

Université de Sherbrooke

**Étude de la fonction de la RNase III eucaryote et identification de ses
partenaires cellulaires dans un criblage double-hybrides.**

Par: Annie Tremblay

Département de Microbiologie et Infectiologie

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

Le 26 octobre 2002



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

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

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

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

0-612-80648-0

Canada

Table des matières:

Liste des illustrations.....	ii
Liste des abréviations.....	v
Résumé	
Introduction.....	1
Chapitre 1: Définition de la conformation de Rnt1p	
Matériel et méthodes.....	22
Résultats.....	29
Discussion.....	39
Chapitre 2: Identification des partenaires cellulaires de Rnt1p.	
Matériel et méthodes.....	59
Résultats.....	70
Discussion.....	87
Chapitre 3: Caractérisation de la fonction de l'interaction entre Rnt1p et Gar1p.	
Matériel et méthodes.....	111
Résultats.....	120
Discussion.....	138
Remerciements.....	155
Liste des références.....	156
Annexe I: Article de Lamontagne <i>et al.</i> , 2000.	
Annexe II: Table des candidats qui ont été identifiés jusqu'à maintenant.	
Annexe III: Article de Tremblay <i>et al.</i> , 2002.	
Annexe IV: Protocoles détaillés.	

Liste des illustrations:

Figure 1: Schéma résumant les étapes de la biogénèse des ribosomes.

Figure 2: Étapes de maturation du pré-ARNr 35S en ARNr 18S, 5.8S et 25S chez *S. cerevisiae*.

Figure 3: Schéma représentant les différents types de RNases III découvertes depuis la première RNase III identifiée chez *E. coli*.

Figure 4: Modèle du clivage d'un ARNdb par le possible homodimère Rnt1p.

Figure 5: Principes du système double-hybrides qui sera utilisé pour identifier des interactions protéine-protéine avec Rnt1p.

Figure 6: Schéma représentant les différentes constructions de fragments de Rnt1p en fusion avec BD ou AD de Gal4p.

Tableau 1: Tests des constructions de Rnt1p par western blot et par complémentation.

Tableau 2: Résultats des tests d'interactions doubles-hybrides entre les fusions des fragments de Rnt1p.

Figure 7: Le système du répresseur λ permet de confirmer la capacité de dimérisation de deux monomères de Rnt1p complets.

Figure 8: Homologie de séquence entre les motifs de liaison à l'ARNdb de différentes protéines de diverses espèces.

Figure 9: Homologie de séquence entre les domaines d'activité nucléase de plusieurs ribonucléases III de différentes espèces.

Figure 10: Modèle montrant sous divers angles la conformation possible adoptée par l'homodimère Rnt1p.

Figure 11: Schéma illustrant la stratégie de sélection des candidats pour l'interaction avec Rnt1p lors du criblage double-hybrides.

Tableau 3: Exemple d'enregistrement des résultats durant les étapes du criblage double-hybrides.

Tableau 4: Résultats du test d'interaction double-hybrides des premiers candidats identifiés (provenant de la banque C3) avec différentes délétions de Rnt1p fusionnées au BD de Gal4p.

Tableau 5: Résultats pour chaque étape de la stratégie de criblage pour l'ensemble des trois banques Y2HL.

Tableau 6: Les 119 protéines identifiées comme interagissant avec Rnt1p peuvent être séparées dans 6 classes fonctionnelles.

Tableau 7: 18 facteurs de transcriptions sont des candidats potentiels pour l'interaction avec Rnt1p.

Tableau 8: Résultats observés lors des tests double-hybrides entre les trois facteurs de transcription Mac1p, Snf6p et Mga2p fusionnés au AD de Gal4p et les différentes délétions de Rnt1p fusionnées au BD de Gal4p.

Figure 12: Courbes de croissance pour les levures *RNT1*, *rnt1-*, *MAC1* et *mac1-* en cultures sur différentes sources de carbones à température permissive de 26°C.

Figure 13: Schéma illustrant les liens entre les différents facteurs de transcription et protéines métaboliques impliquées dans différentes réponses aux stress.

Figure 14: Modèle représentant les effets possibles de la liaison d'une protéine X à Rnt1p.

Figure 15: Rnt1p interagit avec Gar1p *in vivo*.

Figure 16: Rnt1p interagit spécifiquement avec Gar1p *in vitro* en absence d'autres facteurs.

Figure 17: Gar1p interagit avec Rnt1p et/ou Cbf5p dans un extrait cellulaire, mais Rnt1p n'interagit pas avec Cbf5p.

Figure 18: Alignement des domaines de liaison à l'ARNdb de 4 protéines d'espèces différentes, Rnt1p de *S. cerevisiae*, RNase III de *E. coli*, protéine F26 de *C. elegans* et Pac1p de *S. pombe* montrant le prolongement du domaine en C-terminal chez les trois eucaryotes.

Figure 19: L'intégrité du domaine C30 de Rnt1p est importante pour la fonction de l'enzyme *in vivo*.

Figure 20: Courbes de croissance des différentes souche de $\Delta RNT1$ transformées avec les mutants réalisés dans BD/Rnt1p.

Figure 21: La substitution de deux résidus lysines dans le C30 de Rnt1p abolie l'interaction avec Gar1p et affecte l'interaction N-term/dsRBD.

Tableau 9: Tableau résumant tous les tests réalisés et résultats obtenus pour chaque mutants.

Figure 22: Modèle illustrant le transport au nucléole du complexe de pseudouridylation par Rnt1p liée à Gar1p.

Abréviations:

β -gal:	β -galactosidase
3-AT:	3-amino-1,2,4-triazole
5-FOA:	5-fluoroorotic acid
AD:	«activation domain», domaine d'activation de Gal4p
ARNdb:	ARN double brins
BD:	«binding domain», domaine de liaison à l'ADN de Gal4p
CFU:	«colony forming unit», unité formant une colonie
dsRBD:	«double-stranded RNA binding domain», domaine de liaison à l'ARNdb
DTT:	dithiothreitol
ETS:	«external transcribed spacer», espace externe
GFP:	«green fluorescent protein»
GST:	glutathione <i>S</i> -transferase
HA:	hemagglutinine
hnRNP:	«hetero nuclear ribonucleoprotein particle»
ITS:	«internal transcribed spacer», espace interne
NLS:	«nuclear localization signal», signal de localisation nucléaire
ONPG:	<i>O</i> -nitrophényl- β -D-galacto-pyranoside
PBS:	«phosphate-buffered saline»
PBSE:	PBS avec EDTA
PMSF:	phénylméthylsulfonyl fluoride
Pol:	polymérase
PTGS:	«post-transcriptional gene silencing»
RNAi:	ARN interférence
SCD:	«synthetic complete defined», milieu synthétique défini complet
snoRNA:	«small nucleolar RNA», petit ARN nucléolaire
snoRNP:	«small nucleolar ribonucleoprotein particle», petite particule ribonucléoprotéique nucléolaire
snRNA:	«small nuclear RNA», petit ARN nucléaire

UFP: unité formant une plage

X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Université de Sherbrooke

Étude de la fonction de la RNase III eucaryote et identification de ses partenaires cellulaires dans un criblage double-hybrides.

Par: Annie Tremblay

Département de Microbiologie et Infectiologie

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

Le 26 octobre 2002

Résumé:

La synthèse de ribosomes est un processus cellulaire fort important, mais combien compliqué et énergétiquement demandant. De nombreux facteurs, autant protéiques que ribonucléiques sont impliqués dans cet évènement. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Rnt1p, l'orthologue de la RNase III bactérienne, est impliquée directement et indirectement dans 3 étapes: Elle effectue le premier clivage du pré-ARNr 35S, produit les snoRNAs requis pour les modifications de l'ARNr et produit également les snRNAs nécessaires à l'épissage des ARNm des protéines ribosomales. Cependant le rôle de Rnt1p dans la cellule ne semble pas s'arrêter là, car l'activité de clivage de structures d'ARN double-brins des RNases III semble requise dans d'autres voies de maturation d'ARN. Afin d'identifier d'autres rôles pour la ribonucléase III chez les levures et de mieux comprendre les voies dans lesquelles on sait qu'elle est déjà impliquée, un criblage double-hybrides a été initié pour découvrir des partenaires protéiques possibles de Rnt1p. Ce criblage s'avéra très fructueux car de nombreuses interactions de Rnt1p avec des protéines ont été révélées.

La plupart des protéines candidates pour l'interaction avec Rnt1p peuvent être regroupées dans 6 classes fonctionnelles. On retrouve entre autres, des protéines impliquées dans la réponse cellulaire au stress, des protéines de transport, des facteurs de transcription, des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et la méiose, d'autres encore, impliquées

dans la nutrition et la respiration et finalement une protéine travaillant aussi dans la maturation de l'ARNr. Fait intéressant: plusieurs protéines peuvent être reliées avec des phénotypes observés dans les levures délétées en *RNT1*, qui présentent entre autres, une sensibilité aux températures élevées et une incapacité à croître sur milieu sans leucine. La signification biologique de l'association de Rnt1p avec l'une de ses partenaires a été investiguée en détail. Gar1p lie les snoRNAs H/ACA et fait partie du complexe snoRNP responsable de la pseudouridylation de l'ARNr. Il fut prouvé *in vitro* que Rnt1p interagit spécifiquement et directement avec Gar1p et ce, grâce à une région en C-terminal du dsRBD, de 30 acides aminés (C30). Deux résidus lysines responsables de cette interaction ont été identifiés dans le domaine C30, et la modification de ces deux résidus en alanines détruit l'interaction avec Gar1p sans affecter significativement l'activité de la RNase dans la synthèse des ribosomes. L'utilisation de ce mutant de Rnt1p a permis d'élucider la fonction biologique de cette interaction (Tremblay *et al.*, 2002).

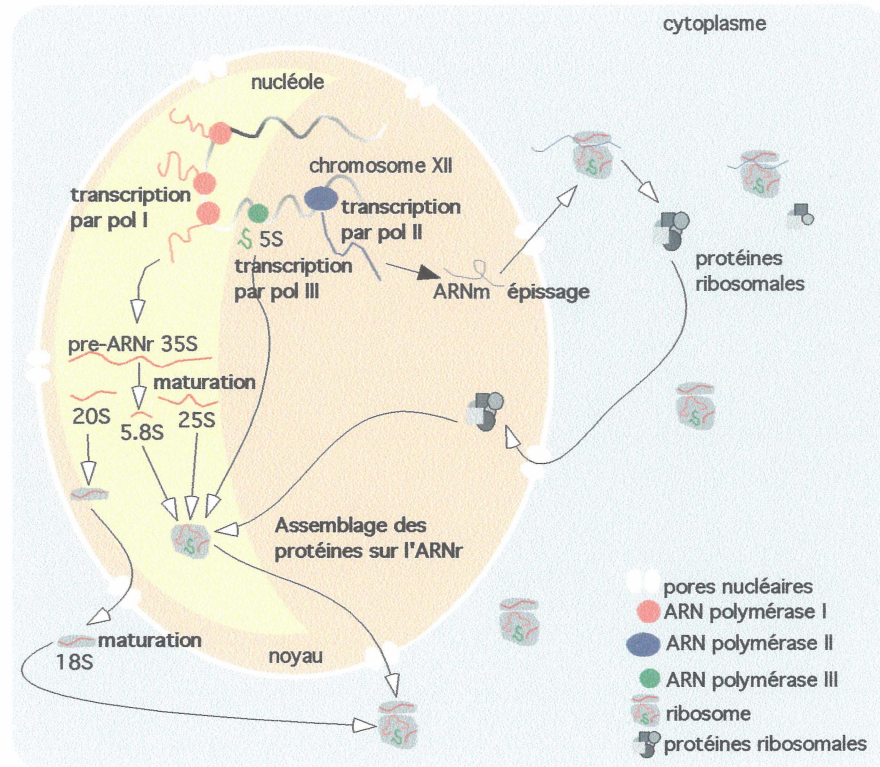
La conformation de Rnt1p en solution a aussi été investiguée génétiquement grâce aux systèmes double-hybrides et du répresseur λ . Les différentes délétions dans les domaines de Rnt1p créées ont permis de détecter des signaux de dimérisation entre les domaines N-terminaux et entre les dsRBDs ainsi qu'une interaction intra-moléculaire entre le domaine N-terminal et le dsRBD. Rnt1p forme donc un homodimère (Lamontagne *et al.*, 2000) et un modèle pour sa conformation a été proposé.

Mots clés: ribonucleases / yeast two-hybrid system / protein interaction mapping / ribosomal RNA / *Saccharomyces cerevisiae* /

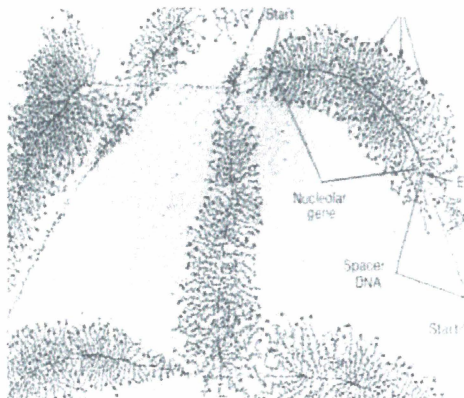
Introduction:

Les ribosomes sont requis dans les cellules pour l'adaptation à l'environnement, la croissance, la prolifération et pour remplir les demandes énergétiques et biosynthétiques. La synthèse des ribosomes est un processus complexe demandant beaucoup d'énergie à la cellule et qui doit donc être très bien coordonné. Chez les levures, l'activité des 3 ARN polymérases (Pol) est grandement sollicitée tout au long de la biogénèse. Les ARN Pol I et III doivent synthétiser la composante ARN des ribosomes (ARNr) alors que la Pol II est en charge de synthétiser les ARNm des quelques 137 gènes des 78 protéines ribosomales (plusieurs protéines étant codées par plus d'un gène). La figure 1 résume les étapes de la biogénèse des ribosomes chez la levure se passant pour la plupart dans un compartiment spécialisé du noyau, le nucléole. Les portions du chromosome XII couvrant l'ADNr répété en tandem 150 fois et représentant 10% de tout le génôme de la levure, font partie du nucléole. La transcription par la Pol I, composée de 14 protéines, nécessite d'autres facteurs comme la TBP «TATA box binding protein», Rrn3p, le complexe UAF «upstream activating factor» composé de 6 protéines et le complexe CF «core factor» composé de 3 protéines (pour revue voir Aprikian *et al.*, 2001). La transcription d'une molécule d'ARN primaire 35S comprenant les 3 ARNr, 18S, 5.8S et 25S requiert environ 6 minutes. Dans les levures en croissance exponentielle, 60% de toute la transcription totale est dédiée à la production d'ARNr à partir de l'ADNr (Warner, 1999). Dans la figure 1B, la photo prise au microscope électronique, montre qu'à partir d'une copie d'ADNr, plusieurs transcriptions sont entreprises successivement par différentes Pol I avant même la fin de la précédente, donnant l'aspect d'un sapin. Et, à chaque extrémité 5' des transcrits, on peut remarquer de petites boules qui pourraient représenter des

A



B



C

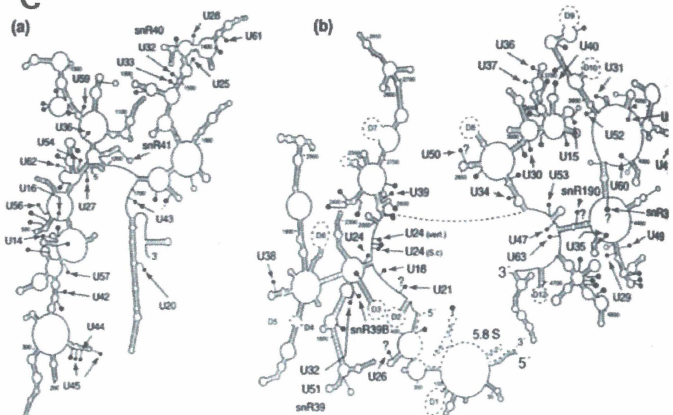


Figure 1: (A) Schéma résumant les étapes de la biogénèse des ribosomes chez *S. cerevisiae*. (B) Image obtenue par microscopie électronique montrant la transcription élevée des ADNr par l'ARN pol. I et la présence de complexes potentiels de maturation à l'extrémité des ARNr transcrits. (C) Structures secondaires adoptées par l'ARNr montrant quelques sites de liaison des snoRNAs. (La photo B a été tirée de Bloom et Fawcett, 1994, et la photo C de Bachellerie et Cavallé, 1997.)

complexes de maturation. Dès la fin de la transcription ou de façon co-transcriptionnelle, la maturation du pre-ARNr est commencée.

Le transcrit 35S est clivé pour enlever les espaces internes (ITS) séparant les 3 ARNr et les espaces externes (ETS), et des modifications covalentes y sont apportées, principalement la 2'-O-ribose méthylation et la pseudouridylation. Ces étapes de maturation ne prendraient que 10 secondes pour se compléter. La maturation des ARNr 5.8S et 25S se déroule entièrement dans le nucléole alors qu'une partie de la maturation du 18S se passe dans le cytoplasme. L'ARN 5S est transcrit indépendamment par la Pol III dans le noyau et est mûré au nucléole.

Pendant ce temps, les gènes des protéines ribosomales sont transcrits par la Pol II en pré-ARNm qui seront épissés au noyau avant d'être transférés au cytoplasme pour être traduits par les ribosomes. La transcription de ces ARNm constitue 50% de toute la transcription faite par la pol II. Cela demande donc une énorme mobilisation des Pol II. De plus, presque la moitié des pré-ARNm des protéines ribosomales contiennent des introns dont leurs épissages représentent 90% de toute l'activité d'épissage nécessitée dans les levures (Warner, 1999). Une fois que, ou pendant que les ARNr 18S, 5.8S, 25S et 5S sont mûrés, les protéines ribosomales commencent à s'assembler sur la structure de chacun (figure 1C). Les sous-unités 60S (formées des ARNr 5.8S, 5S et 25S) et 40S (formées de l'ARNr 18S) sont ainsi séparément assemblées dans le nucléole et sont ensuite exportées au cytoplasme à travers les pores nucléaires pour être rassemblées en un ribosome. Au total environ 200 000 ribosomes sont produits par levure en un temps de génération de 100 minutes, cela veut dire que 2000 ribosomes sont produits à la minute. Comme il y a

environ 150 pores dans un noyau, chaque pore importerait donc près de 1000 protéines ribosomales par minute et exporterait 25 sous-unités par minute (Warner, 1999).

La biogénèse des ribosomes nécessite donc une bonne coordination et aussi une bonne régulation. Comme les étapes menant à l'assemblage des ribosomes sont nombreuses et complexes, cela laisse plusieurs points où une régulation peut être faite. Un des points majeurs de régulation connu est au niveau de la transcription de l'ADNr par la Pol I, où les quelques facteurs se liant au promoteur ou à l'ARN Pol I peuvent être régulés par la phosphorylation, l'acétylation ou des interactions protéine-protéine. Au niveau de l'ADNr, un contrôle peut aussi être effectué par la méthylation ou l'acétylation des histones pour modifier l'accessibilité des facteurs à l'ADNr, rendant ainsi l'expression silencieuse ou active (pour revue, voir Huang, 2002). La synthèse du pré-ARNr peut donc être inhibée en réponse à la limitation des nutriments, à la différenciation ou par l'inhibition de la synthèse des protéines, et être activée lors de l'addition de nutriments, lors de la croissance ou lors de la prolifération (chez la levure; Shulman *et al.*, 1977, Kief et Warner, 1981, chez l'humain; Grummt, 1999, Hannan *et al.*, 1998, Jacob et Ghosh, 1999). Une régulation serait aussi possible au niveau du transport à travers le pore nucléaire: Il a été démontré que des composantes impliquées dans la transcription telles que UBF et Pol I, et d'autres dans le processing du pré-ARNr comme Nop1p, Nsr1p et RNase MRP et dans l'assemblage comme la nucleophosmin, voyageaient rapidement entre le noyau et le nucléole (Chen et Huang, 2001). Cela laisse une possibilité pour une régulation par modification de ces protéines par une protéine résidant dans le noyau. Par ailleurs, il a été démontré que des voies de transduction de signal pouvaient réguler la maturation du pré-ARNr et l'assemblage des particules pré-ribosomales, ou la synthèse

des protéines ribosomales, par exemple, la voie de la protéine kinase C (PKC) (résumée dans Heinisch *et al.*, 1999) et la voie de «target of rapamycin» (TOR) (résumée dans Rohde *et al.*, 2001). Ainsi, n'importe quel défaut dans la voie de sécrétion requise pour la synthèse de la membrane durant la croissance inhibe la transcription des protéines ribosomales et de l'ARNr par la voie de PKC (Nierras et Warner, 1999) et cette inhibition requièrerait les facteurs de processing et d'assemblage Ebp2p et Rrs1p (Tsuji *et al.*, 2000, Tsuno *et al.*, 2000). Alors que l'inhibition de la voie de TOR par la rapamycin entraîne aussi la répression de la transcription de l'ARNr et des protéines ribosomales (Zaragoza *et al.*, 1998, Powers et Walter, 1999). On voit qu'il est très important de réguler et de coordonner cet évènement dispendieux énergétiquement, qu'est la synthèse des ribosomes, avec la croissance des levures. D'autres points de régulation pourraient être découverts éventuellement dans les étapes de maturation du pré-ARNr car des facteurs agissant en *trans* pourraient être impliqués également dans un point de contrôle.

Depuis disons, les 10 dernières années, les connaissances sur la maturation du pré-ARNr chez la levure ont considérablement augmentées. De nombreux petits ARNs et protéines se sont révélés importants pour cette partie de la biogénèse des ribosomes. La figure 2 résume les étapes de la maturation du précurseur de l'ARNr 35S en ses ARNr 18S, 5.8S et 25S et montre une bonne partie des facteurs qui ont été découverts comme étant requis dans ces étapes, pour la plupart par des méthodes génétiques.

Le premier évènement dans la maturation du pré-ARNr 35S est le clivage, par la ribonucléase III Rnt1p, de façon co-transcriptionnelle d'une structure double-brins fermée

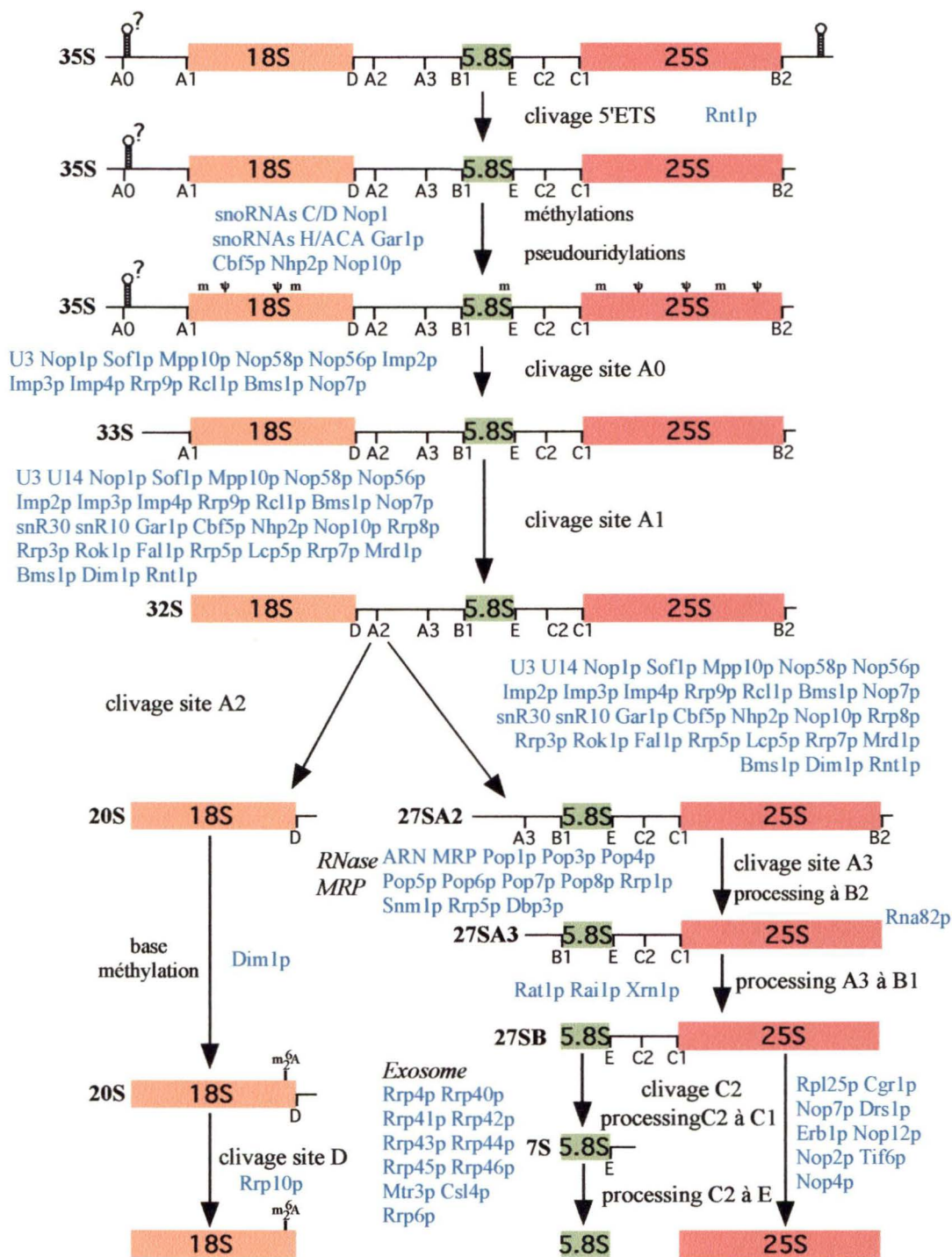


Figure 2: Étapes de maturation du pré-ARNr 35S en ARNr 18S, 5.8S et 25S chez *S. cerevisiae*.

par une tétraboucle située dans le ETS 3' (Abou Elela *et al.*, 1996, Kufel *et al.*, 1999). Ce clivage se passe tellement vite que la transcription des quelques 200 nucléotides en aval du site, n'aurait même pas le temps de se terminer. Cela explique pourquoi pendant longtemps on a cru que l'ARNr 35S était le transcrit primaire et qu'il se terminait à 7 nucléotides en aval de l'extrémité 3' de l'ARNr 25S. Le site de clivage de Rnt1p a été observé *in vivo* comme étant à +14 et +49 par rapport à l'extrémité mature de l'ARNr 25S (Abou Elela *et al.*, 1996, Kufel *et al.*, 1999). Le même résultat a été obtenu *in vitro* avec un substrat modèle de l'ETS 3' et la protéine recombinante Rnt1p purifiée (Nagel et Ares, 2000), ce qui indique qu'aucun autre facteur de levures ne serait nécessaire pour le clivage. Une fois que ce clivage est réalisé, le processing et les modifications covalentes du pré-ARNr peuvent commencer.

