SHUMAN and D. BENTLEY, 2000 Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* **14**: 2435-2440.

- SCHROEDER, S. C., D. A. ZORIO, B. SCHWER, S. SHUMAN and D. BENTLEY, 2004 A function of yeast mRNA cap methyltransferase, Abd1, in transcription by RNA polymerase II. *Mol Cell* **13**: 377-387.
- SELBY, C. P., and A. SANCAR, 1993 Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science* **260**: 53-58.
- SELBY, C. P., and A. SANCAR, 1997a Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11205-11209.
- SELBY, C. P., and A. SANCAR, 1997b Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *J Biol Chem* **272**: 1885-1890.
- SHAW, P. E., 2002 Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO Rep* **3**: 521-526.
- SHILATIFARD, A., R. C. CONAWAY and J. W. CONAWAY, 2003 The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem* **72**: 693-715.
- SINGER, T., S. HAEFNER, M. HOFFMANN, M. FISCHER, J. ILYINA *et al.*, 2003 Sit4 phosphatase is functionally linked to the ubiquitin-proteasome system. *Genetics* **164**: 1305-1321.
- SOMESH, B. P., J. REID, W. F. LIU, T. M. SOGAARD, H. ERDJUMENT-BROMAGE *et al.*, 2005 Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* **121**: 913-923.
- STARK, M. J., 1996 Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast* **12**: 1647-1675.

- STRACK, S., D. CHANG, J. A. ZAUCHA, R. J. COLBRAN and B. E. WADZINSKI, 1999
Cloning and characterization of B delta, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett* **460**: 462-466.
- STRACK, S., J. A. ZAUCHA, F. F. EBNER, R. J. COLBRAN and B. E. WADZINSKI, 1998
Brain protein phosphatase 2A: developmental regulation and distinct cellular and subcellular localization by B subunits. *J Comp Neurol* **392**: 515-527.
- SUNG, J. S., and B. DEMPLE, 2006 Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *Febs J* **273**: 1620-1629.
- SUTTON, A., D. IMMANUEL and K. T. ARNDT, 1991 The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol Cell Biol* **11**: 2133-2148.
- SVEJSTRUP, J. Q., 2002a Chromatin elongation factors. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 156-161.
- SVEJSTRUP, J. Q., 2002b Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 21-29.
- SVEJSTRUP, J. Q., 2003 Rescue of arrested RNA polymerase II complexes. *J Cell Sci* **116**: 447-451.
- SVEJSTRUP, J. Q., T. G. PETRAKIS and J. FELLOWS, 2003 Purification of elongating RNA polymerase II and other factors from yeast chromatin. *Methods Enzymol* **371**: 491-498.
- SWEDER, K. S., and P. C. HANAWALT, 1992 Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10696-10700.

- TIJSTERMAN, M., and J. BROUWER, 1999 Rad26, the yeast homolog of the cockayne syndrome B gene product, counteracts inhibition of DNA repair due to RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* **274**: 1199-1202.
- TORNALETTI, S., L. S. MAEDA, D. R. LLOYD, D. REINES and P. C. HANAWALT, 2001 Effect of thymine glycol on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II. *J Biol Chem* **276**: 45367-45371.
- TORNALETTI, S., D. REINES and P. C. HANAWALT, 1999 Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA. *J Biol Chem* **274**: 24124-24130.
- VAN HOFFEN, A., J. VENEMA, R. MESCHINI, A. A. VAN ZEELAND and L. H. MULLENDERS, 1995 Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *Embo J* **14**: 360-367.
- VAN HOOF, C., X. CAYLA, M. BOSCH, W. MERLEVEDE and J. GORIS, 1994 The phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A. A novel purification method, immunological and enzymic characterization. *Eur J Biochem* **226**: 899-907.
- VAN HOOF, C., V. JANSSENS, I. DE BAERE, J. H. DE WINDE, J. WINDERICKX *et al.*, 2000 The *Saccharomyces cerevisiae* homologue YPA1 of the mammalian phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A controls progression through the G1 phase of the yeast cell cycle. *J Mol Biol* **302**: 103-120.