Les deux principales modifications sont la 2'-O-ribose méthylation et la pseudouridylation. Sur le pré-ARNr, les 55 sites pour la 2'-O-ribose méthylation sont reconnus par 55 snoRNAs à boîte C/D différents qui possèdent une séquence complémentaire à l'ARNr de 10 à 21 nucléotides permettant de déterminer exactement le ribose qui sera méthylé (pour revue, Bachellerie et Cavallé, 1997). Chaque snoRNA forme un complexe ribonucléoprotéique (snoRNP) avec des protéines communes à tous les snoRNAs, Nop1p (fibrillarin), Nop56p et Nop58p (Balakin *et al.*, 1996, Lafontaine et Tollervey, 1999, Wu *et al.*, 1998). Ces protéines lient les boîtes C et D et/ou interagissant entre elles, afin de soit protéger l'ARN de la dégradation, soit procéder à la modification guidée par le snoRNA, Nop1p étant probablement la méthyltransférase du complexe, soit aider à l'interaction avec l'ARNr ou à la localisation du complexe. Pour la pseudouridylation, 45 uridines présentes sur l'ARNr mature sont isomérisées en Ψ par

les snoRNPs contenant les snoRNAs à boîtes H/ACA. Encore une fois, la composante ARN sert de guide dans la détermination des sites, et les protéines qui y sont associées exécutent la modification. 4 protéines sont communes à tous les snoRNAs H/ACA; Cbf5p, qui est la pseudouridylase, Gar1p, Nhp2p et Nop10p (Koonin, 1996, Zebarjadian *et al.*, 1999, Henras *et al.*, 1998, Watkins *et al.*, 1998).

En plus, certains des snoRNAs C/D et H/ACA sont nécessaires au processing du pré-ARNr (voir figure 2). U3 snoRNP (C/D) est requis pour le processing aux sites A0, A1 et A2, alors que les snoRNPs U14 (C/D), snR10 et snR30 (H/ACA) sont requis aux sites A1 et A2 (Hughes et Ares, 1991, Li *et al.*, 1990, Tollervey, D., 1987, Morrissey et Tollervey, 1993). Pour former le pré-ARNr 33S, un premier processing est effectué dans l'ETS 5' au site A0 par un clivage endonucléolytique par une enzyme inconnue, dont on avait d'abord pensé que c'était Rnt1p (Abou Elela *et al.*, 1996). Cependant, quoique la délétion de *RNT1* résulte en un décalage dans le processing en A0, A1 et A2, celle-ci n'est pas nécessaire (Kufel *et al.*, 1999). Pour une revue de toutes les étapes de la maturation de l'ARNr et des protéines impliquées, voir Venema et Tollervey, 1999 et Mitchell *et al.*, 1997.

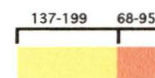
Chez *E. coli*, la maturation de ses ARNr 16S, 5S, et 23S est à la fois plus simple que chez les eucaryotes et similaire. L'ARNr 16S est mûri de façon co-transcriptionnelle avant la fin de la transcription du du pré-ARNr 30S. Les premiers clivages sont initiés par la RNase III qui reconnaît deux structures double-brins, l'une créée par l'appariement des extrémités 5' et 3' de l'ARNr 16S, et l'autre par l'appariement des extrémités 5' et 3' de chaque côté de l'ARNr 23S (Young et Steitz, 1978, Bram *et al.*, 1980). L'extrémité 3' de

l'ARNr 23S est ensuite générée par l'exoribonucléase 3'→5', RNase T (Li *et al.*, 1999) alors que les extrémités 5' de 16S et 23S sont maturées par deux exonucléases 5'→3' homologues, RNase E et RNase G (Li *et al.*, 1999). Les deux clivages par la RNase III permettent de réguler de façon simple la synthèse de quantités égales de chaque ARNr.

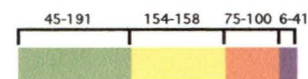
La complexité de ce processus chez les levures, demande aussi une certaine régulation pour s'assurer, d'une part, que tous les ARNr sont synthétisés en quantités égales et d'autre part, que cette synthèse est arrêtée le plus vite possible lorsqu'il y a inhibition de la transcription de l'ADNr et des protéines ribosomales. La ribonucléase III, Rnt1p, responsable du premier clivage du pré-ARNr semble une candidate intéressante, car celle-ci est aussi indirectement impliquée dans les autres étapes du clivages en 5', dans les modifications covalentes du 35S et dans la synthèse des protéines ribosomales, de par ses autres fonctions connues.

Des ribonucléases III ont été identifiées chez plusieurs espèces depuis le temps où celle de *E. coli* a été découverte. Chez les levures, il y a eu d'abord Pac1 et Pac 8 de *S. pombe* (Xu *et al.*, 1990, Rotondo *et al.*, 1996), puis Rnt1p de *S. cerevisiae* (Abou Elela *et al.*, 1996) et KLRNase III de *Kluyveromyces lactis* (Ozier-Kalogeropoulos *et al.*, 1998). Suivirent de nombreuses découvertes aussi chez des eucaryotes supérieurs; telles que les deux RNases III de l'humain, celle de 160 kDa (Wu *et al.*, 2000) et l'autre appelée HERNA parce qu'elle contient aussi un domaine hélicase (Matsuda *et al.*, 2000). L'ensemble de ces protéines sont représentés schématiquement dans la figure 3. Celles-ci peuvent être regroupées en 4 types différents selon leur composition en domaines. Les

RNase III de *E. coli* et RNases III de 32 autres espèces de bactéries;



Rnt1p de *S. cerevisiae*; Pac1 de *S. pombe*; KLRNase III de *K. lactis*



RNase 3L et hRNase III de l'humain; drosha de *D. melanogaster*; drosha (F26E4.13) et 1 autre RNase III de *C. elegans*;



Pac8 de *S. pombe*; Caf, Tal3, ATFCA3 et 2 autres RNases III de *A. thaliana*; K12H4.8 de *C. elegans*; HERNA de l'humain; Dicer de *D. melanogaster*; *C. elegans*; et de souris;

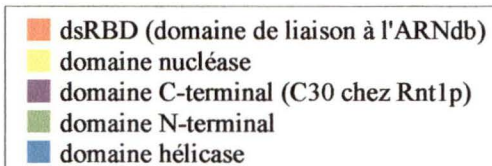
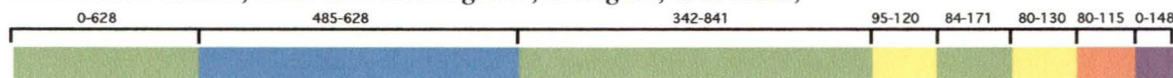


Figure 3: Schéma représentant les différents types de RNases III découvertes depuis la première RNase III identifiée chez *E. coli*. Les différents domaines sont représentés par des boîtes de couleur (voir légende) et les nombres au-dessus de chaque domaine représente sa longueur en acides aminés qui varie selon les RNases III. Les RNases III connues associées à chaque types sont nommées au dessus de chaque représentation. (Figure inspirée de Lamontagne *et al.*, 2001)

RNases III de *E. coli* ainsi que des 32 autres espèces de bactéries, ne sont composées que de deux domaines; le domaine de liaison à l'ARNdb (dsRBD) constitué d'un motif de liaison à l'ARN conservé (Kharrat *et al.*, 1995, Sy Johnston *et al.*, 1992) et le domaine responsable de l'activité endonucléase (domaine nucléase) de l'enzyme. Le deuxième type de RNases III regrouperait la plupart des RNase III de levures, excluant seulement Pac8 de *S. pombe*. Ces RNases présentent toutes une extension N-terminale de la protéine variant de 45 à 191 résidus (domaine N-terminal) et une petite extension en aval du dsRBD variant de 6 à 41 acides aminés. La troisième catégorie est caractérisée par la présence d'un deuxième domaine nucléase en plus des domaines présents dans le deuxième type. Ce type de RNase III se retrouve chez l'humain, chez *D. melanogaster* et chez *C. elegans* (Filippov *et al.*, 2000). Finalement, le dernier type de ribonucléase III possède un domaine hélicase dans son domaine N-terminal, ainsi que deux domaines nucléases et un dsRBD. Les 5 possibles RNases III identifiées chez *A. thaliana*, le gène K12H4.8 de *C. elegans*, HERNA de l'humain, Dicer de *Drosophila*, de *C. elegans*, de l'humain et de la souris ainsi que Pac8 de *S. pombe* se retrouvent toutes dans cette catégorie (figure 3). Parmi toutes ces RNases III, ce sont bien sûr celles de *E. coli* et de *S. cerevisiae* qui ont été les plus étudiées jusqu'à maintenant.

Pour la ribonucléase III de *E. coli*, l'élucidation de sa conformation en solution et avec son substrat a débutée il y a bien longtemps. Des expériences de chromatographie sur sephadex G-100 avec la RNase III purifiée à homogénéité ont révélé que celle-ci forme un dimère de deux polypeptides identiques de 25 kDa (Robertson *et al.*, 1968; Dunn, 1976). Il a été démontré ensuite par chromatographie d'exclusion avec un agent liant (cross-linker) qu'il existe deux conformations en solution dépendantes de l'absence ou la

présence d'ARNdb substrat: un dimère migrant à 50 kDa et un autre dimère de taille légèrement plus petite. Ce qui suggérerait alors un changement conformationnel important du dimère de la RNase III qui deviendrait plus compact après la reconnaissance de son substrat (March et Gonzalez, 1990; Li *et al.*, 1993). Un modèle a été décrit par Nicholson proposant que le clivage de l'ARNdb se fait dans un complexe symétrique enzyme-substrat. Le dsRBD de chaque monomère se lie à un tour d'hélice de l'ARNdb ce qui amène un changement de conformation du complexe de sorte que les sites catalytiques sont positionnés près du site de clivage de chaque brin (Nicholson, 1996). Le dimère serait dans une position anti-parallèle sur l'ARNdb, une forme peut-être plus compacte que celle en absence du substrat. Lors du clivage des deux brins de l'ARNdb par la RNase III, celle-ci produit deux coupures décalées générant une extension 3' de 2 bases (Young et Steitz, 1978, Bram *et al.*, 1980) et laisse un groupe phosphate en 5' et un groupe hydroxyl en 3' (Robertson *et al.*, 1968). Pour que l'activité nucléase aie lieu, du Mg^{2+} ou Mn^{2+} sont requis dans le site catalytique de l'enzyme qui pourrait être compris dans le motif RNase III conservé: **NERLEFLGDS**.

Pour Rnt1p, il est prédit que celle-ci adoptera aussi une forme homodimérique afin quelle puisse effectuer elle aussi les deux clivages par molécule d'ARNdb et que le même genre d'extrémités 5' et 3' seront générées. La conformation adoptée par cette enzyme sera discutée au chapitre 1. La figure 4 illustre l'un des premiers modèles du clivage de son substrat par Rnt1p. Le dimère possible de Rnt1p possédant une forme un peu plus compacte en solution, s'ouvre un peu lorsqu'elle rencontre un ARNdb qu'elle va lier par l'intermédiaire de son dsRBD. La plupart des substrats de Rnt1p semblent présenter une tétraboucle AGNN qui pourrait être reconnue spécifiquement par l'enzyme. En présence

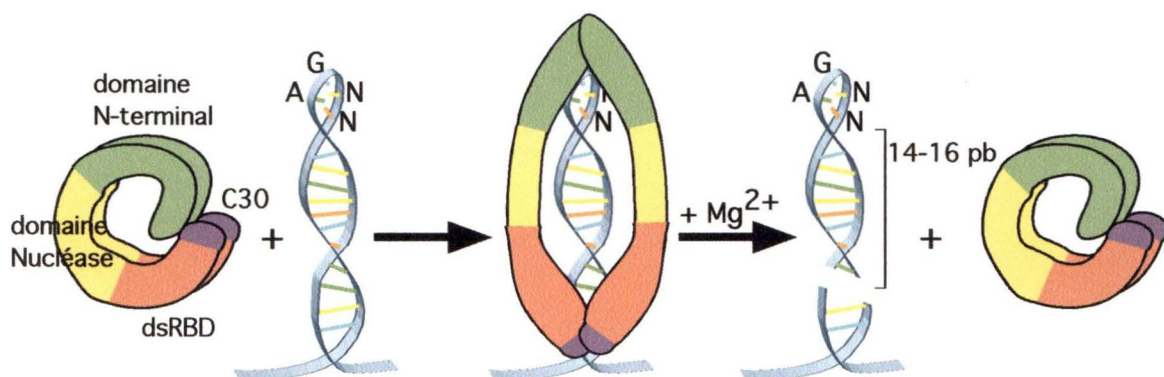


Figure 4: Modèle du clivage d'un substrat ARNdb par le possible homodimère Rnt1p. Lorsque Rnt1p rencontre son substrat, sa conformation pourrait être changée pour positionner correctement ses domaines catalytiques vis-à-vis les sites de clivages sur l'ARNdb. En présence de Mg²⁺, le substrat sera clivé à environ 14 à 16 pb de la tétraboucle. L'enzyme pourrait ensuite retrouver sa conformation originale prête à reconnaître un autre substrat. Les bases de l'ARNdb clivé pourrait être désappariées par une hélicase pour permettre à une exonucléase de poursuivre le processing.

de Mg^{2+} le substrat est clivé sur chaque brin à environ 14 à 16 pb de la tétraboucle (Lamontagne *et al.*, 2000). Par la suite l'enzyme peut être recyclée et l'ARNdb clivé pourrait être désapparié grâce à une hélicase afin d'ouvrir la structure aux exonucléases qui termineront la maturation de l'ARN.

L'activité de la RNase III est requise pour accomplir plusieurs fonctions. L'implication dans le processing des pré-ARNr a été prouvée pour plusieurs RNases III. Outre celle de *E. coli* et Rnt1p, il y a Pac1 de *S. pombe* (Rotondo *et al.*, 1997, Spasov *et al.*, 2002), et la RNase III humaine (160 kDa)(Wu *et al.*, 2000). Chez *S. cerevisiae*, en plus d'exécuter le clivage d'une séquence double-brins terminée par une tétraboucle dans l'ETS 3' du précurseur du pré-ARNr 35S, Rnt1p est aussi responsable de la maturation de plusieurs snoRNAs C/D et H/ACA. Les snoRNAs sont soit, codés dans les introns (seulement 7 chez la levure), soit dans des unités indépendamment transcrites monocistroniques ou polycistroniques. Le processing des snoRNAs dicistroniques snR190 et U14 nécessitant un double clivage par Rnt1p dans deux structures double-brins (Chanfreau *et al.*, 1998b) suivi de l'activité exonucléase de Rat1p et Xrn1p (Petfalski *et al.*, 1998) ont été les premiers découverts. Ensuite, Rnt1p s'est révélée être nécessaire pour la séparation d'un autre groupe de 7 snoRNAs, tous de la famille des boîtes C/D, codés l'un à la suite de l'autre dans un même polycistron sous le contrôle de son propre promoteur. Ainsi dans les cellules délétées en *RNT1*, la production des snoRNAs snR72 à snR78 est complètement abolie (Qu *et al.*, 1999). Finalement, une large analyse de la synthèse des snoRNAs dans les levures $\Delta RNT1$ a révélée la nécessité de la présence de Rnt1p dans la maturation de plusieurs autres snoRNAs H/ACA; snR36, SnR43 et snR46, et C/D; snR39b, snR40, snR41, snR47 et Z2 à Z9 (Chanfreau *et al.*, 1998a). Dernièrement, le

clivage du snoRNA U18 codé dans les introns et habituellement produit lors de l'épissage des ARNm adjacent s'est révélé être alternativement maturé aussi par Rnt1p grâce à l'interaction avec Nop1p (Giorgi *et al.*, 2001). L'interaction de Nop1p avec U18 pourrait recruter l'activité de Rnt1p qui autrement ne pourrait reconnaître ce substrat à cause de l'absence d'une tétraboucle AGNN.

Une autre fonction découverte chez Rnt1p, est la maturation de 3 des 5 snRNAs essentiels pour l'épissage des pré-ARNm, U1 (Seipelt *et al.*, 1999), U2 (Abou Elela *et Ares*, 1998) et U5 (Chanfreau *et al.*, 1997). Ces snRNAs sont transcrits par la pol II et possèdent un cap 7-méthyl-guanosine comme les ARNm. Ceux-ci sont aussi polyadénylés dans les levures *ΔRNT1* indiquant que Rnt1p est requise pour un clivage en 3' de ces snoRNAs permettant la formation correcte de leur extrémité 3'. Par ailleurs, chez *S. pombe*, une mutation (*smn*) affectant la biogénèse et la formation de l'extrémité de snRNAs peut être supprimée par la sur-expression de Pac1 (Potashkin *et Frendewey*, 1990, Rotondo *et al.*, 1995) suggérant que Pac1 pourrait aussi être impliquée dans la production de snRNAs.

De plus, la RNase III de *S. pombe* a aussi été isolée dans un criblage pour découvrir des gènes capables d'inhiber la conjugaison et la sporulation lorsque sur-exprimées dans des levures de type sauvage (*wt*) (Xu *et al.*, 1990). De même que dans un criblage pour identifier des gènes qui sont suppresseurs de la mutation *pat1^{ts}* lorsque sur-exprimés (Iino *et al.*, 1991). La limitation en nitrogen déclenche l'expression de gènes comme *mei2* requis pour la transition du cycle cellulaire mitotique à la méiose. Or, Pat1 est une protéine kinase qui régule négativement la méiose et qui doit être inactivée par la liaison de Mei3 pour que *S. pombe* puisse entrer en méiose (Beach *et al.*, 1985, Iino *et*

Yamamoto, 1985, McLeod et Beach, 1988). La sur-expression de Pac1, dans le mutant *pat1^{ts}* supprimerait la mutation en inhibant l'expression de *mei2* (Watanabe *et al.*, 1988). Comme Pac1 est une RNase III, l'expression du gène *mei2* est peut-être inhibée de façon post-transcriptionnelle par la dégradation rapide de son ARNm par Pac1. Mais, de toute façon, ce qui est important ici c'est qu'une RNase III s'est révélée jouer un rôle dans l'inhibition de la transition vers la méiose, ce qui par conséquent inhibe la sporulation et la conjugaison de *S. pombe*.

Une autre fonction associée à une RNase III est le contrôle de l'expression des gènes par la maturation et la dégradation d'ARNm chez *E. coli* (pour une revue: Court, 1993). Cette RNase III peut ainsi activer ou inhiber l'expression des gènes des phages λ ou T7. De plus, la RNase III de *E. coli* est capable d'auto-réguler son expression. Dans la séquence leader du gène *rnc*, une structure en épingle est présente pour stabiliser le transcrit, la RNase III peut cliver cette épingle afin d'initier la dégradation de l'ARNm lorsqu'il n'y a pas assez de substrats pour la RNase III dans la cellule (Court, 1993). Finalement, la délétion de la RNase III semble avoir un effet sur l'expression d'environ 10% des protéines qui sont alors soit sur-exprimées ou sous-exprimées (Gitelman et Apirion, 1980, Takata *et al.*, 1987) suggérant une fonction potentielle pour les RNases III dans la régulation globale de l'expression.

La RNase III de *E. coli* a aussi montrée une implication dans le contrôle des ARN antisens. Quelques gènes dans la bactéries ou les phages sont transcrits dans les deux sens, et la version antisens va s'hybrider au transcrit sens et inhiber la traduction en formant un duplex. La ribonucléase reconnaît ces duplex d'ARN et les dégradent pour en

débarrasser la cellule. Dans d'autres cas, la dégradation d'un duplex spécialement formé pour diminuer l'expression de *repA* par la RNase III, permet d'inhiber la réplication du plasmide R1. Ce phénomène de répression de l'expression de gènes par des ARN antisens est aussi observé chez les eucaryotes supérieurs et est appelé ARN interférence (RNAi) ou PTGS pour «post-transcriptional gene silencing» (pour revues: Bass, 2000, Bernstein *et al.*, 2001, Fjose *et al.*, 2001). Diverses RNases III orthologues portant toutes le même nom, Dicer, ont été identifiées chez *C. elegans*, *D. melanogaster*, l'humain et la souris. Celles de *C. elegans* et *D. melanogaster* sont effectivement impliquées dans la RNAi probablement par le clivage des duplex d'ARN formés par l'hybridation de l'antisens avec le transcrit ARN (Ketting *et al.*, 2001, Nicholson et Nicholson, 2002).

Pour les levures, d'autres phénotypes associés à la délétion de *RNT1* peuvent peut-être nous donner des indices sur de nouvelles fonctions possibles pour Rnt1p. Premièrement, Rnt1p n'est pas essentielle, mais sa délétion compromet sévèrement la croissance des levures à 30°C et la croissance est complètement inhibée à la température restrictive de 37°C. À 26°C, les levures $\Delta RNT1$ peuvent encore pousser mais de façon ralentie. Certains facteurs nécessaires pour la survie des levures aux températures élevées pourraient être affectés par la délétion de Rnt1p. Par ailleurs, lorsqu'une culture de ces cellules dans du milieu riche est transférée de 26°C à 37°C, les levures $\Delta RNT1$ flocculent rapidement, formant des agrégats cellulaires qui tombent au fond de l'ermeneyer. De plus, un autre fait qui a été remarqué, c'est qu'en absence de Rnt1p, les levures ne peuvent croître sur un milieu minimal sans leucine, même si elles sont transformées avec un vecteur exprimant Leu2p (S. Abouelela, comm. pers.).

Donc, parce que Rnt1p est déjà connue pour être impliquée dans 3 étapes de la biogénèse des ribosomes, de façon directe; clivage en 3' du pré-ARNr 35S, ou de façon indirecte; dans les modifications covalentes du pré-ARNr de par sa synthèse des snoRNAs et la synthèse des protéines ribosomales de par son implication dans la production des snRNAs, celle-ci semble être un beau modèle pour poursuivre les investigations sur les fonctions des RNases III. Il est certain que plusieurs fonctions pourront encore être découvertes pour *S. cerevisiae*, à savoir si la version eucaryote pourrait aussi être impliquée dans la maturation d'ARNm, ou si Rnt1p pourrait aussi être impliquée dans le cycle cellulaire ou la sporulation ou dans le contrôle de la croissance. Avec les nombreuses fonctions déjà répertoriées pour les RNases III, on peut se demander si cette protéine ne pourrait pas servir de régulateur global de la synthèse des ribosomes en fonction de la croissance et de la différenciation.

Ainsi, afin de découvrir d'autres fonctions pour Rnt1p et mieux comprendre son rôle dans la levure, nous avons choisis de partir à la recherche de partenaires cellulaires protéiques de la ribonucléase III. Pour ce faire, une technique à la fois simple et puissante, permettant de gérer et sélectionner facilement un large éventail de candidats pour l'interaction avec Rnt1p sera utilisée; le système double-hybrides (Fields et Song, 1989). Ce système utilise justement la levure *S. cerevisiae* comme hôte, ce qui veut dire que les découvertes seront faites *in vivo*. Les principes de la méthode sont assez simples. Le facteur de transcription Gal4p de *S. cerevisiae*, est composé d'un domaine de liaison à l'ADN (BD), liant les promoteurs *GAL* et d'un domaine d'activation (AD) interagissant avec les constituants de la Pol II pour la recruter (figure 5A). Les deux domaines peuvent être séparés sans altérer la conformation de chacun, cependant l'activation des gènes *GAL*

ne sera plus possible. Chacun des domaines peut ensuite être fusionné avec chacun une protéine différente, ici, Rnt1p sera fusionnée à BD de Gal4p et la protéine X à AD. La transformation des levures avec les protéines de fusion séparément ne permettra pas non plus d'activer la transcription des gènes GAL (figure 15, B et C). Par contre, si les deux fusions sont utilisées pour co-transformer les levures, et qu'il y a interaction entre Rnt1p et la protéine X, les deux domaines de Gal4p se retrouveront à proximité l'un de l'autre. Le facteur Gal4p sera ainsi reconstitué grâce à l'interaction de Rnt1p avec X, et la transcription des gènes sous le contrôle des promoteurs GAL pourra se faire (figure 5D). Les gènes sous le contrôle des promoteurs GAL ont été remplacés par des gènes rapporteurs dans des levures spécialisées pour tester les interactions. Ces gènes sont *HIS3*, *ADE2* et *lacZ* et peuvent donc permettre de détecter facilement une interaction entre deux protéines par leur activation. À la place de la protéine X, une banque de gènes de levures clonés en fusions avec le AD de Gal4p peut être utilisée pour être co-transformée avec BD/Rnt1p, permettant ainsi de tester les interactions protéine-protéine entre Rnt1p et toutes les protéines du protéôme de la levures. La stratégie de sélection de ces interactions sera décrite en détail dans le chapitre 1. Le système double-hybrides peut aussi être utilisé pour tester la dimérisation d'une protéine et déterminer les domaines nécessaires pour sa dimérisation. C'est ce qui sera aussi réalisé avec Rnt1p afin de déterminer sa conformation.

Finalement, les objectifs de mes recherches sont: 1) définir la conformation de Rnt1p requise pour son activité dans la cellule; 2) identifier ses partenaires cellulaires par un criblage exhaustif d'une banque de gènes de levures; et 3) découvrir la signification

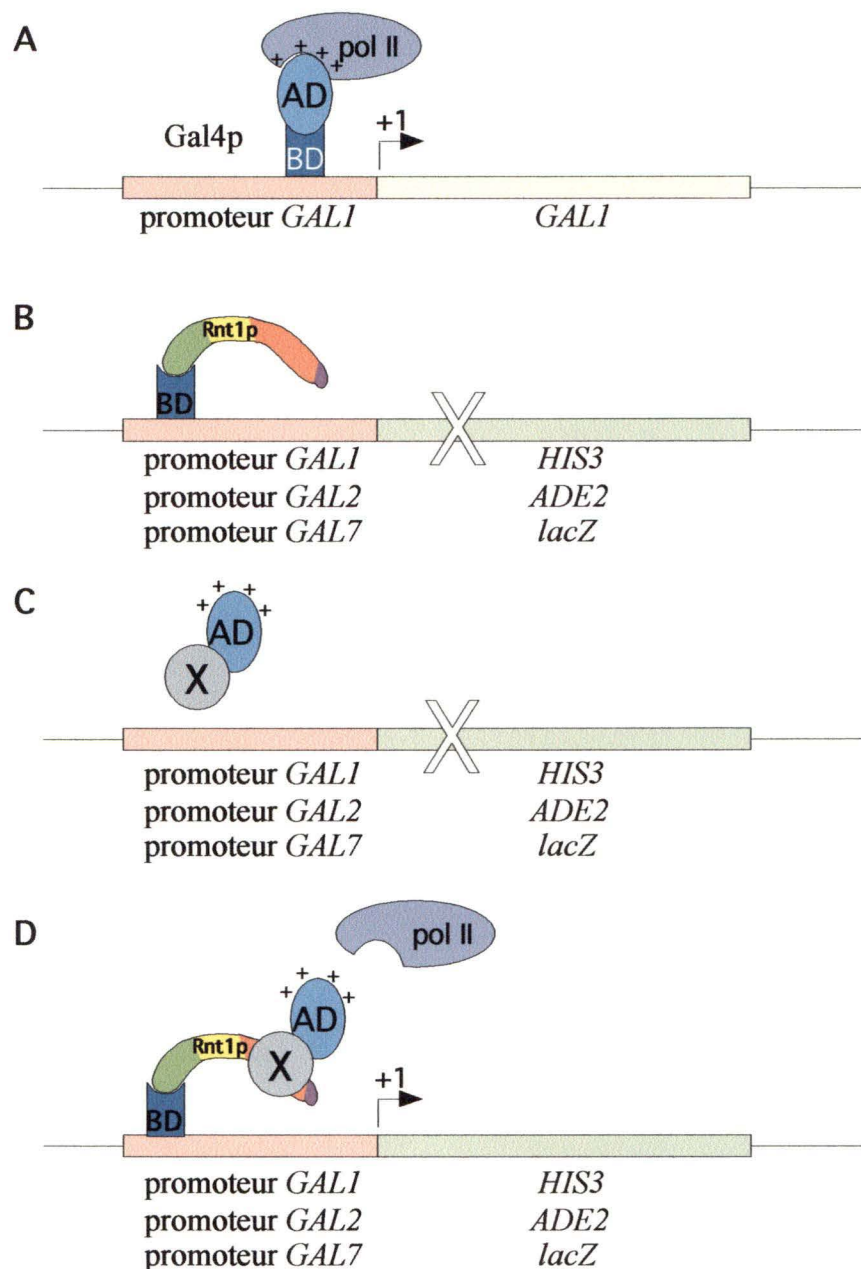


Figure 5: Principes du système double-hybrides qui sera utilisé pour identifier des interactions protéine-protéine avec Rnt1p. (A) Le facteur de transcription Gal4p possède un domaine de liaison à l'ADN (BD) permettant de se lier aux promoteurs des gènes *GAL1*, *GAL2* et *GAL7* et un domaine d'activation (AD) permettant de recruter le complexe de l'ARN polymérase II. Lorsque les deux domaines de Gal4p sont séparés l'un de l'autre, il n'y a plus de transcription possible à ces promoteurs. (B) Lorsque Rnt1p est fusionnée à BD de Gal4p, la transcription des gènes rapporteurs sous le contrôles de promoteurs GAL ne peut être activée. (C) C'est la même chose pour une protéine X fusionnée à AD de Gal4p provenant d'une banque de gène, car elle ne peut lier les promoteurs. (D) Cependant si Rnt1p interagit avec X, cela permet la reconstitution de l'activateur transcriptionnel et la transcription des gènes rapporteurs est activée.

biologique d'au moins une de ses interactions physiques. L'accomplissement de ces objectifs de recherche permettra d'en connaître davantage sur les fonctions et le rôle de Rnt1p et des RNases III en général dans la cellule.

Chapitre 1

Définition de la conformation de Rnt1p.

Matériel et Méthodes:

Génotypes des souches de levures et bactéries

Escherichia coli DH5 α : F ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17*(r κ ⁻m κ ⁺) *deoR thi-1 phoA supE44 λ ⁻gyrA96 relA1*

Escherichia coli AG1688: MC1061 F'128 *lacI^f lacZ::Tn5* (Zeng *et al.*, 1997)

Saccharomyces cerevisiae Δ RNT1: *MATa α ; ura3-1/ura3-1; trp1 Δ /trp1 Δ ; ade2-1/ade2-1; leu2-3,112/leu2-3,112; his3-11,15/his3-11,15 rnt1 Δ ::TRP1* (Chanfreau *et al.*, 1998)

Saccharomyces cerevisiae *rnt1⁻*: *MAT α , leu2, trp1, ura3-52, lys2 Δ , his3-d200, prb1-1122, pep4-3, prc1-407, rnt1::HIS3* (Abou Elela *et al.*, 1996)

Saccharomyces cerevisiae PJ69-4a: *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 (LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ)* (James *et al.*, 1996)

Phage et vecteurs pour le système répresseur λ

[λ] KH54 (phage ayant le gène *cI* délété)

pJH391 (vecteur pour la construction de la fusion avec la partie N-terminale du répresseur *cI* de λ), pFG157 (gène répresseur *cI* intact, contrôle positif du système), pKH101 (partie N-terminale du répresseur *cI*, contrôle négatif du système) (Zeng *et al.*, 1997).

Construction des plasmides

RNT1 a été cloné en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN ou le domaine d'activation de Gal4p en utilisant les vecteurs de la série pGBDU-C1, -C2, -C3 (James *et al.*, 1996) ou pACT2 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, Calif.) respectivement.

BD/RNT1 a été cloné par amplification du gène *RNT1* par PCR en utilisant les oligos 5'-CAAGCTTTTGGATCCAATGGGCTC-3' et 5'-CCATCATGGTCGACTAAAAGGAA-CG-3' introduisant des sites BamHI et SalI en 5' et 3' du gène. Ce produit de PCR fut ensuite cloné dans les sites BamHI et SalI du vecteur pGBDU-C3 dans le cadre de lecture avec le domaine d'interaction à l'ADN de Gal4p. Plusieurs des délétions ou fragments de Rnt1p furent ensuite clonés en utilisant les enzymes de restrictions coupant dans le gène de *RNT1* (voir figure 6) ou dans le vecteur pGBDU-C3. Pour faire BD/ Δ DS1, BD/RNT1 fut digéré avec PstI, relâchant un fragment de 250 pb, et le plasmide fut relié sur lui-même. BD/ Δ CT fut cloné en retirant le fragment AvrII de BD/RNT1. BD/NT2 a été créé en transférant le fragment SmaI-XhoI de AD-NT2 dans les sites SmaI et SalI de pGBDU-C3. BD/ Δ NT1 fut construit en reliant les extrémités remplies de BD/RNT1 digéré avec les enzymes BamHI et PvuII. Le fragment EcoRV C-terminal de BD/RNT1 a été transféré entre les sites SmaI et EcoRV de pGBDU-C1 pour obtenir BD/ Δ NT2. BD-DS1 fut obtenu par digestion de pRS316/RNT1 Δ HindIII avec BamHI et XhoI et clonage dans pGBDU-C1 digéré avec BamHI et SalI (fragment C-terminal de RNT1 à partir du deuxième HindIII). BD/DS3 est le résultat de la digestion de BD/DS1 avec les enzymes AvrII et BglII, remplissage des extrémités et re-ligation du plasmide. BD/DS4 a été cloné en transférant le fragment PstI C-terminal de BD/DS1 dans le vecteur pGBDU-C2 digéré avec PstI. AD/RNT1 fut construit en clonant le fragment BamHI-BglII de BD/RNT1 dans les sites BglII de pACT2, toutes les extrémités ont été rendues franches avant la ligation pour avoir le bon cadre de lecture. BD/RNT1 a été digéré avec HindIII et SmaI pour obtenir un fragment dont les extrémités ont été remplies avant le clonage dans le site SmaI de pACT2 pour donner AD/ Δ DS1. AD/NT1 a été obtenu par mutagenèse aléatoire;

un codon stop s'est introduit après l'acide aminé 116 de AD-RNT1 (B. Lamontagne, comm. pers.). AD/NT2 a été généré par insertion d'un fragment BamHI-NheI de pQE31/N-term (Lamontagne *et al.*, 2000) aux extrémités remplies dans pACT2 digéré BamHI et rempli. L'insertion après remplissages du fragment BamHI-EcoRV de BD/ Δ NT1 dans le site BglII de pACT2 a donné le plasmide AD/NT3. Alors que AD/ Δ NT1 et AD/ Δ NT2 ont été obtenus par PCR avec l'oligo 5'-GGAACGTTTCA-GCTTG-3' hybridant à la fin de *RNT1* et les oligos en 5'; 5'-ACTGGCAGCTGAATT-AAAAACC-3' et 5'-AAAGGCTGGTG-ATATCG-3' respectivement. Les 2 fragments furent ensuite clonés dans le site SmaI de pACT2. AD/DS1 a été obtenu après 3 étapes de clonage: Un fragment BamHI-XhoI de pRS316/RNT1 Δ HindIII a été transféré dans les sites BamHI et XhoI de pACT2, puis le plasmide fut digéré avec SmaI et EcoRV et le fragment fut sous-cloné dans les sites BglII et EcoRV aux extrémités remplies de pACT2. Finalement, ce dernier plasmide fut digéré par BamHI, rempli aux extrémités et re-lié sur lui-même pour obtenir un DS1 dans le cadre de lecture avec AD de Gal4p. pJH/RNT1, a été construit en insérant un fragment BglII-EcoRI généré par digestion partielle de BD/RNT1 dans les sites SalI et BamHI du vecteur pJH391 (les extrémités ayant été remplies avec la DNA polymérase Klenow). Tous les plasmides furent séquencés en 5' pour confirmer qu'ils étaient dans le cadre de lecture avec le gène *GAL4* ou séquencés au complet lorsqu'une étape d'amplification par PCR a été nécessaire pour le clonage (données non-montrées).

Croissance et transformation des levures

Les levures ont été cultivées et manipulées selon les procédures standard (Guthrie et Fink, 1991, Rose *et al.*, 1990). La transformation des cellules $\Delta RNT1$, $rnt1^-$, et PJ69-4A a été réalisée en suivant le protocole de transformation à l'acétate de lithium induite au DMSO (Hill *et al.*, 1991). Le protocole utilisé est présenté en détail en annexe IV.

Test de complémentation du phénotype des cellules $rnt1^-$

Tous les plasmides construits contenant *RNT1* ou des fragments de *RNT1* ont été testés pour la complémentation du phénotype de sensibilité aux températures élevées d'une souche de levures $\Delta RNT1$ dont le gène *RNT1* a été délété. Pour ce faire, les cellules $\Delta RNT1$ furent cultivées en milieu riche à 26°C, puis ont été transformées avec chaque plasmide exprimant Rnt1p ou une partie de Rnt1p en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4p. Le mélange de transformation a été étalé sur milieu minimal sans uracil, pour la sélection de la présence du plasmide BD/RNT1 exprimant le gène marqueur *URA3*, et incubé à 26°C pour 7 jours. Une colonie pour chacun des plasmides testés a été transférée sur 3 pétris de milieu minimal sans uracil et chaque pétri fut incubé à 26°C, 30°C ou 37°C. La complémentation du phénotype de sensibilité à la température des levures $\Delta RNT1$ est observable par l'habileté de la souche transformée à croître à 30°C et 37°C. Pour la famille de plasmides AD/RNT1 ayant pour marqueur de sélection *LEU2*, chaque plasmide a été inséré dans les cellules $\Delta RNT1$ pré-transformées avec BD/RNT1 et cultivées à 30°C. La sélection des levures exprimant les deux plasmides a été faite par étalement sur milieu minimal sans uracil ni leucine à 30°C. Les levures furent ensuite transférées sur milieu sans leucine contenant du 5-FOA (5-fluoroorotic acid) à 26°C pour

sélectionner celles qui ont perdu le plasmide contenant le marqueur *URA3* mais conservé le plasmide AD/RNT1. La complémentation des levures $\Delta RNT1$ avec les plasmides AD/RNT1 est vérifiée en transférant ensuite la souche ne contenant plus que le plasmide exprimant Leu2p et Rnt1p ou un fragment de Rnt1p sur milieu sans leucine et en incubant à 26°C, 30°C et 37°C.

Test d'interaction entre les constructions BD/ et AD/RNT1 ou fragments de RNT1

Chaque constructions de RNT1 dans BD/ et AD/ furent utilisées pour co-transformer les cellules PJ69-4A. Les levures ont été sélectionnées pour l'insertion des deux constructions BD/ et AD/ en étalant le mélange de transformation sur des pétris de milieu minimal sans lysine, sans uracil et sans leucine. Une colonie pour chaque duo de constructions fut ensuite propagée sur le même milieu minimal avant d'être transférée sur milieu minimal sans adénine ou sans histidine additionné de 10mM 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) pour le test d'interaction. Toutes les incubations ont été faites à 30°C pour 3 jours. Les duos de constructions qui pouvaient activer l'expression des gènes rapporteurs *ADE2* et *HIS3* ont ensuite été testés pour vérifier l'expression du gène *lacZ*. Deux types de tests ont été utilisés: Le test de X-gal sur pétri consiste à recouvrir d'une couche d'agarose contenant 20 mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal), un pétri de milieu minimal sur lequel on a fait croître tous les co-transformants à comparer. Après incubation à 37°C durant 0,5 à 1,5 heures, le pétri sur lequel la couleur vis-à-vis des stries de levures s'est développée a été photographié. Le test de β -gal en liquide nécessite une petite culture en phase logarithmique pour chaque levure à tester. Les cellules sont lysées pour libérer la β -galactosidase et l'ajout de substrat chromogénique *O*-nitrophényl-

β -D-galactoside (ONPG) dans le lysat permet de mesurer l'activité de l'enzyme. Deux protocoles similaires ont été utilisés, voir en annexe IV.

Test de dimérisation de Rnt1p dans le système répresseur de λ

Le test du système répresseur de λ a été réalisé tel que décrit par Jim C. Hu (Zeng *et al.*, 1997). Pour le test de plages de lyses, *E. coli* AG1688 exprimant *cI-N-term/Rnt1p*, le répresseur *cI* intact ou *cI-N-term* seul, ont été cultivées jusqu'à saturation dans du milieu λ (1% tryptone, 0.25% NaCl, 0.2% maltose, 10mM MgSO₄ et 50 μ g/mL ampicillin). Un volume de 300 μ L de cette culture est mélangé à 3mL d'agar de surface λ (0.5% extrait de levures et 0.7% agar dans du milieu λ) pour être ensuite étalé sur un pétri frais d'agar λ (milieu λ et 1% agar) pour former une couche de bactéries. Chaque couche de bactéries fut ensuite infectée par 6 dilutions de phages lytiques λ KH54 contenant 5X10⁸ à 1X10⁶ UFP par volume de 5 μ L déposé. Les pétris ont été incubés à 30°C durant 18 heures et les plages formées ont été photographiées.

Western blot

Les constructions de RNT1 avec BD ou AD ont été testées par western blot pour vérifier l'expression des protéines de fusion. Les levures PJ69-4a transformées avec chaque construction ont été cultivées jusqu'en phase stationnaire dans 50mL de milieu minimal approprié et les protéines cellulaires ont été extraites par méthode TCA (Sambrook *et al.*, 1989)(voir protocole détaillé en annexe IV). Les extraits de protéines ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose (MSI, Westborough, Mass.). L'analyse western a été réalisée comme décrit précédemment (Harlow et Lane, 1988).

La membrane a été hybridée avec l'anticorps monoclonal contre BD de Gal4p ou l'anticorps polyclonal contre AD de Gal4p (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif.). Les bandes de protéines ont été visualisées avec le kit ECL (Amersham, Arlington Heights, Ill.) . Le niveau d'expression a été estimé en utilisant le programme Molecular Analyst (Bio-Rad Industries).

Résultats:

Définir la conformation d'une enzyme aide à découvrir son fonctionnement. Plusieurs outils sont disponibles pour déterminer si une protéine forme un dimère ou un oligomère, le système double-hybrides permet de la décortiquer pour découvrir quelles parties interagissent ensemble. Rnt1p peut être décomposée en ses domaines ou en fragments plus petits pour être fusionnés à une des deux parties d'un activateur transcriptionnel et être testée pour l'interaction entre chaque domaine ou fragment. La présence de plusieurs sites reconnus par des enzymes de restriction dans le gène *RNT1* a facilité le clonage de fragments de différentes tailles couvrant la moitié, un, ou deux domaines de Rnt1p dans les deux vecteurs du système exprimant BD ou AD de Gal4p (figure 6). Un total de 9 fusions de Rnt1p avec BD et 8 fusions avec AD ont été créées. Avant de tester celles-ci dans le système double-hybrides, les constructions ont été utilisées pour transformer les levures Δ RNT1 afin de vérifier leur habileté à compléter le phénotype de sensibilité aux températures élevées. Tel que prévu, peu des fragments de Rnt1p se sont avérés fonctionnels (tableau 1). Les constructions BD/RNT1 et AD/RNT1, où Rnt1p est complète, peuvent compléter les Δ RNT1 démontrant que la fusion à Gal4p n'affecte pas la fonction de l'enzyme. De plus, les constructions contenant au moins les deux domaines C-terminaux complets, c'est-à-dire le domaine de liaison à l'ARN plus le domaine d'activité nucléase, que sont BD/ Δ NT1, BD/ Δ NT2, AD/ Δ NT1 et AD/ Δ NT2, peuvent aussi permettre la croissance des levures Δ RNT1 à 37°C. L'absence du domaine N-terminal de Rnt1p ne semble donc pas inactiver la fonction de l'enzyme alors que l'absence du dsRBD et/ou du domaine nucléase résulte en une protéine ayant vraisemblablement

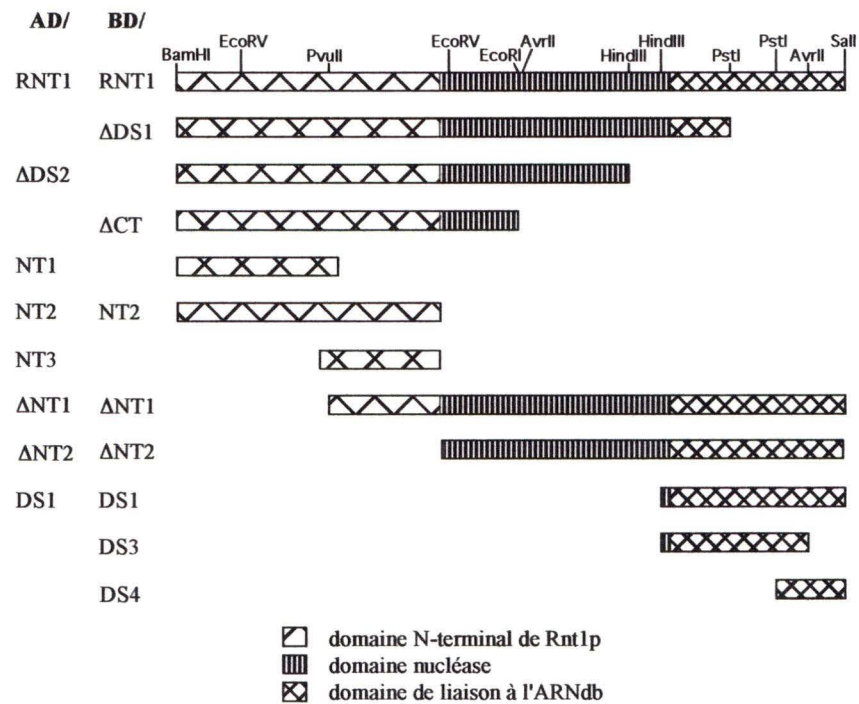


Figure 6: Schéma représentant les différentes constructions de fragments de Rnt1p en fusion avec le domaine BD ou AD de Gal4p qui ont été testées pour interaction dans le système double-hybrides.

Fusions	Niveau d'expression	Complémentation
BD	100%	non
BD/RNT1 (1-471)	26.08%	oui
BD/ Δ DS1 (1-395)	3.46%	non
BD/ Δ CT (1-243)	1.57%	non
BD/NT2 (1-191)	29.36%	non
BD/ Δ NT1 (104-471)	18.79%	oui
BD/ Δ NT2 (192-471)	39.99%	oui
BD/DS1 (344-471)	3.91%	non
BD/DS3 (344-450)	17.58%	non
BD/DS4 (428-471)	26.02%	non
AD	100%	non
AD/RNT1 (1-471)	56.80%	oui
AD/ Δ DS2 (1-321)	32.69%	non
AD/NT1 (1-116)	+	non
AD/NT2 (1-191)	26.98%	non
AD/NT3 (104-191)	50.46%	non
AD/ Δ NT1 (101-471)	ND	oui
AD/ Δ NT2 (188-471)	ND	oui
AD/DS1 (344-471)	0.72%	non

Tableau 1: Tests des constructions de Rnt1p par western blot et par complémentation. Les extraits cellulaires de protéines de levures PJ69-4a transformées par chaque construction, ont été analysés par western blot avec les anticorps anti-BD et anti-AD. La quantité de protéines exprimées pour chaque fusion a été comparée en pourcentage par rapport au niveau d'expression de BD ou AD de Gal4p dans PJ69-4a (un + indiquant que l'expression a été vérifiée mais pas évaluée par rapport aux autres). Le test de complémentation du phénotype de sensibilité aux températures élevées des cellules Δ RNT1 a été réalisé pour chaque protéine de fusion. «oui» indique qu'il y a eu complémentation parce que la fusion de Rnt1p était fonctionnelle dans les levures Δ RNT1, permettant à celles-ci de pousser à 37°C. «non» indique aucune croissance observable à 37°C. ND = non déterminé.

blement perdue toute activité. Le manque de complémentation pourrait aussi être dû à l'inexpression de la protéine de fusion et non pas dû à l'absence d'un domaine important. C'est pourquoi l'expression de chaque protéine de fusion a aussi été vérifiée par western blot. Les levures PJ69-4A, utilisées dans le système double-hybrides, ont été transformées avec chacune des constructions de Rnt1p séparément. Les protéines ont ensuite été extraites des levures, séparées sur gel et transférées sur une membrane pour être détectées avec un anticorps anti-BD ou anti-AD de Gal4p selon que les protéines sont fusionnées à BD ou AD. Les blots ont ensuite été numérisés (avec scanner) et l'intensité des bandes représentant chaque fusion a été estimée en comparant avec l'intensité de BD ou AD exprimés dans les PJ69-4A. Le tableau 1 présente le niveau d'expression de chaque protéines de fusion par rapport à la quantité relative de BD ou AD exprimés (ceux-ci étant 100%). La plupart des fusions avec Rnt1p sont largement exprimées; 10 sur 14 le sont à un niveau de 17% à 56% par rapport aux domaines de Gal4p. L'expression des 4 autres (BD/ Δ DS1, BD/ Δ CT, BD/DS1 et AD/DS1) tourne autour de 0.7% à 4% ce qui sera suffisant pour observer des interactions entre chacun avec le système double-hybrides. L'expression de AD/NT1 a aussi été confirmée par western mais n'a pu être comparée aux autres protéines, alors que AD/ Δ NT1 et AD/ Δ NT2 n'ont pas été testées, cependant le test de complémentation a confirmé que ces deux dernières sont fonctionnelles. L'important ici était de démontrer que toutes les protéines de fusion sont présentes dans la cellule pour les tests d'interaction qui suivront.