- VAN HOOF, C., V. JANSSENS, I. DE BAERE, M. J. STARK, J. H. DE WINDE *et al.*, 2001
The *Saccharomyces cerevisiae* phosphotyrosyl phosphatase activator proteins are required for a subset of the functions disrupted by protein phosphatase 2A mutations. *Exp Cell Res* **264**: 372-387.
- VAN HOOF, C., V. JANSSENS, A. DINISHIOTU, W. MERLEVEDE and J. GORIS, 1998
Functional analysis of conserved domains in the phosphotyrosyl phosphatase activator. Molecular cloning of the homologues from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **37**: 12899-12908.
- VAN HOOF, C., E. MARTENS, S. LONGIN, J. JORDENS, I. STEVENS *et al.*, 2005 Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *Biochem J* **386**: 93-102.
- VAN ZYL, W., W. HUANG, A. A. SNEDDON, M. STARK, S. CAMIER *et al.*, 1992
Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**: 4946-4959.
- VERDECIA, M. A., M. E. BOWMAN, K. P. LU, T. HUNTER and J. P. NOEL, 2000
Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol* **7**: 639-643.
- VEZINA, C., A. KUDELSKI and S. N. SEHGAL, 1975 Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* **28**: 721-726.
- VISWANATHAN, A., and P. W. DOETSCH, 1998 Effects of nonbulky DNA base damages on *Escherichia coli* RNA polymerase-mediated elongation and promoter clearance. *J Biol Chem* **273**: 21276-21281.

- VONGSAMPHANH, R., P. K. FORTIER and D. RAMOTAR, 2001 Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Mol Cell Biol* **21**: 1647-1655.
- WAELEKENS, E., J. GORIS and W. MERLEVEDE, 1987 Purification and properties of polycation-stimulated phosphorylase phosphatases from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **262**: 1049-1059.
- WEST, M. L., and J. L. CORDEN, 1995 Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. *Genetics* **140**: 1223-1233.
- WILCOX, C. B., A. ROSSETTINI and S. D. HANES, 2004 Genetic interactions with C-terminal domain (CTD) kinases and the CTD of RNA Pol II suggest a role for ESS1 in transcription initiation and elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **167**: 93-105.
- WOUDSTRA, E. C., C. GILBERT, J. FELLOWS, L. JANSEN, J. BROUWER *et al.*, 2002 A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature* **415**: 929-933.
- WU, X., A. ROSSETTINI and S. D. HANES, 2003 The ESS1 prolyl isomerase and its suppressor BYE1 interact with RNA pol II to inhibit transcription elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**: 1687-1702.
- WU, X., C. B. WILCOX, G. DEVASAHAYAM, R. L. HACKETT, M. AREVALO-RODRIGUEZ *et al.*, 2000 The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *Embo J* **19**: 3727-3738.
- WU, Y., R. J. REECE and M. PTASHNE, 1996 Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *Embo J* **15**: 3951-3963.

- WULLSCHLEGER, S., R. LOEWITH and M. N. HALL, 2006 TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484.
- YAMAMOTO, K., S. INOUE and S. KAWANISHI, 1993 Site-specific DNA damage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation by hydroxylamine and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in the presence of Cu(II): role of active oxygen species. *Carcinogenesis* **14**: 1397-1401.
- YANG, L. Y., H. JIANG and K. M. RANGEL, 2003 RNA polymerase II stalled on a DNA template during transcription elongation is ubiquitinated and the ubiquitination facilitates displacement of the elongation complex. *Int J Oncol* **22**: 683-689.
- YANG, W. M., C. J. INOUE and E. SETO, 1995 Cyclophilin A and FKBP12 interact with YY1 and alter its transcriptional activity. *J Biol Chem* **270**: 15187-15193.
- YUDKOVSKY, N., J. A. RANISH and S. HAHN, 2000 A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* **408**: 225-229.
- ZHANG, J., and J. L. CORDEN, 1991 Phosphorylation causes a conformational change in the carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit. *J Biol Chem* **266**: 2297-2302.
- ZHENG, Y., and Y. JIANG, 2005 The Yeast Phosphotyrosyl Phosphatase Activator Is Part of the Tap42-Phosphatase Complexes. *Mol Biol Cell*.
- ZHOU, W., and P. W. DOETSCH, 1993 Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6601-6605.

ZOLNIEROWICZ, S., C. CSORTOS, J. BONDOR, A. VERIN, M. C. MUMBY *et al.*, 1994

Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A:
identification of a novel isoform highly expressed in brain. *Biochemistry* **33**:
11858-11867.

ZOLNIEROWICZ, S., C. VAN HOOF, N. ANDJELKOVIC, P. CRON, I. STEVENS *et al.*, 1996

The variable subunit associated with protein phosphatase 2A0 defines a novel
multimember family of regulatory subunits. *Biochem J* **317 (Pt 1)**: 187-194.