Les tests double-hybrides ont été réalisés en utilisant les levures PJ69-4A créées pour détecter les interactions grâce à trois gènes rapporteurs, *HIS3*, *ADE2* et *lacZ* sous le

contrôle de trois promoteurs différents, *GAL1*, *GAL2* et *GAL7* respectivement (James *et al.*, 1996). Ces levures ont été transformées avec toutes les combinaisons possibles de plasmides exprimant BD et AD fusionnés avec les fragments de Rnt1p (un BD avec chaque AD). L'interaction entre deux protéines de fusion a été détectée en vérifiant l'expression des trois gènes rapporteurs, c'est-à-dire par la croissance des co-transformants sur milieu minimal sans histidine, sur milieu minimal sans adénine et par test de β -gal (tableau 2). Les résultats obtenus sont assez complexes: Les tests du système double-hybrides démontrent que BD/Rnt1p et AD/Rnt1p ne peuvent interagir ensemble ce qui suggère que Rnt1p ne formerait pas un dimère. Mais, certaines autres constructions fragmentées de Rnt1p proposent le contraire. Par exemple BD/NT2, couvrant tout le domaine N-terminal de Rnt1p, est capable d'activer l'expression des trois gènes rapporteurs avec AD/RNT1. BD/NT2 semble aussi pouvoir interagir avec AD/NT2, et avec le dsRBD (AD/DS1) ou des constructions contenant le dsRBD (AD/ Δ NT1 et AD/ Δ NT2). Donc, il existe des interactions entre deux domaines N-terminaux et entre un domaine N-terminal et un dsRBD. Les données du test de β -gal indiquent que l'interaction est plus forte entre NT2 et NT2 (51.2 U) que entre NT2 et dsRBD (environ 5 U) suggérant la présence d'un signal de dimérisation plus fort entre les deux domaines N-terminaux de Rnt1p. En plus de parvenir facilement à activer les 3 gènes rapporteurs en présence de AD/NT2 ou AD/NT1, la fusion BD/DS1 semble interagir faiblement avec AD/dsRBD puisque seulement le gène *lacZ* semble être transcrit. Dans ce cas-ci, l'interaction semble donc plus forte entre le dsRBD et le domaine N-terminal que entre deux dsRBD. Cependant, BD/DS1 et AD/DS1 étant exprimés à un niveau beaucoup faible que les NT2 (0.7-3.9% vs 27-29%), la quantité plus

fusions AD/ fusions BD/	RNT1 (1-471)	Δ DS2 (1-321)	NT1 (1-116)	NT2 (1-191)	NT3 (104-191)	Δ NT1 (101-471)	Δ NT2 (188-471)	DS1 (344-471)
RNT1 (1-471)	-/-	h/-/0.24	hhh/aaa/16.14	hhh/aaa/13.32	-/-	h/-/0	h/-/	-/-/0.71
Δ DS1 (1-395)	-/-	-/-	ND	hh/aa/-	-/-	-/-/ND	-/-	-/-
Δ CT (1-243)	-/-	h/a/0	ND	hh/aaa/10.27	-/-	-/-/ND	-/-	-/-/0.07
NT2 (1-191)	hh/aa/9.68	hh/aa/17.23	h/aa/ND	hhh/aaa/51.2	h/a/2.92	-/-/ND	h/-/zz	h/-/5.62
Δ NT1 (104-471)	-/-	-/-/0.74	hhh/aaa/ND	hhh/aaa/0	-/-	h/-/ND	-/-	-/-
Δ NT2 (192-471)	-/-	-/-	hh/aa/ND	hh/a/0	-/-	h/-/ND	hh/-/	-/-
DS1 (344-471)	-/-	h/a/0.67	hh/aa/ND	hh/aa/5.11	-/-	-/-/ND	-/-	-/-/2.57
DS3 (344-450)	-/-	-/-	-/-/ND	-/-/0.52	-/-	-/-/ND	-/-	-/-
DS4 (428-471)	-/-	-/-/0.47	hhh/aa/ND	hh/aa/-	-/-	-/-/ND	-/-	-/-/1.34

Tableau 2: Résultats des tests d'interactions double-hybrides entre les fusions de fragments de Rnt1p au domaine d'interaction à l'ADN de Gal4p (BD) et les fusions de fragments de Rnt1p au domaine d'activation de Gal4p (AD). Les levures PJ69-4a ont été transformées avec les différents duos de protéines de fusions, les co-transformants ont été sélectionnés sur milieu minimal puis ont été transférés sur pétris de milieu minimal sans histidine (avec 10 mM 3-AT) ou sans adénine. «h» indique la croissance des co-transformants sur les pétris sans histidine, «a» indique la croissance des co-transformants sur pétris sans adénine et «-» indique l'absence de croissance sur pétris sans histidine ou sans adénine. La quantité de «h» et «a», donne une indication de la qualité de la croissance des colonies sur ces pétris, «h» indiquant de petites colonies et «hhh» de grosses colonies. Certains duos de fusions ont aussi été testés pour l'expression de *lacZ*, soit par test de X-gal sur pétri (qualitatif) ou par test de β -gal en liquide (quantitatif). Les résultats qualitatifs positifs sont présentés avec des lettres «z» alors que les résultats quantitatifs sont présentés en Unités de Miller. Les nombres entre parenthèses indiquent les acides aminés inclus dans les fragments de Rnt1p. «ND» veut dire non-déterminé.

faible de dimères de dsRBD présents dans les cellules pourrait diminuer leur efficacité à activer l'expression de tous les gènes rapporteurs. Ainsi, plusieurs constructions ne parviennent à stimuler l'expression des marqueurs que lorsque co-transformées avec le domaine N-terminal, c'est le cas de Rnt1p, Δ DS1 et Δ CT (Rnt1p au dsRBD tronqué), NT3 (partie centrale du N-terminal) et DS3 (dsRBD sans les 32 derniers acides aminés). D'autres constructions comme Δ NT1 et Δ NT2 peuvent activer faiblement seulement *HIS3*, un gène marqueur dont l'activation est moins stringente. Le plus petit fragment de Rnt1p à pouvoir interagir avec d'autres fragments est le DS4 de 43 acides aminés en C-terminal du dsRBD. DS4 semble interagir relativement fortement avec le domaine N-terminal (active *HIS3* et *ADE2* sans activer *lacZ*) et faiblement avec le dsRBD (*AD/DS1*) (active seulement un peu *lacZ*). Donc, le domaine N-terminal peut interagir avec toutes les protéines de fusion contenant le domaine N-terminal (fortement) ou le dsRBD (de façon plus faible). Le domaine de liaison à l'ARN peut, de plus, interagir avec lui-même et les résidus responsables de cette interaction semble se situer dans les 43 derniers acides aminés (DS4) du domaine. Aucune construction ne couvre que le domaine d'activité nucléase, donc la possibilité qu'il y ait aussi un signal de dimérisation au coeur de la protéine ne peut être éliminée. Finalement, le système double-hybrides semble avoir permis d'observer trois signaux de dimérisation; un entre deux NT2, un entre deux DS1 et un autre entre NT2 et DS1, suggérant la formation d'un dimère de Rnt1p. Mais, pour confirmer que l'enzyme forme un dimère *in vivo* dans sa forme native et que les signaux de dimérisation ne sont pas des artefacts à cause de l'utilisation de protéines tronquées, il aurait fallu que les 2 protéines complètes puissent aussi activer les gènes marqueurs du

système double-hybrides. La dimérisation de Rnt1p complète fut donc testée par le biais d'une autre méthode génétique; le système du répresseur du phage λ .

Ce système d'étude des homodimères prend place dans *E. coli* et utilise le répresseur *cI* du bactériophage λ pour la fusion avec la protéine à tester. Le répresseur de λ possède un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal et forme normalement un dimère grâce à son domaine C-terminal. La dimérisation est essentielle pour que le répresseur puisse se lier à l'opérateur et empêcher la transcription des gènes de λ nécessaires pour la lyse des bactéries. L'absence du domaine C-terminal résulte en une protéine non-fonctionnelle incapable de bloquer la transcription. Mais en fusionnant le domaine N-terminal avec une protéine pouvant former un dimère, le répresseur est reconstitué et les bactéries ne sont plus lysées par le phage λ (Hu, 1995). De plus, ce système peut être aussi utilisé pour différencier entre la formation d'un dimère et d'un tétramère (Zeng et Hu, 1997). Il s'agit alors d'utiliser des bactéries exprimant le gène *cat* sous le contrôle de deux sites opérateurs. La liaison du tétramère aux deux sites adjacents vient bloquer la transcription du gène *cat*. Le gène *RNT1* a donc été cloné en C-terminal du domaine de liaison à l'ADN du répresseur *cI* pour former une protéine chimérique, et la capacité de Rnt1p à dimériser et ainsi former un répresseur fonctionnel a été testée. La reconstitution du répresseur a été évaluée par un test de plages de lyses (figure 7). Les bactéries transformées avec les vecteurs exprimant soit *cI*-N-term/Rnt1p, le répresseur *cI* intact (contrôle positif) ou *cI*-N-term seul (contrôle négatif) ont été étalées sur pétri. Différentes concentrations de phages λ KH54 (délétés du gène de *cI*) ont été déposées sur les couches de bactéries et le développement des plages de lyses a été vérifié. La figure 7 présente les

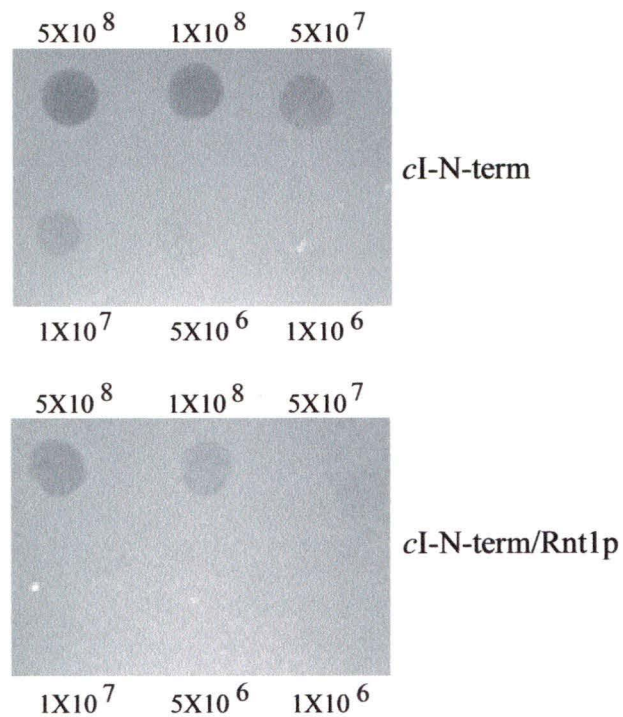


Figure 7: Le système du répresseur λ permet de confirmer la capacité de dimérisation de deux monomères de Rnt1p complets. Comparaison des plages de lyses laissées par les différentes dilutions de phages λ KH54 pour chacune des constructions. La partie N-terminale de *cI* ne peut dimériser et ne peut donc pas réprimer la lyse par les phages (en haut). Pour *cI-N-term/Rnt1p*, l'interaction entre deux Rnt1p permet de reconstituer le répresseur *cI* et l'activité lytique des phages s'en trouve diminuée (en bas) grâce à la répression partielle effectuée par le répresseur.

résultats sous forme de photographie des pétris pour *cI-N-term* et *cI-N-term/Rnt1p* avec des concentrations de phages variant de 5×10^8 à 1×10^6 UFP. Le pétri du répresseur *cI* intact ne montre aucune plages de lyses formées grâce à la répression totale de la transcription des gènes de lyse (non montré). Lorsqu'il n'y pas de signal de dimérisation adjacent au domaine N-terminal de *cI* (*cI-N-term*, figure 7) des plages de lyses sont visibles jusqu'à une concentration de 1×10^7 UFP de λ KH54, alors que pour les bactéries transformées avec *cI-N-term/Rnt1p*, les plages de lyses ne sont plus visibles après 1×10^8 UFP. Il y a donc une répression partielle de l'activité lytique grâce au chimère *cI-N-term/Rnt1p* signe que *Rnt1p* forme un dimère capable de rapprocher deux domaines N-terminaux du répresseur *cI* ce qui le rend fonctionnel. Ce résultat permet de compléter les observations faites à l'aide du système double-hybrides en démontrant que deux monomères complets de *Rnt1p* peuvent effectivement former un homodimère.

Discussion:

Suite à la découverte de la présence d'une orthologue eucaryote de la RNase III essentielle à la synthèse des ribosomes chez *S. cerevisiae* (Abou Elela *et al.*, 1996), les recherches ont porté principalement sur l'identification des substrats de Rnt1p. La première structure d'ARNdb clivée par Rnt1p à être identifiée a été l'extrémité 3' du pré-ARNr (Abou Elela *et al.*, 1996). Ceci confirma l'identité fonctionnelle de la protéine dont la séquence avait révélé une grande homologie avec la RNase III de *E. coli* responsable elle aussi de la première étape de clivage de l'ARNr bactérien. Plusieurs autres substrats de Rnt1p ont été identifiés depuis, parmi les snRNAs (Chanfreau *et al.*, 1997, Abou Elela et Ares, 1998, Seipelt *et al.*, 1999) et snoRNAs (Chanfreau *et al.*, 1998a, Chanfreau *et al.*, 1998b, Qu *et al.*, 1999, Giorgi *et al.*, 2001) alors que l'on commençait à peine à étudier sa conformation active et sa cinétique enzymatique (Lamontagne *et al.*, 2000, Lamontagne et Abou Elela, 2001).

Dans la présente recherche, la conformation adoptée par la ribonucléase III de *S. cerevisiae* a été étudiée de façon plus approfondie grâce aux systèmes double-hybrides et répresseur λ . Les tests double-hybrides entre les différentes constructions BD et AD de Rnt1p ont révélés trois signaux de dimérisation entre des domaines de Rnt1p. Le premier a été repéré entre deux domaines N-terminaux et constitue le plus fort signal de dimérisation, 51.2 unités de Miller pour BD/NT2:AD/NT2 dans un test de β -gal avec ONPG (tableau 2). Le deuxième signal, de force moyenne, est entre le domaine N-terminal et le dsRBD, alors que le troisième serait entre deux dsRBD et serait de nature

plus faible. En fait, toutes les interactions entre NT2 et toutes autres constructions contenant le domaine N-terminal sont assez fortes pour activer facilement tous les gènes rapporteurs du système double-hybrides et les unités de Miller mesurées varient entre 9.68 et 17.23. Alors qu'entre NT2 et les constructions ne contenant que le dsRBD sans domaine N-terminal, les interactions sont plus faibles, n'activant parfois que deux gènes rapporteurs et permettant de ne mesurer que de faibles unités de Miller (de 5.1-5.7 pour NT2:DS1, tableau 2). Par ailleurs, l'interaction entre deux dsRBD de Rnt1p, s'il y en a une, semble si fragile qu'elle n'a pu être détectée qu'avec le test β -gal en liquide révélant l'activation du gène *lacZ*. Cette apparente faiblesse d'interaction pourrait être due en partie au bas niveau d'expression de BD/DS1 et AD/DS1, 3.91% et 0.72% respectivement comparativement à 27-29% pour les deux NT2 (tableau 1). Néanmoins, étant donné que l'interaction entre deux domaines N-terminaux résulte en une plus forte expression de β -galactosidase qu'entre un domaine N-terminal et le dsRBD, cela suggère une conformation dimérique de Rnt1p en parallèle. Le signal de dimérisation qui serait présent entre deux dsRBD favorise aussi cette conformation. Ainsi la dimérisation de Rnt1p se ferait grâce aux interactions inter-moléculaires entre les domaines N-terminaux et entre les domaines de liaison à l'ARN de chaque monomère. Cependant, il est aussi possible qu'une autre conformation en dimère anti-parallèle existe puisque qu'une interaction N-terminal:dsRBD a été détectée. Rnt1p pourrait par exemple, changer de conformation suite à la liaison avec l'ARNdb ou suite à une modification par une autre protéine. À moins que, cette interaction entre le domaine N-terminal et le dsRBD soit intra-moléculaire, c'est-à-dire à l'intérieur d'un monomère de Rnt1p ou de chaque molécule composant le dimère. Cette interaction supplémentaire pourrait favoriser le

repliement tridimensionnel de la protéine et stabiliser sa conformation en solution. D'autres indices sur la conformation de Rnt1p révélés par des expériences réalisées par des collègues ou d'autres groupes seront discutés plus loin.

La lacune du système double-hybrides a été de ne pas pouvoir démontrer qu'il y a association entre deux molécules de Rnt1p complètes en fusion avec BD ou AD de Gal4p. On sait que la fusion de Rnt1p à chacun des domaines de Gal4p n'affecte pas la fonction de l'enzyme puisque chacune des deux constructions peut compléter le phénotype de sensibilité aux températures élevées des cellules *rnt1⁻*. De plus, si la dimérisation de Rnt1p est nécessaire pour sa fonction, alors la capacité de Rnt1p à former un dimère ne semble pas être affectée pour BD/Rnt1p et AD/Rnt1p. Autant BD/Rnt1p que AD/Rnt1p pourrait s'homodimériser dans les cellules *rnt1⁻*. Ce pourrait donc être la capacité de BD de Gal4p à lier l'ADN ou AD de Gal4p à recruter la machinerie transcriptionnelle qui soit affectée lorsqu'en fusion avec Rnt1p complet. Puisque BD/Rnt1p semble pouvoir activer les gènes rapporteurs avec plusieurs constructions de Rnt1p autres que AD/Rnt1p, alors que AD/Rnt1p ne semble pouvoir interagir qu'avec NT2, le problème pourrait se situer au niveau du domaine d'activation de Gal4p en fusion avec Rnt1p. Une hypothèse a été posée qui est que la présence d'une interaction intra-moléculaire, l'interaction entre le domaine N-terminal et le dsRBD, dans le monomère de Rnt1p refermerait la protéine sur elle-même et camouflerait le domaine d'activation de Gal4p fusionné au domaine N-terminal de Rnt1p. Les charges positives de Gal4p n'étant pas exposées, le complexe transcriptionnel ne pourrait être recruté par Gal4p aux promoteurs des gènes rapporteurs. Parmi toutes les constructions, BD/Rnt1p et AD/Rnt1p sont les seules dont le lien intra-moléculaire est intact. La liaison de BD/NT2 avec AD/Rnt1p serait en mesure de

compétionner avec l'interaction intra-moléculaire et d'affaiblir ou de défaire la structure compacte de AD/Rnt1p parce que l'interaction NT2:NT2 est plus forte. Et donc, en présence de BD/NT2, la protéine de fusion AD/Rnt1p pourrait adopter une conformation tridimensionnelle plus relâchée exposant le domaine d'activation. Par contre, aucune autre construction de Rnt1p avec BD ne pourrait solidement compétionner avec l'interaction intra-moléculaire (tableau 2). De plus, la présence du domaine d'activation de Gal4p en N-terminal pourrait resserrer la conformation refermée de Rnt1p, car dans le cas de BD/Rnt1p, l'interaction NT2:DS1 n'empêche pas la liaison de BD de Gal4p à l'ADN des promoteurs ni l'interaction avec les différentes constructions AD de Rnt1p. Cette hypothèse est actuellement testée à l'aide des expériences suivantes (B. Lamontagne, comm. pers.). Des mutations aléatoires sont introduites dans AD/Rnt1p par PCR pour tenter de modifier les acides aminés qui pourraient être responsables de l'interaction intra-moléculaire. Les mutants présentant des mutations ponctuelles qui pourraient ouvrir la conformation de Rnt1p en affaiblissant ou détruisant cette interaction sont sélectionnés pour leur capacité à interagir avec BD/Rnt1p dans le système double-hybrides. Les résidus modifiés sont identifiés par séquençage et le domaine contenant les mutations (par exemple le domaine N-terminal) est isolé et fusionné seul à AD de Gal4p afin de tester sa capacité à interagir avec BD/NT2 et BD/DS1. Si l'interaction avec le dsRBD est effectivement affaiblie, l'expérience aura confirmé l'hypothèse du camouflage du domaine d'activation de Gal4p et la présence d'une interaction intra-moléculaire. Si par contre, les mutants de AD/Rnt1p sélectionnés ont tous conservé l'interaction NT2:DS1 cela ne signifie pas qu'il n'existe pas d'interaction intra-moléculaire, mais peut-être tout simplement que la modification de ces résidus a altéré la structure

tridimensionnelle de la protéine de fusion AD/Rnt1p de sorte que les charges négatives du AD de Gal4p sont exposées ou tout simplement que l'hypothèse est nulle.

La dimérisation de la protéine Rnt1p complète n'ayant pu être confirmée avec les analyses double-hybrides, un autre système fut utilisé. Grâce à la fusion de Rnt1p au domaine N-terminal du répresseur *cI* de λ , une diminution d'un facteur de 10 de l'activité lytique du phage lambda a été observée (figure 7). Ceci signifie qu'il y aurait homodimérisation du répresseur tronqué grâce à des signaux de dimérisation présents à l'intérieur de Rnt1p reconstituant ainsi un répresseur d'activité lytique fonctionnel. La répression incomplète de la lyse avec *cI*-N-term/Rnt1p peut être un indice de la force de l'interaction entre les deux monomères de Rnt1p. Il est possible que les signaux de dimérisation qui existent entre Rnt1p sont moins forts qu'entre les deux domaines C-terminaux du répresseur intact. Pour Gcn4p, il a été observé que la fusion de *cI*-N-term avec son domaine leucine zipper résultait quand à elle, en la répression complète de l'activité lytique (Zeng *et al.*, 1997). Cependant le leucine zipper est un des domaines de dimérisation les plus forts. Il est toutefois possible que le prolongement de Rnt1p en N-terminal avec une partie du répresseur affecte la force d'interaction entre les deux domaines N-terminaux de Rnt1p. Par ailleurs, si seul le domaine N-terminal de Rnt1p avait été utilisé, comme dans le cas du leucine zipper de Gcn4p, peut-être qu'une meilleure répression aurait été observée étant donnée la forte interaction NT2:NT2 détectée dans les analyses double-hybrides.

La conformation de Rnt1p a aussi été étudiée par des méthodes biochimiques en utilisant des protéines recombinantes pures représentant des domaines de Rnt1p et la protéine

complète. Les expériences de chromatographie d'exclusion et de pontage (cross-linking) au glutaraldéhyde ont confirmé que Rnt1p forme un dimère en solution grâce à des interactions entre les domaines N-terminaux et entre les dsRBD (Lamontagne *et al.*, 2000, en annexe I). En chromatographie, Rnt1p a été éluée en 3 pics correspondant aux formes dimères, tétramères et oligomères, Δ NT2 en 2 pics correspondant à des monomères et des dimères, alors que dsRBD n'a élué qu'en une seule forme, le dimère. Le domaine N-terminal (NT2) est sorti également en un seul pic mais de formes oligomériques. Ces résultats seuls pourraient indiquer que Rnt1p formerait des oligomères, mais les résultats des pontages montrent que les 4 protéines sont très majoritairement converties en dimères lorsque l'on augmente la concentration de glutaraldéhyde de 0 à 0.1%. La propension du domaine N-terminal à s'oligomériser en solution et sa grande force d'interaction dans le système double-hybrides indiquent probablement la présence d'un très fort signal de dimérisation. L'interaction entre deux dsRBD de nature peut-être plus faible mais plus spécifique, pourrait être responsable du maintien de la conformation de Rnt1p en dimère seulement. L'ARNdb pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans le maintien de la forme dimérique de Rnt1p ou même être responsable de la dimérisation des dsRBDs. Une expérience supplémentaire de pontage au glutaraldéhyde a été réalisée en ajoutant dans le même tube les protéines purifiées pour le NT2 et le dsRBD. Sur SDS-PAGE, trois bandes apparaissent selon la taille des complexes; la plus petite représentant les dimères de dsRBD et la plus grande les dimères de NT2. La troisième bande migrant entre les bandes des deux homodimères serait un complexe fait de monomères de chacun (B. Lamontagne et S. Abou Elela, comm. pers.). Cela vient donc confirmer la présence du signal de dimérisation entre le domaine N-terminal et le domaine de liaison à l'ARN, qu'il soit inter- ou intra-moléculaire.

Est-ce que la dimérisation du dsRBD est médiée par la liaison des deux dsRBDs avec l'ARNdb ou a-t-on une interaction directe entre les deux domaines? Dans la classe des protéines liant l'ARNdb dont fait partie Rnt1p, d'autres protéines forment un dimère grâce à leurs domaines de liaison à l'ARN. La petite protéine E3 du virus *vaccinia*, ayant un motif de liaison à l'ARNdb en C-terminal, formerait un dimère en solution d'après des expériences de sédimentation et pontage chimique (Ho et Shuman, 1996). De plus, E3 forme des oligomères lorsque la force ionique est abaissée de 1 à 0.1 M NaCl. Il a aussi été démontré qu'une protéine tronquée E3(100-190) ne contenant que le dsRBD forme également un dimère en solution, sauf que celle-ci ne forme pas de multimères à faible force ionique (Ho et Shuman, 1996). Un fait qui rappelle drôlement Rnt1p dont la protéine complète et le domaine N-terminal ont tendance à s'oligomériser *in vitro* alors que le dsRBD ne forme que des dimères. Le domaine de liaison à l'ARNdb de E3 serait responsable de la dimérisation de la protéine qui lie l'ARNdb de façon coopérative, l'interaction protéine-protéine entre les dsRBDs contribuant à l'affinité de liaison de E3 pour l'ARNdb (Ho et Shuman, 1996). La protéine PKR humaine forme également un dimère grâce en partie à ses deux motifs dsRBDs. Une molécule tronquée de la protéine kinase couvrant les deux dsRBDs N-terminaux est coimmunoprécipitée avec la PKR complète (Wu et Kaufman, 1996) alors que dans différents tests, il a été prouvé que les segments N-terminaux de PKR interagissent avec eux-mêmes (Cosentino *et al.*, 1995, Patel *et al.*, 1995, Tan *et al.*, 1998). Mais PKR a aussi fait l'objet de nombreux autres articles qui ont tergiversé sur la nécessité de l'ARNdb pour la dimérisation des dsRBDs. Plusieurs mutants ont été générés qui avaient perdu leur capacité à lier l'ARN sans perdre leur habileté à dimériser (Patel *et al.*, 1995, Patel *et al.*, 1996) et vice versa (Patel et Sen, 1998) suggérant que la dimérisation pouvait être dissociée de la liaison à l'ARNdb.

Toutefois, un autre groupe a démontré que la dimérisation des dsRBD de PKR *in vitro* ne se fait qu'en présence d'ARNdb dans une expérience d'immunobuvardage «far-western» (Cosentino *et al.*, 1995). Alors que les expériences de pontage au DMS de PKR en absence et en présence d'ARNdb ont démontrées que PKR existe en équilibre entre les formes monomères et dimères en solution et que l'ajout d'ARNdb change l'équilibre pour favoriser la conformation dimérique (Carpick *et al.*, 1997). Dernièrement, la découverte d'une interaction intra-moléculaire entre le deuxième dsRBD et le domaine kinase paraît expliquer pourquoi la liaison à l'ARNdb serait requise dans le cas de PKR (Sharp *et al.*, 1998, Nanduri *et al.*, 2000). Il semble que cette interaction intra-moléculaire préviendrait la dimérisation de PKR et son activation en absence d'ARN inducteur. Mais lorsque les dsRBDs des monomères viennent en contact avec un ARNdb, cela induit un changement conformationnel (Manche *et al.*, 1992, Carpick *et al.*, 1997, Wu et Kaufman, 1997) et PKR peut former un dimère et s'autophosphoryler. Finalement un autre groupe ayant créés de nombreux mutants dans PKR ont trouvé que la dimérisation de PKR était abolie par une combinaison minimale de mutations requises pour détruire la liaison avec l'ARNdb (Zhang *et al.*, 2001). Ces derniers préfèrent conclure prudemment en disant que la liaison de deux molécules de PKR à la même molécule d'ARNdb contribue substantiellement à la stabilité du dimère de PKR et promouvoie ainsi son activation par autophosphorylation. Les interactions protéine-protéine directes sont probablement importantes également puisque *in vitro* la dimérisation des dsRBDs de PKR isolés a aussi été observée dans des conditions excluant toute contamination par de l'ARNdb (Zhang *et al.*, 2001).

Dans le cas de Rnt1p, le système double-hybrides étant réalisé *in vivo* dans *S. cerevisiae*, il est possible que l'interaction détectée entre deux protéines ne soit pas directe mais par l'intermédiaire d'une autre protéine ou d'une molécule d'acide nucléique présente dans la cellule. Il se peut donc qu'*in vivo* un ARNdb substrat puisse faire un pont entre les deux protéines de fusion contenant le dsRBD et aider à l'activation des gènes rapporteurs. Cependant, lors des expériences de pontage au glutaraldéhyde, la pré-incubation des protéines avec la RNase A ou avec de l'ARN n'affecta pas le patron de dimérisation de Rnt1p (Lamontagne *et al.*, 2000, résultats non-montrés). La dimérisation de Rnt1p en solution ressemble donc à E3, en ce qu'elle est indépendante de la liaison à l'ARNdb, même en absence du second signal de dimérisation dans le domaine N-terminal. Cependant, la présence d'une interaction intra-moléculaire, tout comme PKR, pourrait empêcher un monomère d'être actif et de cliver l'ARNdb s'il n'y a pas deux molécules de Rnt1p sur le même ARN substrat. Ainsi l'interaction N-terminal:dsRBD est peut-être absente dans un dimère. Ou alors, ce pourrait être la rencontre de Rnt1p avec son substrat qui détruit ou déstabilise l'interaction N-terminal:dsRBD par compétition pour la liaison avec le dsRBD seulement si Rnt1p est en dimère.

Comment deux domaines dsRBDs d'un dimère de Rnt1p peuvent se lier à l'ARN pour positionner chacun des domaines nucléase vis-à-vis les deux sites de clivage? Les différentes études structurales de RMN et de cristallographies effectuées pour le motif de liaison à l'ARNdb et le domaine nucléase de la RNase III chez d'autres espèces permettent de déduire la conformation de Rnt1p sur son substrat. Les deux premières structures à avoir été résolues par RMN sont le dsRBD de la RNase III de *E. coli* (Kharrat *et al.*, 1995) et le dsRBD3 de Staufen chez *Drosophila* (Bycroft *et al.*, 1995). Les deux

structures ont démontrées que le motif de liaison à l'ARNdb est composé d'une hélice α suivie de trois feuillets β et d'une autre hélice α , soit une topologie α - β - β - β - α , les deux hélices étant adossées aux trois feuillets β anti-parallèles superposés. Par mutagenèse *in vitro*, Bycroft *et al.*, (1995) et Ramos *et al.*, (2000) ont identifié plusieurs résidus importants pour la liaison à l'ARNdb dans le dsRBD3 de Staufen, F32, H28 et K30, positionnés dans la boucle 2 et K50, K51 et K54 situés dans la boucle 4 ainsi que la partie N-terminale de l'hélice α adjacente. En trois dimensions, ces résidus se retrouvent tous du même côté du domaine et pourraient donc constituer la surface qui interagit avec l'ARNdb. Dans les séquences alignées de motifs dsRBD (voir figure 8), ces résidus sont conservés dans les dsRBDs de plusieurs protéines de différentes espèces. Mais, pour Rnt1p, seulement un résidu est identique à l'un de ces 6 résidus, soit la lysine 421 de la boucle 4. Cependant, c'est avec la cristallisation du deuxième dsRBD de Xlrbpa de *X. laevis* avec un ARNdb de 10 pb que les résidus contactant directement l'ARNdb, soit par des ponts hydrogènes, des interactions de van der Waals ou électrostatiques, ont été connus. Le cristal de 1.9 Å réalisé par Ryter *et al.*, (1998) contient en fait 3 ARNdb bout-à-bout formant une pseudo-hélice continue encadrée par deux dsRBD2 de Xlrbpa. Les dsRBDs sont inversés tête-à-queue et sont à un angle de 90° l'un par rapport à l'autre le long de l'axe de l'ARNdb (voir Ryter *et al.*, 1998). Ici, l'interaction avec l'ARNdb se fait grâce à trois régions du dsRBD: Q118 et E119, de la première hélice α , contactent le sillon mineur de l'ARN. La boucle 2 interagit avec le sillon mineur adjacent par l'intermédiaire des résidus P140, H141 et R143. Alors que des résidus contenus dans la boucle 4 et la partie N-terminale de la deuxième hélice α , K163, Q164 et K167 superposés à Y131 et F145 des feuillets β forment des contacts avec le sillon majeur de l'ARNdb (Ryter *et al.*,



Figure 8: Homologie de séquence entre les motifs de liaison à l'ARNdb de différentes protéines de diverses espèces. Des ribonucléases III ne possédant qu'un seul dsRBD telles que RNase III de *E. coli* (RNase III), Pac1p de *S. pombe* (Pac1p) Rnt1p de *S. cerevisiae* (Rnt1p), RNase 3L de *H. sapiens* (RNase 3L) et une possible RNase III de *C. elegans* (RNase 3C) ont été alignées avec une ribonucléase III possédant deux dsRBD, CAF de *A. thaliana* (CAF-1 et CAF-2), et d'autres types de protéines liant l'ARNdb à l'aide de plusieurs dsRBDs, Staufen de *D. melanogaster* (Staufen-3), Xlrbpa de *X. laevis* (Xlrbpa-2) et PKR de *H. sapiens* (PKR-1 et PKR-2). Lorsque dans l'alignement, 50% et plus des résidus sont identiques ou conservés, ceux-ci sont colorés en rouge. La séquence consensus a été dérivée de l'alignement des 11 dsRBDs; les acides aminés en lettres minuscules signifient une identité de 50 à 85% entre les séquences alors que ceux en lettres majuscules signifient qu'il y a 85% et plus d'identité (#= D ou E, \$= N, Q, S ou T, %= F ou Y, += K, R ou H). Les études RMN pour les 5 premiers dsRBDs montrés ont permis d'identifier la structure tertiaire du domaine qui est la même pour toutes les protéines (α = hélice α , β = feuillet β). Les résidus marqués en jaune sont ceux qui ont été reconnus comme étant directement impliqués dans la liaison avec l'ARNdb soit dans un cristal dsRBD-ARNdb ou par mutation ponctuelle. Les résidus soulignés sont des acides aminés importants pour le maintien de la structure du domaine. Les résidus ombrés de Rnt1p et Pac1p sont ceux (mentionnés dans la discussion) identiques ou similaires à des résidus directement impliqués dans la liaison de l'ARNdb chez d'autres protéines. Remarquez le peu de résidus ombrés dans les boucles 2 et 4 de Rnt1p et Pac1p. Le programme utilisé pour faire les alignements de la figure 8 et 9 est Multalin version 5.4.1 (Corpet, 1988) à l'I.N.R.A., France.

1998) (marqués en jaune dans la séquence de Xlrpba, figure 8). Encore une fois, malgré la grande conservation de ces résidus dans la plupart des dsRBDs, ces résidus ne sont pas nécessairement conservés chez Rnt1p, seulement Y387/Y131 l'est. Pourtant, les résidus chargés positivement, par exemple, telles que les lysines et les arginines sont très présents dans la quatrième boucle et deuxième hélice de nombreux dsRBDs, et l'on croit que ces acides aminés basiques sont responsables d'interactions électrostatiques avec le squelette phosphodiester de l'ARNdb. Tous ces résidus sont présents ou du moins conservés chez la RNase III de *E. coli*, mais si l'on regarde les RNases III humaines, de *A. thaliana* ou de *C. elegans*, on constate la diminution ou la perte des résidus lysines dans la boucle 4, ils ne sont donc pas irremplaçables.

Plusieurs résidus importants pour la liaison à des dsRBMs de PKR humaine à l'ARNdb avaient aussi été identifiés dans des expériences de mutagenèses (voir ci-haut) et l'analyse RMN hétéronucléaire de toute la partie N-terminale de PKR contenant les deux dsRBMs (Nanduri *et al.*, 1998) a permis de distinguer les résidus impliqués dans le maintien de la conformation du centre du dsRBD de ceux directement impliqués dans la liaison avec l'ARN. La mutagenèse des résidus du centre hydrophobe suivants; F10, F43, V45, I47 et V72 (résidus soulignés de PKR-1, figure 8) et Y101, Y133, C135, M137 et A161 (résidus soulignés de PKR-2, figure 8) avaient probablement pour effet d'altérer la conformation du domaine inhibant ainsi la liaison à l'ARN. Parcontre les mutations des résidus R39, F41, S59, K60, K61 et K64 (marqués de jaune dans PKR-1, figure 8), éliminaient un lien direct entre l'ARNdb et le dsRBD sans en altérer la structure. Ces résidus correspondent aux mêmes positions que chez Staufen et sont conservés, donc encore seulement K61 est identique chez la RNase III de *S. cerevisiae*. La spectroscopie RMN de PKR a aussi

révélée que le lien entre les deux dsRBMs est très flexible permettant vraisemblablement d'envelopper une molécule d'ARNdb avec les deux motifs. De plus, dans leur modèle, Nanduri *et al.*, (1998) proposent que tout le dsRBD de PKR couvre une surface de d'ARNdb de 16 pb avec les deux dsRBMs se juxtaposant un peu pour interagir avec 9-10 pb chacun. Ceux-ci seraient bien sûr anti-parallèles comme chez Xlrbpa.

Une seconde étude a été réalisée avec le troisième dsRBD de Staufen (Ramos *et al.*, 2000). Une spectroscopie à RMN à haute résolution a été accomplie avec le dsRBD3 complexé à un petit ARNdb de 12 pb terminé par une tétraboucle C(UUCG)G, le type d'ARN reconnu par Rnt1p, mais avec une tétraboucle différente. Les résultats du RMN confirment que la face du dsRBD formées des N-termini des hélices α et des boucles 2 et 4 constitue la surface d'interaction avec l'ARNdb. La liaison du dsRBD avec l'ARN n'apporte que très peu de réarrangements de chacun. Seules les deux boucles présentent une certaine flexibilité, celles-ci étant très mobiles en absence d'ARNdb, alors que la partie C-terminale du domaine est quand à elle complètement désordonnée. Chez Rnt1p, le dsRBD se termine par une addition de 33 résidus à la fin du domaine comparativement à la RNase III de *E. coli*. Il est fort possible que comme chez Staufen, cette «queue» C-terminale soit peu structurée et désordonnée, celle-ci pourrait ne pas être qu'un simple prolongement du domaine. Pour Staufen, la liaison à l'ARNdb est optimale avec des ARNs d'une longueur de 12 pb et plus, telle qu'observée dans des expériences de «North-western blots» (Ramos *et al.*, 2000). D'ailleurs, dans le RMN, la distance entre l'interaction ARN-boucle 2 et la tétraboucle UUCG, le site de contact de l'hélice α_1 , est d'exactly 12 pb. Le substrat optimal pour la reconnaissance et la liaison par Rnt1p est

un ARNdb de 9 pb terminé par une tétraboucle AGNN et le site de clivage est toujours à 13-16 pb de la tétraboucle (Lebars *et al.*, 2001, Chanfreau *et al.*, 2000, Nagel et Ares, 2000). Est-ce que Rnt1p pourrait contacter sa tétraboucle d'une façon similaire à Staufen? Le dsRBD3 de Staufen interagit avec la tétraboucle avec la partie N-terminale de la première hélice α , plus spécifiquement, grâce à ses résidus S3, E7, I10 et K11. Ces résidus sont identiques ou conservés chez Rnt1p, correspondant à T363 (non-montré), D367, A370 et K371, si on se permet un prolongement de l'hélice α 1 en N-terminal (voir alignement de la figure 8). Remarquablement, on obtient le même résultat pour Pac1p avec Q284 (non-montré), D288, A291 et K292. À cause que ces résidus sont situés un peu plus loin sur l'hélice, dans une structure tridimensionnelle, cela explique pourquoi Rnt1p ne requiert qu'un ARNdb de 9 pb comparativement à 12 pb pour Staufen. Les résidus contactant la tétraboucle sont encore moins distancés des boucles 4 et 2 chez Rnt1p que Staufen, c'est là que sont retrouvées les 3 paires de bases supplémentaires nécessaires à Staufen. Malgré que deux études ont déjà été faites avec d'autres dsRBD liés à un ARNdb, il pourrait être nécessaire de le faire aussi pour le dsRBD de Rnt1p si l'on voulait déterminer les résidus des boucles et hélices directement impliqués dans la liaison à l'ARN parce que peu de ceux identifiés dans Xlrbpa et Staufen sont conservés chez Rnt1p. On observe aussi une plus faible conservation de l'identité de ces acides aminés dans les séquences de RNases III chez des espèces comme *A. thaliana*, *C. elegans* et *H. sapiens*, mais c'est vraiment chez *S. cerevisiae* que les différences sont le plus notable. Si la structure du coeur du domaine est la même, les boucles sont quand à elles très flexibles et donc d'autres résidus pourraient être responsables de d'autres types d'interactions avec les sillons majeur et mineurs de l'ARNdb.

Une analyse cristallographique du domaine d'activité nucléase de la ribonucléase III de la bactérie *Aquifex aeolicus* (Blaszczyk *et al.*, 2001) a révélé des informations fort intéressantes pour détermination de la conformation de Rnt1p. Le domaine nucléase de *A. aeolicus* est très similaire à la RNase III de *E. coli* et l'homologie de séquence du domaine est présentée avec des ribonucleases III de d'autres espèces à la figure 9. La plus grande homologie se trouve à l'intérieur d'un motif de 10 acides aminés consécutifs que l'on appelle la séquence signature des RNases III. On a pensé que ce motif pouvait être le site actif de l'enzyme ou du moins le site de liaison du Mg^{2+} car une mutation changeant la glycine 97 de *E. coli* en glutamate semble altérer la liaison de l'ion métallique divalent (Davidov *et al.*, 1993). La structure en solution du domaine nucléase de *A. aeolicus* en présence et en absence d'ions Mg^{2+} et Mn^{2+} permet de suggérer un mécanisme d'action pour le clivage d'ARNdb. Premièrement, le domaine nucléase adopte une topologie toute en hélices: un total de 7 hélices α composent le domaine (voir figure 9). Deuxièmement, le domaine forme un dimère grâce à une interface hydrophobe contenant 128 interactions hydrophobiques et 20 ponts hydrogènes ou salins. Presque toutes les hélices α_3 et α_4 , ainsi que le C-terminus de l'hélice α_6 et le N-terminus de l'hélice α_7 (voir résidus soulignés dans la séquence de *A. aeolicus*, figure 9) font parties de l'interface de dimérisation. De plus, un nouveau type de structure de dimérisation est présente à chaque bout du dimère, une jonction «balle-et-cavité». La balle est la chaîne latérale du résidu aromatique F41, un résidu conservé du motif signature, alors que la cavité est formée de 5 résidus des hélices 3 et 4 qui se retrouvent tous près l'un de l'autre lorsque la protéine est repliée, V52, V56, L67, S68 et K71 (marqués de vert dans la figure 9). Dans un domaine nucléase, la balle se trouve à une extrémité de la surface d'interaction, et la cavité, à



Figure 9: Homologie de séquence entre les domaines d'activité nucléase de plusieurs ribonucléases III de différentes espèces. Les domaines RNase III des ribonucléases III de *C. elegans* (RNase 3C-1 et -2), *H. sapiens* (RNase 3L-1 et -2), *A. thaliana* (CAF-1 et -2), *S. pombe* (Pac1p), *S. cerevisiae* (Rnt1p), *E. coli* (*E. coli*) et *A. aeolicus* (*A. aeolicus*) ont été alignés. Lorsque dans l'alignement, 50% et plus des résidus sont identiques ou conservés, ceux-ci sont colorés en rouge. La séquence consensus a été dérivée de l'alignement des domaines; les acides aminés en lettres minuscules signifient une identité de 50 à 85% entre les séquences alors que ceux en lettres majuscules signifient qu'il y a 85% et plus d'identité (#= D ou E, \$= N, Q, S ou T, %= F ou Y, += K, R ou H). Un cristal du domaine RNase III de *A. aeolicus* a permis d'identifier sa structure tertiaire et celle-ci est montrée en-dessous des alignements (α = hélice α , β = feuillet β). Les résidus en jaune font partie du site actif impliqué dans le clivage de l'ARNdb par la RNase III de *A. aeolicus* et en vert ceux formant la jonction «balle-et-cavité» directement impliqués dans la dimérisation de deux domaines nucléases avec ceux qui sont soulignés. Les résidus en bleu sont des mutations ponctuelles réalisés dans la RNase III de *E. coli* qui détruisent l'activité de l'enzyme.

l'autre extrémité. Deux monomères interagissent de façon antiparallèle permettant l'insertion de la balle d'un des monomère dans la cavité de l'autre monomère. Les deux hélices α_3 se retrouvent alignées de façon antiparallèle le long de l'interface entière du domaine et forment une vallée le long de l'hélice de l'ARNdb. Dans les tests d'interaction du système double-hybrides avec les différents fragments de Rnt1p, ce signal de dimérisation n'a jamais été découvert. Aucun fragment utilisé dans le système double-hybrides ne couvrait que le domaine nucléase, et comme des signaux de dimérisation sont aussi présents dans les domaines adjacents que sont le domaine N-terminal et le dsRBD, on n'a pas pu détecter individuellement cette interaction.

Finalement, pour résumer ce que l'on connaît sur la conformation de la ribonucléase III de *S. cerevisiae*: Les systèmes répresseur de λ et double-hybrides, les expériences de chromatographie d'exclusion et de pontage de protéines au glutaraldéhyde, ont démontrées que Rnt1p forme un dimère sur l'ARNdb et en solution sans ARNdb. Les résultats du système double-hybrides et des expériences biochimiques révèlent trois signaux de dimérisation; (a) une interaction très forte N-terminal:N-terminal avec une tendance à l'oligomérisation, (b) une interaction possible entre les dsRBDs C-terminaux, et (c) une interaction entre le domaine N-terminal et le dsRBD. De plus, l'analyse cristallographique de Blaszczyk *et al.*, (2001) ont révélé un quatrième signal de dimérisation entre les domaines nucléases de la RNase III de *A. aeolicus*. Il reste encore à déterminer si l'interaction N-terminal:dsRBD est intra-moléculaire ou inter-moléculaire, mais d'après la conformation de Rnt1p dans l'espace déduite à partir des études RMNs et cristallographiques des dsRBD et du domaine nucléase, il semble plus probable que cette

interaction soit à l'intérieur d'une même protéine. Toutes ces expériences permettent de suggérer un modèle pour la conformation de Rnt1p sur l'ARNdb (figure 10). Un modèle qui a beaucoup changé au fil des découvertes, grâce à l'identification de la structure du dsRBD3 de Staufen sur l'ARN (Ramos *et al.*, 2000), la structure de la tétraboucle des substrats de Rnt1p (Lebars *et al.*, 2001 et Wu *et al.*, 2001) et bien sûr la structure du domaine nucléase de la RNase III de *A. aeolicus* (Blaszczyk *et al.*, 2001). Le modèle propose maintenant que Rnt1p, et probablement toutes les RNases III, a une conformation anti-parallèle par rapport à l'axe de l'ARNdb. Et, si auparavant on dessinait sous forme de deux «C» parallèles, on pourrait le décrire maintenant plutôt comme deux «E» anti-parallèles. Cette conformation est préférée premièrement, à cause de la façon dont les deux dsRBD reconnaissent l'ARNdb. Ceux-ci sont situés de part et d'autre de l'ARNdb et sont présentés inversés l'un par rapport à l'autre dans les modèles de PKR (Nanduri *et al.*, 1998) et de Xlrbpa (Ryter *et al.*, 2001). Rappelons que chaque dsRBD peuvent lier 9-11 pb d'ARNdb et qu'à deux domaines, environ 16 pb de long sont couvertes, il y a donc juxtaposition partielle des dsRBDs sur l'axe d'ARNdb. De plus, chaque domaine de liaison à l'ARNdb doit pouvoir contacter un sillon majeur élargi de la molécule d'ARNdb, les dsRBDs doivent donc être décalés l'un de l'autre pour contacter différents sillons. Deuxièmement, d'après le cristal du domaine nucléase (Blaszczyk *et al.*, 2001), le domaine dimérise de façon anti-parallèle grâce à deux jonctions «balle-et-cavité». On a donc la preuve pour deux domaines isolés que la conformation est inversée par rapport à l'axe de l'ARN. Pour reconstituer toute la structure de Rnt1p, il ne manquerait plus que la cristallisation du domaine N-terminal. Le modèle présenté à la figure 10 fait suite au modèle proposé pour toute la RNase III de *A. aeolicus*. Dans ce modèle, les domaines nucléases se retrouvent entre deux dsRBDs et par en-dessous de la molécule d'ARNdb

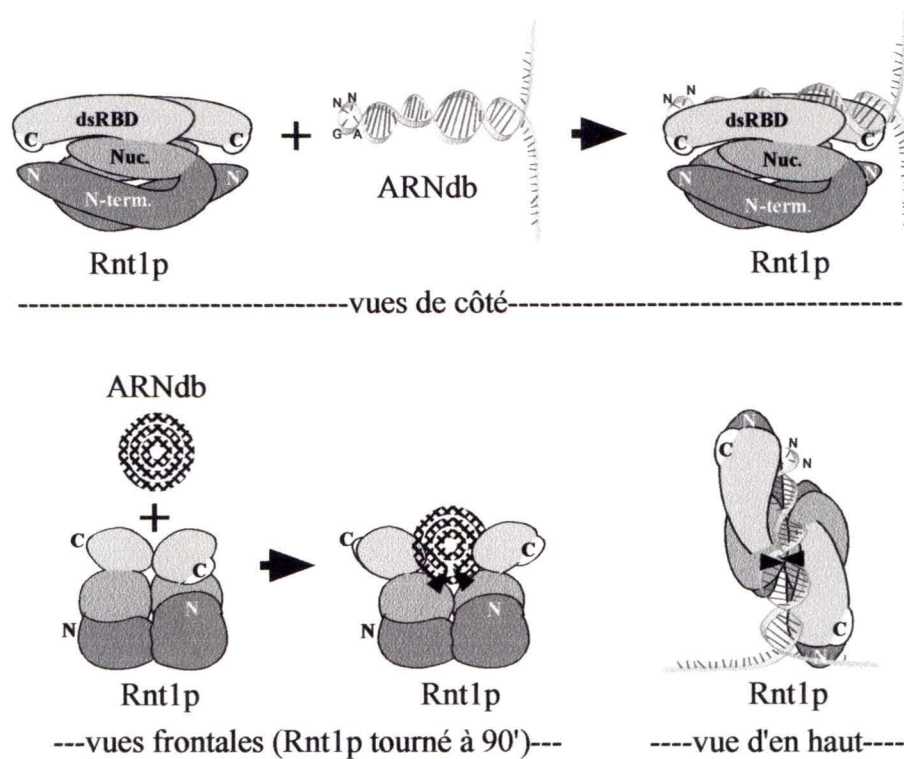


Figure 10: Modèle montrant sous divers angles la conformation possible adoptée par l'homodimère Rnt1p telle que suggérée par les analyses doubles-hybrides et les structures cristallographiques ou RMN du dsRBD (PKR humaine, Xlrpba de *X. laevis* et Staufen de *Drosophila*) et domaine nucléase (RNase III de *A. aeolicus*). Rnt1p forme un dimère grâce à des interactions entre les domaines N-terminaux et entre les domaines nucléases de chaque monomère ainsi que possiblement entre les dsRBD. Lorsque Rnt1p rencontre un ARNdb substrat, la conformation de la protéine s'ouvre au niveau des dsRBDs qui se positionnent de chaque côté de l'hélice et exposent le site de clivage aux domaines nucléases. En présence de magnésium l'ARNdb est clivé et relâché puis le dimère retrouve sa conformation dimérique fermée qui pourrait être stabilisée également par une interaction intra moléculaire entre le domaine N-terminal et le domaine C33 à l'extrémité du dsRBD.

liée de chaque côté par les dsRBDs. Les quatre domaines ensemble forment un genre de «V» ou de vallée pour accueillir l'ARN. Étant donné que l'on sait qu'il y a aussi un signal de dimérisation entre deux domaines N-terminaux et comme les domaines N-terminaux doivent être attachés à chacun des domaines nucléases, la seule place pour ceux-ci serait en-dessous des domaines nucléases le plus loin de l'ARN. Les domaines N-terminaux pourraient y jouer leur rôle de stabilisation du complexe sur l'ARNdb en venant solidifier la conformation dimérique de Rnt1p. L'outil de prédiction des structures secondaires de protéines «nn-predict» (King et Sternberg, 1996) prédie une topologie α - β - α - β - α - β pour le domaine N-terminal avec une partie N-terminale d'environ 40 résidus peu structurée. La conformation anti-parallèle de Rnt1p telle que présentée dans la figure 10, n'empêche pas l'idée qu'une interaction intra-moléculaire entre le dsRBD et le domaine N-terminal existe. En effet, dans le schéma, il est possible de faire joindre les deux extrémités de chaque domaine, plus particulièrement cette partie non-structurée du domaine N-terminal et la partie non-structurée également à la fin du dsRBD. Dans ce modèle, aucune interaction inter-moléculaire de ces deux structures ne semblent possibles. Quand à l'interaction entre deux dsRBD, dans les études RMN et cristallographique de dsRBD avec ARNdb, les dsRBD sont toujours montrés éloignés l'un de l'autre par l'ARNdb, difficile de croire alors à une interaction dsRBD:dsRBD. Mais comme l'interaction détectée dans le système double-hybrides semble plus faible, il se peut que cette interaction ne soit visible qu'en absence d'ARNdb. C'est-à-dire que, tel que montré dans les vues frontales de Rnt1p de la figure 10, le dimère de Rnt1p en solution contient également une interaction entre les dsRBDs, et cette interaction C-terminale serait brisée par la liaison d'un ARNdb.

Chapitre 2

Identification des partenaires cellulaires de Rnt1p.

Matériel et méthodes:

Génotypes des souches de levures et bactéries

Escherichia coli DH5 α : F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *endA1 recA1 hsdR17* ($r_K^- m_K^+$) *deoR thi-1 phoA supE44 λ gyrA96 relA1*

Escherichia coli HB101: F ϕ *leuB6, proA2, recA13, thi-1, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rpsL20, supE44, hsdS20*

Saccharomyces cerevisiae Δ RNT1: *MATa α ; ura3-1/ura3-1; trp1 Δ /trp1 Δ ; ade2-1/ade2-1; leu2-3,112/leu2-3,112; his3-11,15/his3-11,15 rnt1 Δ ::TRP1* (Chanfreau *et al.*, 1998)

Saccharomyces cerevisiae W303: *MATa α ; ura3-1/ura3-1; trp1 Δ /trp1 Δ ; ade2-1/ade2-1; leu2-3,112/leu2-3,112; his3-11,15/his3-11,15*

Saccharomyces cerevisiae PJ69-4a: *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 (LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ)* (James *et al.*, 1996)

Saccharomyces cerevisiae DTY1: *MATa gall trp1-1 his3 ade8 CUP1^R* (Rymond *et al.*, 1983)

Saccharomyces cerevisiae SLY12: *MATa gall trp1-1 his3 ade8 CUP1^R ura3::Kan^r leu2::HISG mac1::LEU2* (obtenue de Dennis J. Thiele, non-publiée)

Banque de gènes de levure utilisée

Y2HL-C1, Y2HL-C2, Y2HL-C3 construite par James *et al.*, (1996). Cette banque a été choisie pour le criblage parce qu'elle a été montée de façon à avoir une grande représentation du génôme de *S. cerevisiae* et un nombre de faux positifs diminué par rapport aux autres banques: L'ADN génomique de la levure YM706 utilisé pour

construire cette banque a été digéré partiellement par 5 enzymes différentes afin d'augmenter les chances d'avoir au moins une et souvent plusieurs extrémités 5' pour chaque gène; seulement les fragments de 500 à 3000 pb ont été utilisés comme inserts; et ceux-ci ont été incorporés dans les 3 vecteurs représentant les 3 cadres de lecture différents de l'ADN (James *et al.* 1996). La banque a été donnée sous forme de 30 μL d'ADN (100 ng/ μL) pour chaque banque et nécessitait une amplification avant utilisation pour le criblage.

Amplification de la banque de gènes de levure

100 ng de chacune des banques (1 μL) a été utilisé pour faire une transformation par électroporation des bactéries électro-compétentes *E. coli* HB101 de Bio-Rad (Cat. No 170-3113) en suivant le protocole présenté en annexe IV. À l'étape 9, avec 10 μL de mélange de transformation pour chacune des banques, une dilution 1 dans 10000 a été faite pour étaler 100 μL sur pétri de LB (1% bactotryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.6% agar, pH 6.0) avec 50 mg/L ampicillin. Les pétris ont été incubés 18 heures à 37°C et le nombre de colonies formées a été compté. Le reste du mélange de transformation de chaque banque a été inoculé dans 1 litre de TB (1.2% bactotryptone, 2.4% yeast extract, 0.4% glycérol, 17 mM KH_2PO_4 et 72 mM K_2HPO_4) chacun avec 50 mg/L ampicillin et ont incubés jusqu'à D.O. de 1.0-1.5 à 37°C avec agitation de 200 rpm (toute la nuit). Pour chaque banque, l'obtention de 20 millions de transformants était recommandée (James *et al.*, 1996), mais pour Y2HL-C1, 6.34×10^6 transformants ont été obtenus; pour Y2HL-C2, 2.29×10^7 transformants; et 5.10×10^6 pour Y2HL-C3. Ce qui veut dire que pour rester représentatif, on aura à cribler davantage de clones pour les

banque C1 et C3. L'ADN a été extrait à partir des cultures de 1L en suivant la méthode de méga-préparation d'ADN plasmidique présentée en annexe IV. À l'étape 13, l'ADN a été resuspendu dans 3 à 3.5 ml de ddH₂O pour obtenir une concentration d'environ 10 µg/µL telle que estimée après migration sur gel d'agarose pour chaque banque d'ADN Y2HL.

Criblage double-hybrides avec Rnt1p comme appât

La souche de levures utilisée pour le criblage sont les PJ69-4a qui ont été transformées avec le plasmide BD/RNT1 (voir section matériel et méthodes, chapitre 1). Le criblage a été réalisé en suivant la stratégie décrite par le schéma de la figure 11 dont les étapes sont détaillées ci-bas:

A) Transformation des levures exprimant BD/Rnt1p avec les banques Y2HL:

Les levures ont été transformées en utilisant la méthode de transformation à l'acétate de lithium induite au DMSO (Hill *et al.*, 1991) présentée en annexe IV. Un petit test de transformation a été fait avec la banque C3: Une culture de 135 mL de PJ69-4a + BD/Rnt1p à DO₆₀₀ de 0.835 a été utilisée. Les 3 lavages ont été effectués avec la solution de LiOAc plutôt qu'avec ddH₂O stérile. À l'étape 8, 100 µL de cellules ont été mélangées à 10 µg et 50 µg d'ADN Y2HL-C3 (10 µg/µL). À l'étape 12, les cellules de chacun des mélanges de transformation ont été resuspendues dans 450 µL de ddH₂O pour un volume total de 500 µL et la totalité (1×50 µL, 3×100 µL et 1×150 µL) a été étalée sur pétris de milieu minimal (SCD) sans lysine, sans leucine et sans uracil. 20000 CFUs ont été obtenues sur l'ensemble des pétris (approx. 330 CFU/µg) et l'utilisation de 1 µg d'ADN par transformation s'est avérée suffisante. Les PJ69-4a+BD/Rnt1p ont été

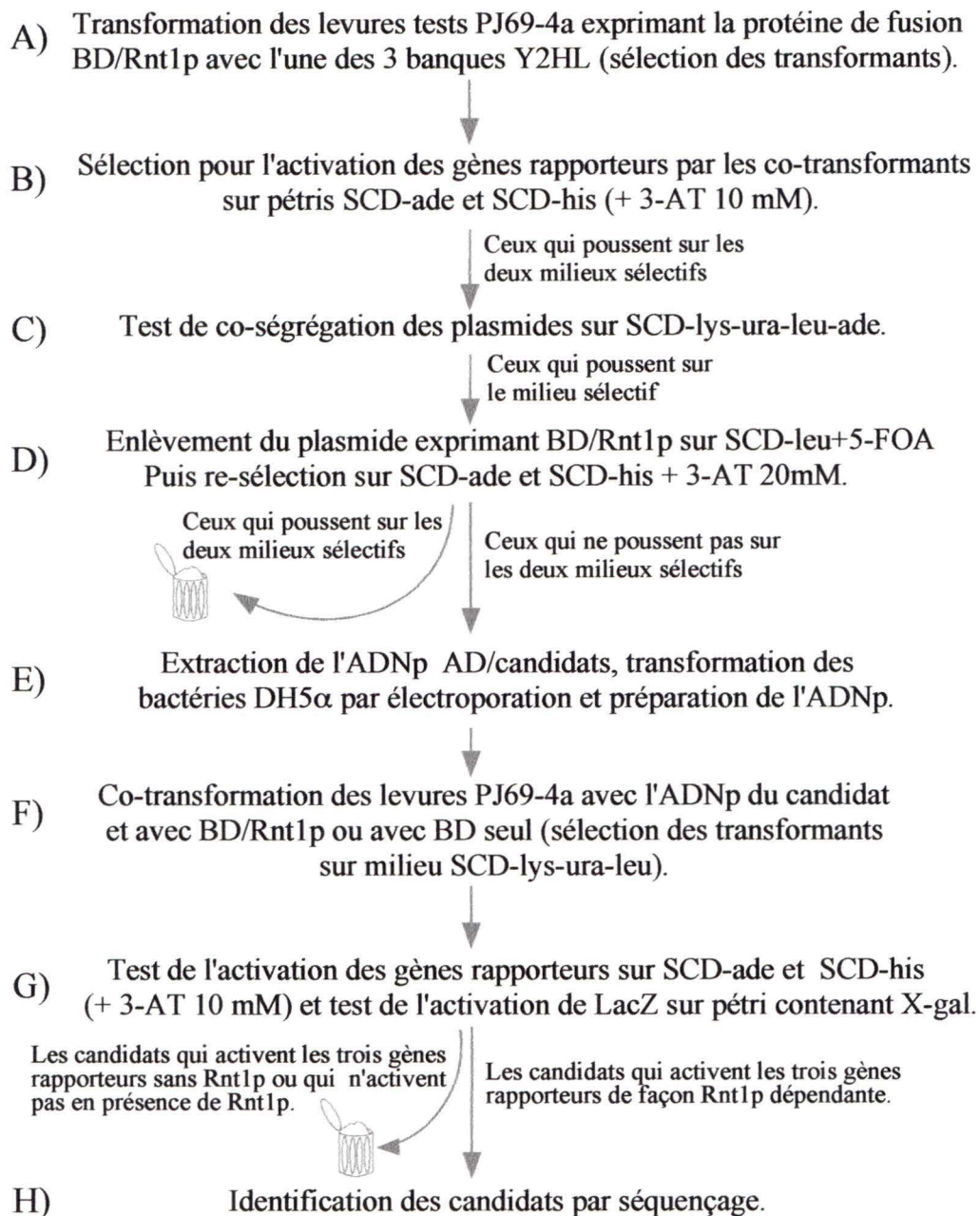


Figure 11: Schéma illustrant la stratégie de sélection des candidats pour l'interaction avec Rnt1p lors du criblage double-hybrides

transformées à deux reprises avec la banque C1, la première fois servant de test: 240 mL d'une culture à DO_{600} de 0.574 ont été utilisés. Après lavages, les cellules ont été resuspendues dans 800 μ L de solution LiOAc totalisant un volume de 1 mL (la DO_{600} de 1 μ L de suspension diluée dans 1 mL de ddH₂O était de 0.210). 100 μ L de cellules ont été transformées avec 10 μ g de Y2HL-C1. Et, à l'étape 12, les cellules sont resuspendues dans 1.5 mL de ddH₂O stérile et étalées au complet sur 16 pétris de SCD-lys-leu-ura (14 \times 100 μ L, 1 \times 10 μ L (pour comptage) et 1 \times 90 μ L). Un total de 35000 transformants fut obtenu, soit 3500 CFU/ μ g ADN. La deuxième fois, une culture de 240 mL à DO_{600} de 0.890 a été utilisée de la même façon que précédemment. Toute la suspension de cellules (1.1 mL à DO_{600} 1/1000 de 0.206) a été transformée, 11 \times 100 μ L avec 10 μ g d'ADN Y2HL-C1 chaque. À la dernière étape, chaque transformation a été lavée et resuspendue dans un volume totalisant 1.5 mL. Tous les mélanges de transformation ont été étalés au complet sur pétris SCD-lys-leu-ura (100 μ L/pétri), c'est-à-dire 166 pétris (incluant 10 μ L étalé sur un pétri pour comptage). La quantité de CFUs qui ont poussées sur cette série de pétris a été estimée à 1465000 transformants (13320 CFU/ μ g ADN), un total de 1.5 million pour la banque Y2HL-C1. Pour la banque C2, une seule grosse transformation a été faite en utilisant 240 mL d'une culture de PJ69-4a+ BD/Rnt1p à DO_{600} de 0.752. Les cellules ont été suspendues dans 1.3 mL total de solution LiOAc (DO_{600} 1/1000 de 0.159) et 10 \times 100 μ L de cellules ont été transformées avec 10 μ g de Y2HL-C2 chacun. À l'étape 12, les cellules furent resuspendues dans 1.5 mL total de ddH₂O stérile et étalées sur 15 pétris SCD-lys-leu-ura par transformation, soit 153 pétris en incluant l'étalement de 3 \times 10 μ L pour comptage. Approximativement 1.5 million de transformants (15000 CFU/ μ g ADN) furent obtenus pour Y2HL-C2.

B) Première sélection pour l'activation des gènes rapporteurs:

Chacune des colonies de PJ69-4a transformées avec BD/RNT1 et un ADN de la banque en fusion avec AD de Gal4p (AD/X) ont ensuite été testées pour l'activation de deux gènes rapporteurs qui sont exprimés qu'en la présence du facteur Gal4p reconstitué. La croissance de une colonie sur milieu sans adenine et sans histine indique qu'il y a interaction entre les deux protéines fusionnées avec le BD ou AD de Gal4p. Comme chaque pétri contient des milliers de transformants ce criblage a été facilité en utilisant la réplique sur velours de chaque pétri: Le tissu de velours est maintenu fermement sur un objet cylindrique plat de circonférence légèrement plus petite que la taille d'un pétri. Le pétri contenant les colonies est renversé et pressé délicatement sur le velours pour que les colonies y laissent leurs empreintes, le pétri est marqué d'un trait. Retirer ce pétri et le mettre de côté, placer maintenant un nouveau pétri SCD-ade et presser gentiment, faire une marque sur le pétri au même endroit que le précédent. Retirer le pétri et procéder de la même façon avec un pétri de SCD-his, puis avec un pétri de SCD-leu. Incuber les 3 nouveaux pétris possédant les empreintes des colonies du premier pétri à 30°C pour trois jours dans un contenant ou un sac fermé. Sur les pétris sans adénine et sans histidine, seulement les colonies où il y a une interaction entre Rnt1p et l'autre protéine vont pousser, alors que le dernier pétri qui ne constitue pas une sélection devrait posséder toutes les colonies du premier pétri, et permet de s'assurer que toutes les colonies se sont bien transférées sur chaque pétri.

C) Test de co-ségrégation des deux plasmides:

Les colonies qui ont poussées sur milieu sans adénine et sans histidine ont été repiquées à partir de l'un des deux pétris et striées sur milieu de sélection pour les 2 plasmides et pour l'interaction entre les deux protéines, c'est-à-dire SCD-lys-leu-ura-ade (pétri divisé en 8

pointes). Comme à l'étape de sélection précédente, la croissance des transformants avait été sur milieu contenant les acides aminés leucine et uracile, il se peut que certaines levures aient rejeté l'un des plasmides si la présence des deux n'est pas nécessaire pour maintenir la croissance sur milieu sans adénine ou sans histidine. Le rejet de l'un des vecteurs par la colonie de levures sera détecté par l'absence de croissance sur ce milieu sélectif à la fois pour tous les plasmides et l'activation de *ADE2*. Le candidat qui n'a pas poussé est éliminé parce que l'activation des gènes rapporteurs dans ce cas-ci ne peut être due à l'interaction des deux protéines.

D) Enlèvement du plasmide BD/RNT1 et deuxième sélection:

Les candidats qui n'ont pas été éliminés après l'étape C, ont été striés sur milieu minimal sans leucine contenant de l'acide 5-fluoroorotique (5-FOA), un analogue de la pyrimidine avec lequel les colonies qui conservent le plasmide exprimant le gène *URA3* ne peuvent pousser. Sur ces pétris, les levures sont «forcées» à rejeter le plasmide BD/RNT1 pour survivre. Donc, après 3 jours d'incubation à 30°C, quelques colonies auront poussées pour chaque candidats striés. Une colonie de chaque a été ensuite striée sur pétri SCD-leu (divisé en 8 pointes) et incubé à 30°C, 3 jours, (c'est le pétri que l'on garde pour les expériences suivantes). Puis, une colonie est re-striée sur SCD-ade et SCD-his (+10 mM 3-AT) et les pétris sont incubés à 30°C, 3 jours. Cette étape de sélection permet d'éliminer les transformants qui activent l'expression des deux gènes rapporteurs sans la présence de BD/Rnt1p et qui ne sont donc pas des candidats pour l'interaction avec Rnt1p. C'est après cette étape-ci, que tous les candidats sélectionnés sont entreposés dans le glycérol à -80°C, après croissance dans milieu liquide minimal sans leucine à partir d'une colonie du pétri SCD-leu.

E) Extraction du plasmide candidat et amplification:

Le plasmide de la banque de levures exprimant un protéine candidate pour l'interaction avec BD/Rnt1p a été extrait des levures PJ69-4a en suivant le protocole d'extraction d'ADN des levures en annexe IV. 1 µL d'ADN extrait (comprenant l'ADN génomique et plasmidique) a été utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* DH5α par électroporation en utilisant les méthodes de préparation de bactéries électro compétentes et d'électro-transformation présentées en annexe IV. L'ADN plasmidique a été préparé par la suite, à partir des bactéries en suivant la méthode usuelle de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989). Afin de connaître la taille de l'insert du génôme de *S. cerevisiae* en aval du domaine d'activation de *GAL4*, l'ADNp a été digéré avec les enzymes de restriction BamHI et Sall clivant respectivement en 5' et 3' de l'insert. Après migration sur gel d'agarose 0.8% avec un marqueur d'ADN, la taille du fragment BamHI-Sall a été estimée.

F) Co-transformation des PJ69-4a avec l'ADNp du candidat et BD ou BD/RNT1:

Les levures PJ69-4a furent transformées avec l'ADNp du candidat (AD/X) conjointement avec l'ADNp exprimant BD seul ou avec l'ADNp exprimant BD/Rnt1p en suivant la méthode de transformation des levures à l'acétate de lithium induite au DMSO (Hill *et al.*, 1991) présentée à l'annexe IV. 5 µL de chaque duo d'ADNp a été utilisé et les mélanges de transformation ont été étalés sur pétris SCD-lys-leu-ura pour sélectionner pour l'insertion des deux vecteurs (AD/X+BD et AD/X+BD/RNT1). Des colonies se développent sur chaque pétri après 3 jours d'incubation à 30°C.

G) Test de l'activation spécifique des gènes rapporteurs par le candidat en présence de BD/Rnt1p:

Une colonie pour chaque co-transformation est propagée par striage sur pétri SCD-lys-leu-ura et incubée 3 jours à 30°C. Chaque duo (AD/X+BD et AD/X+BD/RNT1) a été ensuite testé pour l'activation des gènes rapporteurs; *GAL1-HIS3*, *GAL2-ADE2* et *GAL7-lacZ*. Pour vérifier l'expression de His3p et Ade2p, les deux duo de transformants ont été striés sur un pétri SCD-his et un pétri SCD-ade respectivement et incubés à 30°C, 3 jours. Dans certains cas, deux méthodes ont été utilisées pour vérifier l'expression de β -gal. Le test de X-gal sur pétri (voir section matériel et méthodes, chapitre 1) et le test de β -gal en liquide avec ONPG détaillé en annexe IV. La croissance sur pétris SCD-his (+10 mM 3-AT) et SCD-ade et le développement de couleur bleue (X-gal) ou jaune (ONPG) pour les transformants contenant AD/X et BD/Rnt1p indique la présence d'interactions et cette interaction est avec la partie Rnt1p de la protéine de fusion si les résultats sont négatifs pour les transformants AD/X et BD.

H) Identification des candidats par séquençage:

Tous les candidats ayant passés à travers toutes les étapes de sélection sans être éliminés ont été séquencés manuellement. Les séquençages de 38 candidats ont été réalisés en utilisant le kit de séquençage d'ADN avec la séquenase de USB (Amersham Biosciences, Cat. No. US70770 pour version 2.0) avec 2.5-5 μ g d'ADNp. Les marquages ont été fait avec le dATP 5'-[α -³²P] ou dCTP 5'-[α -³²P](Amersham Biosciences, Cat. No. AA0004-250 μ Ci et AA0005-250 μ Ci). L'oligo utilisé, 5'AD-insert (5'-GATGATGAAGATACCCC-3'), s'hybride avec la fin du gène *GAL4* (AD) à 42-44 nucléotides en 5' de l'insert génomique. Les réactions de séquençage ont été migrées sur gel de polyacrylamide 8% ou 6% avec urée pendant 1-2 heures à 45W et le gel a été exposé à l'autoradiogramme toute la nuit à température de la pièce avant son développement. Idéalement, on doit

pouvoir lire la séquence à partir de la jonction de la fusion de AD de Gal4p avec l'ADN du candidat pour pouvoir vérifier que le gène est dans le cadre de lecture avec Gal4p. 83 candidats potentiels ayant passés l'étape E ont aussi été envoyés pour séquençage automatique à un collaborateur. Toutes les séquences d'ADN ont été soumises dans une recherche BLAST à travers l'ADN génomique complet de *S. cerevisiae* du site web de «*Saccharomyces* Genome Database» (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>).

Test d'interaction de candidats avec des fragments de Rnt1p

Suite à leur identification, certains candidats ont été testés dans le système double-hybrides pour l'interaction avec les différents fragments de Rnt1p en fusion avec le BD de Gal4p (voir schéma de la figure 6). Cette fois-ci ce sont les levures PJ69-4a contenant déjà le plasmide AD/X du candidat à tester qui ont été cultivées (en milieu SCD-leu) et transformées (méthode de lithium acétate, en annexe IV) avec chacun des 10 plasmides de BD/fragments de *RNT1* incluant le vecteur BD vide comme contrôle négatif. Les levures ont été étalées sur pétris SCD-lys-leu-ura sélectionnant pour la présence des deux vecteurs. Après incubation, les transformants de chaque combinaison de plasmides ont été testés pour l'activation des gènes rapporteurs par striage sur pétris SCD-ade et SCD-his (+10 mM 3-AT) et par test de X-gal sur pétri ou avec ONPG en liquide (voir en G ci-haut et en annexe IV pour les protocoles).

Courbes de croissance

La croissance des levures W303, Δ *RNT1*, *DTY1* et *SLY12* a été testée en cultures liquides contenant différentes sources de carbone. Les levures ont d'abord été inoculées dans 25

mL YPD (1% extrait de levures, 2% bacto peptone, 2% dextrose) et incubées à 26°C (température permissive des levures *ARNT1*) avec agitation jusqu'à DO_{600} de 0.800-1.000. Les cultures ont ensuite été centrifugées pour en retirer le YPD et les cellules ont été lavées deux fois dans ddH₂O stérile. Chaque souche resuspendue dans ddH₂O a servi à inoculer des cultures de 25 mL YPD, YPE (1% extrait de levures, 2% bacto peptone, 3% éthanol), YPEG (1% extrait de levures, 2% bacto peptone, 2% éthanol, 3% glycérol) et YPE + Cu²⁺ (YPE additionné de 100 µM CuSO₄) pour obtenir une DO_{600} de 0.100 ou 0.200. Les incubations ont été faites à 26°C avec agitation à 200 rpm jusqu'en phase stationnaire (de 35 à 100 heures). Des aliquots de 1 mL ont été prélevés à intervalles réguliers pour en mesurer la DO_{600} . Les temps de doublement de chaque souche dans chaque milieu ont été mesurés à partir de la phase logarithmique des courbes de croissance.

Résultats:

Rnt1p est impliquée à la fois dans la maturation de l'ARNr (Abou Elela *et al.*, 1996) et dans la maturation de snoRNAs (Chanfreau *et al.*, 1998) nécessaires pour les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr. De plus, Rnt1p est connue pour agir dans la maturation de snRNAs (Chanfreau *et al.*, 1997; Abou Elela *et al.*, 1998) qui épissent les pré-ARNm de la même façon que pour les snoRNAs. Afin de découvrir les interactions protéine-protéine entourant Rnt1p, le système double-hybrides a été utilisé pour cribler une banque de gènes couvrant le génôme de *S. cerevisiae* (James *et al.*, 1996). Dans cette recherche, la découverte de protéines formant des complexes ribonucléoprotéiques avec Rnt1p et l'ARNr et/ou des snoRNAs lors du processus de maturation de l'ARNr était attendue. De plus, sachant que d'autres RNases III sont impliquées dans d'autres activités, comme la régulation de l'expression de gènes grâce au clivage d'ARNm chez *E. coli* (voir Court, 1993 pour une revue) et un rôle dans la division cellulaire et la sporulation pour Pac1p de *S. pombe* (Xu *et al.*, 1990; Iino *et al.*, 1991), l'identification de partenaires cellulaires de Rnt1p pourrait aussi permettre de lui assigner de nouveaux rôles dans la cellule.

Le criblage double-hybrides a été réalisé en utilisant Rnt1p complet en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4p comme appât pour plusieurs raisons. Au chapitre 1, le test de complémentation des cellules $\Delta RNT1$ a démontré que la fusion BD/Rnt1p est fonctionnelle et bien exprimée. De plus, les tests de dimérisation réalisés ont démontrés que BD/Rnt1p était apte à interagir avec des fragments de Rnt1p en fusion avec AD, et donc que ce système devrait permettre d'aller chercher des protéines interagissant avec

BD/Rnt1p, s'il y en a. L'utilisation de la protéine complète augmente les chances d'avoir une conformation de Rnt1p qui soit la même que dans son contexte cellulaire où celle-ci forme probablement des complexes avec d'autres facteurs. Finalement, des protéines interagissant avec n'importe lequel des domaines de Rnt1p pourront être obtenues. Il aurait pu être intéressant également de n'utiliser que le domaine N-terminal de Rnt1p puisqu'il semble être le domaine idéal pour réaliser des interactions avec d'autres protéines pour moduler l'activité de Rnt1p. L'hôte choisi pour détecter les interactions, l'a été en fonction des gènes rapporteurs pouvant être utilisés afin de sélectionner le plus possible de bons candidats tout en diminuant le nombre de faux positifs repêchés. Dans la souche PJ69-4a (James *et al.*, 1996), 3 gènes rapporteurs y sont insérés, *HIS3*, *ADE2* et *lacZ*, sous le contrôle de 3 promoteurs différents: *GAL1*, *GAL2* et *GAL7* respectivement, procurant une grande efficacité de sélection, un faible nombre de faux positifs et une bonne sensibilité même pour les interactions plus faibles. Les gènes *ADE2* et *HIS3* permettent de réaliser facilement la sélection de candidats pour les interactions avec BD/Rnt1p dans les premières étapes du criblage, alors que *lacZ* permet par la suite, de confirmer l'interaction et d'en estimer la force.

Au départ, l'objectif de criblage était de 1 million de clones indépendants pour chacune des trois banques pour un total de 3 millions. Ce nombre permettrait d'avoir 95% de chance de repêcher une protéine particulière interagissant avec Rnt1p et donc d'avoir un criblage presque à saturation. Afin de tester l'efficacité de la stratégie de sélection des candidats pour l'interaction avec BD/Rnt1p (voir figure 11, dans la section matériel et méthode), la banque Y2HL-C3 a été criblée à petite échelle. 20000 transformants ont été obtenus sur milieu minimal sélectif pour les vecteurs, et après réplique sur velours sur

milieu minimal sans adénine, 18 candidats ont poussés. 3 transformants furent ensuite éliminés au test de co-ségrégation de l'étape C alors que 3 autres furent éliminés à l'étape D parce qu'aucun auxotrophe Ura^- n'a été obtenu. Les auxotrophes obtenus pour les 12 autres candidats potentiels ont par la suite passé avec succès le test de non-activation des rapporteurs en absence de BD/Rnt1p (étape D). L'ADN plasmidique de chaque candidat a été ensuite retransformé dans les PJ69-4a soit seul, soit avec le vecteur BD vide ou avec BD/RNT1. La capacité des candidats à activer l'expression des trois gènes rapporteurs seuls, en interagissant avec BD ou en interagissant avec Rnt1p a été testée. Tous, à l'exception de un, activèrent les 3 gènes rapporteurs qu'en présence de BD/Rnt1p démontrant l'interaction spécifique avec Rnt1p (tableau 3). Le dernier candidat éliminé (#13) ne le fut pas parce qu'il interagissait avec BD plutôt que Rnt1p mais parce qu'il n'activait que le gène *lacZ* en présence de Rnt1p; une interaction trop faible pour activer tous les promoteurs ou un faux positif. Les candidats furent séquencés pour révéler 8 protéines ou ORFs différents, certains se répétant 2 ou 3 fois (tableau 3). Toujours dans le but de tester l'efficacité du système double-hybrides et de la stratégie de criblage, 6 protéines ou ORFs différents furent testés pour l'interaction avec différents fragments de Rnt1p (tableau 4). Toutes s'avérèrent à lier les fragments C-terminaux $\Delta NT1$ et DS1, et ne pas lier les deux fragments N-terminaux ($\Delta DS1$ et ΔCT) ayant une délétion partielle ou totale du domaine de liaison à l'ARNdb ou domaine nucléase. DS1 étant le plus petit fragment C-terminal, le site de liaison de toutes ces protéines doit donc être à l'intérieur des 127 acides aminés qui incluent tout le dsRBD de Rnt1p.

Le criblage ayant démontré son efficacité et le système double-hybrides semblant générer de bons résultats, l'expérience fut appliquée à plus grande échelle. Des transformants

#	taille de l'insert	Tests après re-transformation dans PJ69-4a									Identification du gène par séquençage
		SCD-his + 3-AT			SCD-ade			X-gal sur pétri			
		seul	+BD	+RNT1	seul	+BD	+RNT1	seul	+BD	+RNT1	
4	1800 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	C-term. <i>KGD2</i>
5	900 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	C-term. <i>ADE2</i>
6	2600 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	C-term. <i>ADE2</i>
7	1100 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>YGR268C</i>
8	3000 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	C-term. <i>MGA2</i>
9	800 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>YCR087c-A</i>
10	2880 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>YLR328W</i>
12	970 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	C-term. <i>KGD2</i>
13	2000 pb	-	-	-	-	-	-	-	-	+	C-term. <i>ROX3</i> ⁼
14	2300 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>YGR268C</i>
15	800 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>YGR268C</i>
18	700 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	+	C-term. <i>SNF6</i>

Tableau 3: Exemple d'enregistrement des résultats durant les étapes du criblage double-hybrides de la banque Y2HL-C3 avec BD/Rnt1p. Les candidats #1 à #18 ont été sélectionnés après l'étape B de la stratégie de criblage. Les candidats #1, #2, #3, #11, #16 et #17 ont ensuite été éliminés après l'étape D et ne sont donc pas dans ce tableau. La taille du fragment de la banque inséré en aval de AD de Gal4p a été estimée par digestion enzymatique du plasmide isolé à l'étape E avec BanHI et Sall. Les tests des gènes rapporteurs *HIS3*, *ADE2* et *lacZ* après co-transformation du candidat avec BD ou BD/RNT1 ou aucun (AD/X seul) ont été réalisés en suivant l'étape G du criblage. (-): aucune croissance sur SCD-his et SCD-ade ou aucun développement de couleur bleue dans le test de X-gal. (+): bonne croissance sur SCD-his et SCD-ade ou développement de couleur bleue dans le test de X-gal. ⁼ *ROX3* a été éliminé à la suite de cette dernière étape de sélection car seulement le gène *lacZ* est activé en présence de BD/Rnt1p. Au moins 2 gènes rapporteurs, idéalement 3, doivent être activés par les double-hybrides pour être sélectionné. La dernière colonne indique le nom du gène en fusion avec AD de Gal4p pour chaque candidat identifié par séquençage (étape H).

BD/	AD/	Ade2p His/Ade	Mga2p His/Ade	YCR087c-A His/Ade	YGR268C His/Ade	Snf6p His/Ade	Kgd2p His/Ade
RNT1	1-471 aa	++/++	++/++	+/+	++/++	++/++	++/+
Δ DS1	1-395 aa	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Δ CT	1-243 aa	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Δ NT1	104-471 aa	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	++/+
DS1	344-471 aa	++/++	++/++	++/++	++/+	++/++	++/+
BD		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Tableau 4: Résultats du test d'interaction double-hybrides des premiers candidats identifiés (provenant de la banque C3) avec différentes délétions de Rnt1p fusionnées au BD de Gal4p. Au moment où ce test a été fait, ce sont les seules délétions de BD/RNT1 qui avaient été construites. BD seul est utilisé comme contrôle négatif d'activation des promoteurs. Pour chaque candidat, l'activation des gènes rapporteurs *HIS3* et *ADE2* a été vérifiée sur milieu sélectif sans histidine (+ 10 mM 3-AT) ou sans adénine: (++) bonne croissance, (+) croissance un peu plus faible, (-) absence de croissance.

pour 1.5 million de clones indépendants de la banque Y2HL-C1 ont été obtenus et examinés. Sur les 1.5 million qui avaient poussés sur milieu sélectif pour la présence des deux plasmides, 3942 clones ont poussés également après répliques sur velours sur milieu sélectif pour l'interaction c.-à-d. en absence d'histidine ou adénine. Les étapes de sélection suivantes, sur ces mêmes milieux sélectifs, après re-striages, co-ségrégation et retrait du plasmide contenant Rnt1p, ont permis d'éliminer 1449 clones qui activaient les gènes rapporteurs dans la souche de façon indépendante de BD/Rnt1p. Ce qui laissa 2493 candidats potentiels pour l'interaction avec BD/Rnt1p (tableau 5). La même stratégie a été appliquée avec la banque Y2HL-C2; 1.5 M de clones indépendants ont été criblés et 1860 clones qui poussaient sur SCD-his et SCD-ade ont été piqués et testés. 1385 clones ont été éliminés après les étapes de sélections laissant 475 candidats potentiels pour l'activation des gènes dépendante de l'interaction avec BD/Rnt1p (tableau 5). Mais pour cette banque, plusieurs candidats ont probablement été perdus à l'étape C à cause du vieillissement des levures qui n'ont pu être repiquées dans des délais raisonnables. Malgré que l'objectif de criblage était de un million de clones pour chaque banque, Y2HL-C3 n'a pas été criblée davantage parce que déjà 2968 candidats potentiels avaient été sélectionnés pour les deux autres banques ce qui semblait plus que suffisant et davantage que prévu. Le risque encouru en ne poursuivant pas le criblage de Y2HL-C3 est de rater une ou plusieurs protéines interagissant avec Rnt1p dont le ou les fragments du gène ne sont dans le cadre de lecture que dans le plasmide de cette banque. Malgré cela, le total de trois millions de clones indépendants criblés ayant été atteint avec Y2HL-C1 et C2, on a donc jusqu'à 99% de représentation pour ces deux banques.

	Y2HL-C1	Y2HL-C2	Y2HL-C3	Total
Nombre de clones indépendants criblés pour chaque banque:	1 500 000	1 500 000	20 000	3 020 000
Nombre de candidats repêchés après la 1 ^{ère} sélection (B):	3942	1860	18	5820
Nombre de candidats éliminés après les 2 ^{ième} et 3 ^{ième} sélections (C et D):	1449	1385	6	2840
Nombre de bons candidats conservés après la 3 ^{ième} sélection (D):	2493	475	12	2980
Pourcentage bons candidats parmi les candidats repêchés:	63.24%	25.54%	66.66%	51.20%
Quantité de bons candidats par 1000 clones indépendants criblés:	1.66	0.32	0.60	0.99
Nombre de candidats qui ont été re-testés à la 4 ^{ième} sélection (F et G):	28	10	12	50*
Nombre de candidats positifs pour l'interaction avec Rnt1p et non BD:	19	8	11	38
Pourcentage de candidats qui ont été éliminés ainsi:	32.14%	20.00%	8.33%	24.00%
Nombre de candidats séquencés au total (H):				121 [†]
Nombre de protéines différentes identifiées:				59
Nombre de ORFs différents identifiés:				17
Nombre de copies retrouvées pour une même protéine ou ORF sur les 119 [†] séquencés:	1×	2×	3×	4×
Quantité de protéines ou ORFs ayant ce nombre de copies:	48	15	11	2
Nombre moyen de copies par protéine ou ORF:	1.566 ± 0.712			

Tableau 5: Résultats pour chaque étape de la stratégie de criblage pour l'ensemble des trois banques Y2HL. *Le nombre de 50 comprend 38 candidats qui ont été re-testés avant d'être séquencés et 12 autres qui ont été séquencés avant d'être re-testés. [†]Parmi les 121 candidats séquencés; 1 candidat ne contenait pas de gène ou ORF dans le fragment d'ADN chromosomal et 1 autre était un faux positif.

On peut constater que les étapes de sélection consécutives à la première sélection sur SCD-his et SCD-ade se sont avérées très utiles en permettant d'éliminer en moyenne presque 35% de tous les candidats qui avaient d'abord été repêchés (en considérant seulement Y2HL-C1 et C3, tableau 5). 2980 candidats potentiels pour l'interaction avec Rnt1p sont demeurés, un trop grand nombre pour extraire l'ADNp de tous et re-transformer les PJ69-4a. Toutes les levures ont donc été congelées dans le glycérol pour les préserver après en avoir retiré le plasmide BD/RNT1 à l'étape D. À ce moment-ci, c'est en moyenne 1 clone indépendant sur 1000 qui interagit avec BD/Rnt1p. L'étape suivante de sélection, après avoir isolé le plasmide contenant le gène candidat pour ensuite le re-transformé dans des PJ69-4a sans plasmide BD, avec BD, ou avec BD/RNT1, permet d'éliminer les faux positifs qui pourraient activer les promoteurs suite à un évènement fortuit de mutation dans la souche ou suite à l'interaction avec Gal4p au lieu de Rnt1p. Cette étape est la dernière étape pour filtrer les interactions spécifiques avec Rnt1p activant à la fois, *GAL1-HIS3*, *GAL2-ADE2* et *GAL7-lacZ*, avant le séquençage. 38 candidats sur 50 testés ont passé ce dernier test, permettant d'éliminer encore approximativement 24% des candidats. Actuellement, ces 40 candidats ainsi que 82 autres n'ayant pas subi cette ultime étape de sélection, ont été séquencés, 30 de la banque C1, 80 de la banque C2 et 11 de la banque C3, et leur identification a donné des résultats des plus intéressants. Premièrement, 59 protéines connues et 17 ORFs potentiels ont été identifiés, pour un total de 76 protéines différentes (tableau 5 et annexe II). Deuxième fait intéressant, toutes les protéines connues ou les ORFs ayant des homologies à des protéines connues, peuvent être séparés en 6 classes fonctionnelles (tableau 6): 28 candidats, presque le 1/4 des candidats séquencés, sont des protéines affectant la transcription formant un groupe de 18 facteurs différents. Il y a aussi 5 protéines

Classes fonctionnelles des protéines	Nombre de protéines	Nombre de candidats
Facteurs de transcription	18	28
Protéines de stress	5	10
impliquées dans le cycle cellulaire et la méiose	18	24
impliquées dans la respiration et la nutrition	27	47
impliquées dans le transport	8	11
impliquées dans la maturation de l'ARNr et snoRNAs	1	1
ORFs inconnus et autres	17	26

Tableau 6: Les 119 protéines identifiées comme interagissant avec Rnt1p peuvent être séparées dans 6 classes fonctionnelles. Le nombre de protéines représente le total de protéines différentes dans la classe alors que le nombre de candidats représente le nombre total de candidats séquencés appartenant à cette classe ce qui inclue donc aussi les répétitions. La dernière rangée présente le nombre restant de ORFs ou protéines ne pouvant pas être classés parce qu'on ne connaît pas leurs fonctions.

différentes reliées au stress chez *S. cerevisiae*, dont certaines ont été repêchées plusieurs fois. 24 candidats séquencés représentent 18 protéines impliquées dans le cycle cellulaire et la méiose. Alors qu'exactement 27 protéines différentes incluant plusieurs des facteurs de transcription ci-haut sont impliquées dans la nutrition et la respiration cellulaire (métabolismes). Une autre classe bien représentée dans cette banque de candidats pour l'interaction avec Rnt1p sont les 8 protéines impliquées dans le transport des protéines. Et enfin, seulement une protéine nucléolaire, importante pour la maturation de l'ARNr (activité connue de Rnt1p), a été identifiée parmi les 121 candidats. Les 17 candidats restant sont surtout des ORFs dont les fonctions ne sont pas connues et qui n'ont donc pu être classés, (tableau 6). Une liste exhaustive des 76 protéines avec leur nom, leur numéro de candidat, portion de la protéine en fusion avec AD de Gal4p et fonction connue est disponible en annexe II. Troisièmement, quoique seulement 4.1% candidats ont été séquencés, on observe qu'il y a déjà plusieurs protéines qui se répètent deux, trois, et même quatre fois. Certaines protéines ont d'ailleurs été repêchées dans deux banques différentes avec des fragments de restriction variés du gène en fusion avec BD. Le plus bel exemple étant Mac1p (tableau 7 et annexe II) dont on a jusqu'à maintenant repêché deux fois dans la banque C2 et deux fois dans la C3 et dont les fragments obtenus correspondent à des protéines de trois tailles différentes (acides aminés 72-417, 160-417 et 246-417). Dans le reste de la banque de candidats beaucoup de ces protéines se répéteront encore.

Parmi les 6 classes de protéines, un groupe a été choisi pour regarder de plus près à quoi ressemblent les candidats capturés (tableau 7). 18 protéines différentes contrôlant l'expression de d'autres gènes interagiraient avec Rnt1p. La majorité de ces facteurs de

Facteur de transcription	taille du facteur	nombre de candidats	banques Y2HL où repêché	fragment repêché interagissant avec Rnt1p [†]
Adr1p	1323 a.a.	1	C2	328-?
Aro80p	950 a.a.	1	C2	781-950
Ccr4p	837 a.a.	1	C2	1-837
Gcr2p	534 a.a.	2	C2, C2	190-534
Mac1p*	417 a.a.	4	C1, C1, C2, C2	246-417
Mga2p*	1113 a.a.	1	C3	691-1113
Msn1p	382 a.a.	1	C2	22-382
Oaf1p	1062 a.a.	3	C2, C2, C2	973-1062
Pdr1p	1068 a.a.	3	C2, C2, C2	865-1068
Ppr1p	904 a.a.	1	C2	771-904
Sas3p	831 a.a.	1	C2	316-831
Skn7p*	622 a.a.	1	C1	183-622
Snf6p*	332 a.a.	1	C3	227-332
Snf7p	240 a.a.	1	C2	25-240
Spo13p	291 a.a.	1	C2	95-291
YCR087C-A*	153 a.a.	2	C1, C3	113-153
YJL206C	758 a.a.	2	C2, C2	606-758
YMR030W	376 a.a.	1	C1	269-376

Tableau 7: 18 facteurs de transcriptions sont des candidats potentiels pour l'interaction avec Rnt1p. Taille de la protéine, nombre de répétitions pour chacune, banque où les candidats ont été repêchés et partie de la protéine qui semble interagir avec Rnt1p. [†]Dans les cas où plusieurs fragment différents ont été repêchés, c'est le plus petit fragment suffisant pour détecter l'interaction qui est indiqué. *Facteurs de transcription ayant subi la dernière étape de sélection du criblage et ayant prouvés qu'ils activent la transcription des gènes rapporteurs seulement en présence de Rnt1p et non avec la partie BD de BD-Rnt1p ou seuls.

transcription sont représentés par un seul candidat repêché, mais Gcr2p, YCR087C-A et YJL206c en ont deux chacun, Oaf1p et Pdr1p sont représentés 3 fois et Mac1p revient 4 fois. La plupart des facteurs se lient à Rnt1p grâce à leur portion C-terminale, avec Oaf1p et YCR087C-A ayant les plus petits fragments capable d'interagir recueillis; 89 et 40 acides aminés respectivement. Habituellement dans la construction des banques, les protéines complètes et les fragments N-terminaux sont moins bien représentés, le repêchage de protéines ayant un domaine d'interaction en C-terminal est plus fréquent. Seule le facteur Ccr4p est complet, ce qui veut dire qu'il y a une séquence d'ADN chromosomal en 5' de *CCR4* formant un «linker» reliant le domaine AD de Gal4p à Ccr4p dans le cadre de lecture. Plusieurs tentatives pour identifier des résidus conservés qui pourraient être un motif responsable de la liaison des protéines à Rnt1p en utilisant différents programmes d'alignement de protéines ont été faites. Elles ont toutes échouées. Parcontre, pour ce qui est de Rnt1p, d'autres expériences double-hybrides ont été effectuées afin de déterminer le domaine nécessaire pour l'interaction avec les facteurs de transcription. En utilisant les diverses constructions de Rnt1p du chapitre 1, c'est-à-dire les fragments variés de Rnt1p en fusion avec le BD de Gal4p, des tests d'interaction ont été réalisés avec quelques candidats dans PJ69-4a. Le tableau 8 présente les résultats obtenus pour trois facteurs de transcription; Mac1p, Snf6p et Mga2p. L'activation des trois gènes rapporteurs a été vérifiée pour chaque co-transformation des constructions de Rnt1p avec les facteurs. L'expression de *ADE2* et *HIS3* a été testée sur pétri minimal ne contenant pas ces acides aminés et le gène *lacZ* a été testé par le développement de la couleur bleue en présence de substrat X-gal sur le pétri. Plus le bleu est intense plus l'interaction est forte. Pour Mga2p, le test a aussi été fait en liquide avec l'ONPG comme substrat et les résultats sont présentés en unités de Miller. Les trois facteurs de

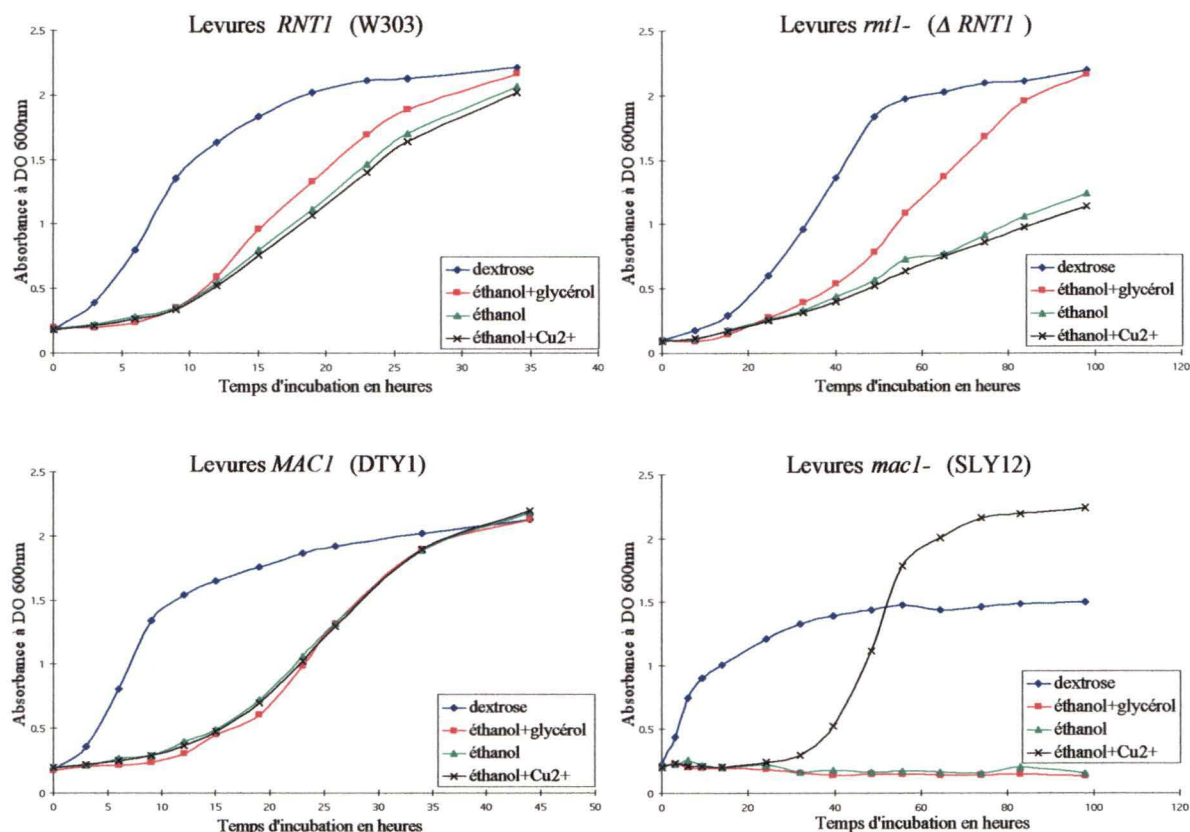
avec AD/ Constructions avec BD/	MAC1 246-417 a.a.			SNF6 227-332 a.a.			MGA2 691-1113 a.a.			
	His	Ade	X-gal	His	Ade	X-gal	His	Ade	X-gal	β -gal
RNT1 1-471 aa	++	++		++	++		++	++		18.15±1.92
Δ DS 1-395 aa	-	-		-	-		-	-		0
Δ CT 1-243 aa	-	-		-	-		-	-		0
NT2 1-191 aa	-	-		-	-		-	-		0.79±0.09
Δ NT1 104-471 aa	++	++		++	++		++	++		ND
Δ NT2 192-471 aa	++	++		++	++		++	++		33.50±3.83
DS1 344-471 aa	++	++		++	++		++	++		57.10±10.47
DS3 344-450 aa	-	-		-	-		-	-		0
DS4 428-471 aa	+	+		++	+/-		+	++		8.13±1.57
BD	-	-		-	-		-	-		0

Tableau 8: Résultats observés lors des tests double-hybrides entre les trois facteurs de transcription Mac1p, Snf6p et Mga2p fusionnés au AD de Gal4p et les différentes délétions de Rnt1p fusionnées au BD de Gal4p. BD seul est utilisé comme contrôle négatif d'activation des promoteurs. Pour chaque facteur de transcription l'activation des gènes rapporteurs *HIS3*, *ADE2* et *lacZ* a été vérifiée. Sur milieu sélectif sans histidine (+ 10 mM 3-AT) ou sans adénine: (++) bonne croissance, (+) croissance un peu plus faible, (-) absence de croissance. Pour *lacZ*, plus le bleu du test X-gal est intense plus l'interaction est forte. Pour Mga2p, les résultats du test de β -gal liquide ont aussi été inscrits en Unités de Miller. ND = Non-déterminé.

transcription interagissent avec BD/Rnt1p de façon assez égale, l'interaction avec Snf6p étant peut-être un peu plus faible. Les deux constructions suivantes de Rnt1p, tronquées en C-terminal, BD/ Δ DS et BD/ Δ CT, ne permettent pas d'activer les trois promoteurs (la couleur bleue pâle étant comparable au contrôle négatif BD seul) avec les trois facteurs. La portion N-terminale de Rnt1p (BD/NT2) excluant le domaine nucléase et le dsRBD semble activer quelque peu *GAL7-lacZ*, mais probablement faussement car il n'y a aucune croissance observée en absence d'histidine ou d'adénine. Mac1p, Snf6p et Mga2p n'interagissent donc pas avec le domaine N-terminal de Rnt1p. Les deux constructions de Rnt1p suivantes contenant toutes le dsRBD avec ou sans le domaine nucléase activent fortement les promoteurs. BD/DS1 la construction englobant seulement le dsRBD est suffisante pour procurer une bonne liaison avec chacun des facteurs, la force de l'interaction semblant d'ailleurs beaucoup plus forte que la protéine BD/Rnt1p complète (l'activité β -gal pour Mga2p est de 57.10 avec le dsRBD, comparé à 18.15 avec Rnt1p). Jusqu'à maintenant toutes les protéines testées se lient efficacement à BD/DS1, le facteur YCR087C-A interagissait aussi avec le dsRBD de Rnt1p de même que les autres protéines candidates testées dans le tableau 4. Cependant, la délétion de 21 acides aminés à la fin du dsRBD (BD/DS3) ne faisant pas partie du motif de liaison à l'ARNdb conservé, enlève toute capacité au dsRBD d'interagir. Alors que le test double-hybrides des 3 facteurs avec la toute petite construction de 43 acides aminés à la fin de Rnt1p, BD/DS4, est positif. Les 43 derniers acides aminés ont un potentiel d'interaction à eux seuls avec les trois facteurs qui n'est pas négligeable, les promoteurs sont activés un peu plus faiblement, mais on peut encore lire une bonne force d'interaction pour Mga2p de 8.13 ± 1.57 unités de Miller. Comme le motif dsRBD conservé se termine exactement après le résidu L438, et que la construction BD/DS3 s'arrêtant après le résidu R450 ne

peut lier les protéines, la construction DS4 de Rnt1p semble contenir le site de liaison des protéines testées, bien que le dsRBD pourrait contenir quelques résidus bien positionnés pour stabiliser davantage cette interaction.

Étant donné que la plupart des facteurs de transcription et autres protéines repêchées sont impliqués dans des voies métaboliques utilisant les nutriments contenus dans l'environnement pour la synthèse de composantes cellulaires, des expériences simples peuvent être faites afin de voir si Rnt1p semble importante dans ces voies. Il est connu que la délétion de *MAC1*, le gène de l'un des facteurs de transcription repêchés, affecte la croissance des levures sur l'éthanol, avec ou sans glycérol, comme source de carbone. En fait, en absence de Mac1p aucune croissance n'est visible dans ce milieu. Parcontre, l'addition d'un excès d'ions Cu^{2+} dans ce même milieu de culture permet la croissance de ces levures après une période de latence (Jungmann *et al.*, 1993, D. Thiele et S. Labbé, comm. pers.). Pour vérifier si la délétion de Rnt1p a un effet sur l'activité de Mac1p, la capacité des cellules délétées en *RNT1* à croître sur ces mêmes milieux a été testée pour voir si les phénotypes particuliers observés chez les *mac1⁻* pouvaient être observés chez les levures $\Delta RNT1$. La figure 12 présente les courbes de croissance obtenues pour les souches de levures *RNT1*, *rnt1⁻*, *MAC1* et *mac1⁻* sur dextrose, éthanol, éthanol et glycérol, et éthanol et excès de Cu^{2+} . Bien sûr, les levures délétées en *RNT1* ont été incubées à 26°C alors que les *MAC1* et *mac1⁻* à 30°C. Premièrement, les résultats obtenus pour *MAC1* et *mac1⁻* confirment les résultats obtenus par d'autres groupes (D. Thiele et S. Labbé, comm. pers., Jungmann *et al.*, 1993). Concernant Rnt1p, une légère baisse de la croissance des levures $\Delta RNT1$ sur éthanol comparativement aux *RNT1* a été observée



Sources de Carbone	Temps de doublement des cultures (en heures)			
	dextrose	éthanol + glycérol	éthanol	éthanol + Cu ²⁺
<i>RNT1</i> (W303)	3.2	5.3	7.0	7.0
<i>rnt1-</i> ($\Delta RNT1$)	9.4	14.8	35.2	38.9
Ratio <i>rnt1-</i> / <i>RNT1</i>	2.93	2.79	5.03	5.56
<i>MAC1</i> (DTY1)	3.0	6.8	6.5	6.2
<i>mac1-</i> (SLY12)	4.0	---	---	4.9
Ratio <i>mac1-</i> / <i>MAC1</i>	1.33	---	---	0.79

Figure 12: Courbes de croissance pour les levures *RNT1*, *rnt1-*, *MAC1* et *mac1-* en cultures sur différentes sources de carbones à température permissive de 26°C. Le temps de doublement en heures pour chaque culture a été calculé et reporté dans le tableau ci-haut. Le ratio du temps de doublement de la souche déletée par rapport à la souche mère est aussi présenté. «---» aucun doublement pour cette culture puisqu'il y a arrêt de croissance.

(voir les temps de doublement dans le tableau, ratio *rnt1*/*RNT1* sur éthanol de 5,03 comparativement à 2,93 sur dextrose), mais c'est loin d'être l'arrêt observé dans les *mac1*⁻. Aussi, n'ayant pas observé d'arrêt de croissance, l'ajout de Cu²⁺ dans l'éthanol n'a pas permis non plus d'observer le sauvetage de la croissance (ratio de 5,56). De plus, alors que chez les *mac1*⁻ la présence de glycérol avec l'éthanol est tout aussi limitante que l'éthanol seul, chez les levures $\Delta RNT1$, lorsqu'il y a du glycérol, l'effet de l'éthanol sur le ralentissement de la croissance n'est plus visible (le ratio de temps de doublement *rnt1*/*RNT1* sur éthanol+glycérol est similaire à sur dextrose). La délétion de Rnt1p ne semble donc pas affecter négativement l'activité de Mac1p, mais pourrait affecter sensiblement l'expression de d'autres protéines impliquées dans le métabolisme de l'éthanol. Il aurait été intéressant de comparer la croissance des levures $\Delta RNT1$ sur d'autres types de nutriments mais ça n'a pas encore été fait.

Discussion:

Pour comprendre le rôle de Rnt1p dans la levure et des ribonucléases III en général, il peut être bien utile d'identifier les protéines auxquelles elle s'associe. Comparativement aux méthodes biochimiques *in vitro* techniquement difficiles, le système double-hybrides est une stratégie génétique simple pour la détection des interactions entre protéines *in vivo*. Et qui, de plus, peut être appliquée à grande échelle pour cribler l'ensemble des protéines codées dans un génôme. Les résultats du criblage double-hybrides d'une banque de gènes de *S. cerevisiae* avec Rnt1p comme appât ont grandement surpris à prime abord; non seulement par le nombre de candidats potentiels repêchés, ou la quasi absence de protéines nucléolaires impliquées dans le processing d'ARNr et petits ARNs, mais aussi par la variété de protéines qui interagissent avec Rnt1p.

Premièrement, trois millions de clones indépendants ont été criblés en suivant une stratégie qui permettait de (1) sélectionner les interactions qui pouvaient activer le plus stringent des trois promoteurs/gènes rapporteurs, (2) éliminer les faux candidats qui activaient les gènes rapporteurs en absence de BD/Rnt1p et (3) sélectionner les candidats qui activaient les trois gènes rapporteurs grâce à l'interaction spécifique avec Rnt1p et non avec BD de Gal4p. L'étape 1 a permis de sélectionner 0.19% des clones criblés, dont 48.8% ont été éliminés par la suite à l'étape 2. 2980 candidats potentiels repêchés sont maintenant conservés à -80°C en attendant d'être identifiés. Cependant, dans les faits, la dernière étape n'a été appliquée que pour 50 des candidats potentiels pour l'interaction avec Rnt1p permettant d'éliminer en moyenne 24% des protéines qui interagissaient toutes avec la partie Gal4p de la fusion. Donc, consécutivement à l'application de la

dernière sélection à tous les candidats, possiblement 897 (24% de 2980) autres faux candidats pourraient être retranchés, résultant en un total de 2083 vrais candidats interagissant avec Rnt1p spécifiquement. De plus, parmi les 121 candidats qui ont été séquencés, deux d'entre eux étaient des faux positifs ne contenant pas d'ORF dans le cadre de lecture de AD de Gal4p. Il s'avère donc, que 1.65% des séquencés doivent encore être retranchés. La soustraction de ces faux positifs de la banque totaliserait environ 2048 candidats potentiels comme partenaires de Rnt1p. Est-ce-à-dire que 2048 protéines du protéome de *S. cerevisiae* pourraient réellement interagir avec Rnt1p? Non, puisque déjà sur les quelques 121 candidats séquencés, 28 protéines ou ORFs sont représentés plus d'une fois (tableau 5) avec en moyenne, environ 1.566 ± 0.712 copies par protéine. Si l'on rapporte ce nombre à 2048 candidats potentiels, on pourrait avoir un nombre de copies moyen de 26.956 ± 12.256 copies par protéine ou ORF. Si c'était effectivement le cas alors on aurait déjà identifié toutes les protéines différentes interagissant avec la RNase III. Mais selon l'écart-type, il pourrait y avoir approximativement jusqu'à 139 protéines variées ce qui donnerait encore une possibilité de 63 nouvelles protéines à identifier. Cependant, l'identification de seulement 121 candidats sur 2048 est peut-être peu représentatif de la totalité. Il est difficile d'extrapoler à partir de plusieurs cas uniques comme lorsqu'une seule copie d'une protéine est obtenue. Plus le nombre de copies pour une protéine est élevé, plus il y a de chances que cette "statistique" soit valable. Il est plus probable de retrouver Mac1p 68 fois dans la banque que de retrouver Mga2p 17 fois. La moyenne calculée de 26.956 copies par protéine peut être plausible, mais il est difficile de prédire exactement le nombre de protéines différentes dans cette banque autrement que par le séquençage de l'ensemble. Étant donné le nombre élevé de répétitions prédites, pour éviter l'application de l'étape 3

pour tous les candidats restant, il faudrait amplifier par PCR l'insert fusionné à AD de Gal4p directement à partir d'une colonie de levures et fixer cet ADN à une membrane (avec une centaine d'autre candidats) et procéder à l'hybridation avec une sonde ADN de l'ensemble des candidats déjà identifiés. Ou l'inverse, l'ADN de chaque candidat inconnu est marqué en même temps qu'amplifié par PCR et sert de sonde pour hybrider une membrane contenant les ADNs de tous les candidats identifiés précédemment. On pourrait s'abstenir ainsi d'extraire l'ADN, de transformer les bactéries par électroporation, de préparer l'ADN, de re-transformer les PJ69-4a avec des contrôles et de séquencer, pour plusieurs centaines de candidats qui ne font que se répéter.

Avoir plusieurs copies pour une même protéine avec des fragments différents est très informatif. Par exemple, pour Mac1p, une protéine de 417 acides aminés, quatre fragments C-terminaux de 72 à 417 a.a., 160 à 417 a.a. (2 candidats) et 246 à 417 a.a. ont été repêchés. Rnt1p est donc capable de se lier avec la protéines presque complète mais les 171 derniers acides aminés sont suffisant pour médier cette interaction. De plus, repêcher plusieurs copies et différents fragments d'une même protéine dans un criblage, constitue autant de confirmation du potentiel réel d'interaction avec Rnt1p dans le contexte cellulaire. Le repêchage plus fréquent d'une protéine par rapport aux autres peut être un indice de la force de cette interaction. Une interaction entre deux protéines solidifiée par plusieurs interactions non-covalentes pourrait être plus stable et permettre une meilleure activation des gènes rapporteurs par la reconstitution de Gal4p. Des interactions de nature plus faibles risquent aussi davantage d'être éliminées par une stratégie de criblage trop sévère favorisant la découverte des complexes stables.

Alors que seulement 121 candidats ou 4% de la banque ont été séquencés, les répétitions retrouvées pour plusieurs protéines suggèrent que le criblage a atteint la saturation. Selon James *et al.*, (1996), le criblage de 3 millions de clones indépendants (1 million par cadre de lecture) devrait donner un niveau de saturation à 95%. C'est-à-dire 95% de chance de repêcher une protéine particulière interagissant avec Rnt1p. Dans ce criblage-ci, cadres de lecture (Y2HL-C1 et C2) ont même été criblés à 99% alors que seulement 20 000 clones ont été criblés dans la banque du troisième cadre de lecture. Le nombre de candidats potentiels repêchés jusqu'alors était déjà important et semblait suffisant. De sorte que il est possible que plusieurs partenaires cellulaires de Rnt1p n'ont pas été trouvés s'ils ne pouvaient être exprimés correctement que dans le cadre de la troisième banque. De toute façon, il est impossible d'identifier l'ensemble des protéines du protéome de *S. cerevisiae* qui interagissent avec Rnt1p uniquement avec un criblage double-hybrides. Il y a plusieurs raisons pour expliquer pourquoi certaines protéines pourraient ne pas être représentées: La fusion d'une protéine à Gal4p pourrait résulter en une protéine non-fonctionnelle dont la structure tri-dimensionnelle serait altérée et qui ne pourrait donc pas interagir avec la proie. Ou l'inverse peut être vrai aussi, la fusion d'une protéine à AD de Gal4p pourrait rendre plutôt le domaine d'activation non-apte à recruter la machinerie transcriptionnelle et donc cette protéine serait systématiquement éliminée du criblage. On n'a qu'à penser à AD/Rnt1p qui est fonctionnelle dans les cellules *ARNT1*, mais qui est incapable d'activer les gènes rapporteurs en présence de BD/Rnt1p. Une autre explication pourquoi une protéine pourrait ne pas être représentée serait la mauvaise localisation de la protéine de fusion, par exemple une protéine membranaire en fusion avec AD de Gal4p pourrait diriger la fusion dans la paroi cellulaire et l'interaction de celle-ci avec Rnt1p ne pourrait pas être détectée à cause de son absence dans le noyau pour activer la

transcription par Gal4p. Des interactions très dynamiques comme entre une enzyme et son substrat pourraient être de trop courte durée pour promouvoir suffisamment l'activation des gènes rapporteurs. Par exemple une phosphorylase qui modifierait Rnt1p pour l'activer. La banque utilisée a été construite pour que chaque fragment créé puisse être exprimé dans le bon cadre de lecture grâce au clonage dans 3 vecteurs pGAD différents. Il est possible qu'une protéine ne soit pas représentée dans la banque parce qu'aucune des cinq enzymes de restriction utilisées ne clive dans le gène ou très près du gène en amont (James *et al.*, 1996). De plus, les protéines dont le site de liaison à Rnt1p se trouverait en N-terminal pourraient être sous-représentées comparativement à des protéines dont le site d'interaction se situerait en C-terminal (comme Mac1p). C'est pour toutes ses raisons que le criblage se doit d'être exhaustif et presque à saturation afin d'aller repêcher au moins une copie d'une protéine liant Rnt1p. Finalement, on ne peut pas dire que toutes les partenaires de Rnt1p ont été repêchées, mais ce qui était important c'est d'avoir utilisé une méthode de criblage efficace qui permettait d'éliminer le plus de faux positifs possibles. De sorte que, plus de candidats potentiels sélectionnés sont de vrais partenaires interagissant avec Rnt1p. Le mandat étant par la suite de prouver que cette interaction physique est vraie par une autre méthode, que ce soit par co-immunoprécipitation, immunolocalisation, co-sédimentation, etc, et ensuite de déterminer la relevance biologique de l'interaction. Ce dernier point devrait être plus facile à réaliser lorsque les candidats sont déjà connus pour jouer un rôle dans la même voie que la ribonucléase III.

Deuxièmement, parmi les 76 protéines et ORFs découverts, seulement une protéine agissant dans la maturation de l'ARNr a été identifiée alors qu'on s'attendait à en

découvrir davantage parmi les protéines interagissant fonctionnellement avec Rnt1p dans cet évènement. On s'attendait par exemple, à identifier une hélicase qui pourrait procéder au désappariement complet des bases du substrat ARNdb une fois que Rnt1p a effectué ses clivages pour le rendre accessible aux exonucléases. D'ailleurs les RNases III de la classe IV possèdent toutes un motif hélicase signe que cette activité hélicasique est très importante dans le «processing». Il serait donc fort probable de retrouver cette activité en *trans* chez *S. cerevisiae* si celle-ci se trouve en *cis* dans des ribonucléases III d'espèces supérieures. Le séquençage de davantage de candidats permettra peut-être d'en identifier éventuellement, à moins qu'une interaction directe entre une hélicase et Rnt1p ne soit pas nécessaire. Le facteur nucléolaire découvert dans la banque est cependant vraiment intéressant. Gar1p fait partie d'un complexe ribonucléoprotéique qui procède à la pseudouridylation de l'ARN ribosomal, une modification post-transcriptionnelle qui convertit des U de l'ARNr désignés par des snoRNAs en pseudo-U (Ψ). L'interaction de Gar1p avec Rnt1p pourrait permettre de faire le lien entre deux activités de modifications du pré-ARNr. L'étude de cette interaction Gar1p:Rnt1p sera le sujet du chapitre 3 de ce mémoire. Deux autres protéines repêchées pourraient aussi être localisées dans le même compartiment cellulaire que Rnt1p; Nog1p qui est une GTPase nucléolaire ayant été purifiée récemment avec le complexe de protéines du pore nucléaire (Rout *et al.*, 2000); et Naf1p (YNL124w) dont le nom a été réservé dans la «*Saccharomyces* Genome Database» et qui serait un facteur d'assemblage nucléaire. Les deux protéines n'ont toutefois pas encore de rôle précis dans la cellule.

Dernièrement, Giorgi *et al.*, (2001) ont publié la première découverte d'une interaction physique entre Rnt1p et une autre protéine. Cette protéine, Nop1p, fait partie des

complexes ribonucléoprotéiques contenant les snoRNAs à boîte C/D avec Nop58p, Nop56p et Snu13p (Schimmang *et al.*, 1989, Gautier *et al.*, 1997, Wu *et al.*, 1998, Lafontaine et Tollervey, 1999 et 2000, Watkins *et al.*, 2000) et est requise pour la stabilité et l'accumulation de ces snoRNAs. Le groupe a démontré que Rnt1p et Nop1p étaient tous les deux nécessaires pour le processing du snoRNA U18 *in vivo* et *in vitro*. Parce que ce snoRNA ne possède pas en 5' une partie ARNdb fermée par une tétraboucle AGNN typique des substrats de Rnt1p, la liaison de Nop1p à l'extrémité d'un appariement double-brins du pré-snoRNA U18, permettrait le recrutement de Rnt1p, remplaçant ainsi la fonction de la tétraboucle, et le processing du snoRNA par cette dernière. L'interaction physique entre les deux protéines purifiées a ensuite été confirmée *in vitro* (Giorgi *et al.*, 2001). Avoir également repêchée Nop1p dans le criblage double-hybrides aurait constitué une preuve objective de la qualité et véracité des résultats de la stratégie utilisée. Mais, même si ce n'est actuellement pas le cas, parmi les 121 candidats identifiés, nous verrons que la découverte de plusieurs autres protéines en plus de Gar1p révèle aussi un criblage double-hybrides non dépourvu de sens et aux résultats interprétables.

Troisièmement, les différentes partenaires cellulaires de Rnt1p sélectionnées minutieusement font parties de classes variées de protéines. Nous en avons définies 5 en plus des protéines impliquées dans la maturation de l'ARNr et des snoRNAs; les facteurs de transcription, les protéines de stress, les protéines du cycle cellulaire et de la méiose, celles impliquées dans la respiration et la nutrition et les protéines de transport (tableau 6). De plus, plusieurs des protéines ont été réparties dans plus d'une classe comme par exemple, certains facteurs de transcription qui sont impliqués dans plusieurs voies

métaboliques différentes (voir annexe II). La figure 13 résume différents liens connus entre 31 facteurs de transcription (rectangles rouges) et protéines métaboliques ou de stress (ovales rouges) qui interagiraient avec Rnt1p. Toutes ces protéines sont impliquées dans différentes réponses au stress, réunissant ainsi 3 classes du tableau 6 dans un seul groupe. Les divers types de stress couverts sont; la limitation des nutriments, qui entraîne le métabolisme des carbohydrates, des acides aminés et des nucléotides ainsi que la respiration et la fermentation; les stress oxydatifs, osmotiques et thermiques, suite auxquels une résistance devra être développée et des protéines repliées correctement; et finalement la présence d'acides gras ou de drogues dans le milieu qui vont activer des gènes impliqués dans le métabolisme et β -oxydation des acides gras et donc affecter la maintenance des membranes. Il y a plusieurs petits liens intéressants: Certains facteurs interagissant avec Rnt1p sont activés par les mêmes éléments et vont activer les gènes dans les mêmes voies, par exemple les radicaux libres induisent Oaf1p et Skn7p et les deux facteurs activent des protéines péroxisomales pour faire face à ce stress oxydatif. Mac1p peut également activer ces gènes mais il est induit par la carence en ions de cuivre. D'autres liens sont une suite d'évènements; Mga2p active l'expression du gène *OLE1* codant pour une désaturase, la protéine Ole1p convertie le stéroyl-CoA en acide oléique et ce dernier induit les facteurs Adr1p et Oaf1p responsables de l'activation des protéines péroxisomales. Adr1p induira aussi l'expression de Adh2p (métabolisme des carbohydrates) alors que Oaf1p induira en plus l'expression de Cit1p dans les mitochondries pour activer la respiration cellulaire et ainsi de suite. La découverte que les protéines potentiellement associées à Rnt1p agissent dans les mêmes voies métaboliques suggère fortement une implication de Rnt1p dans ces voies. Si au niveau de la maturation de l'ARNr, peu de partenaires physiques ont été identifiées alors qu'on connaît déjà

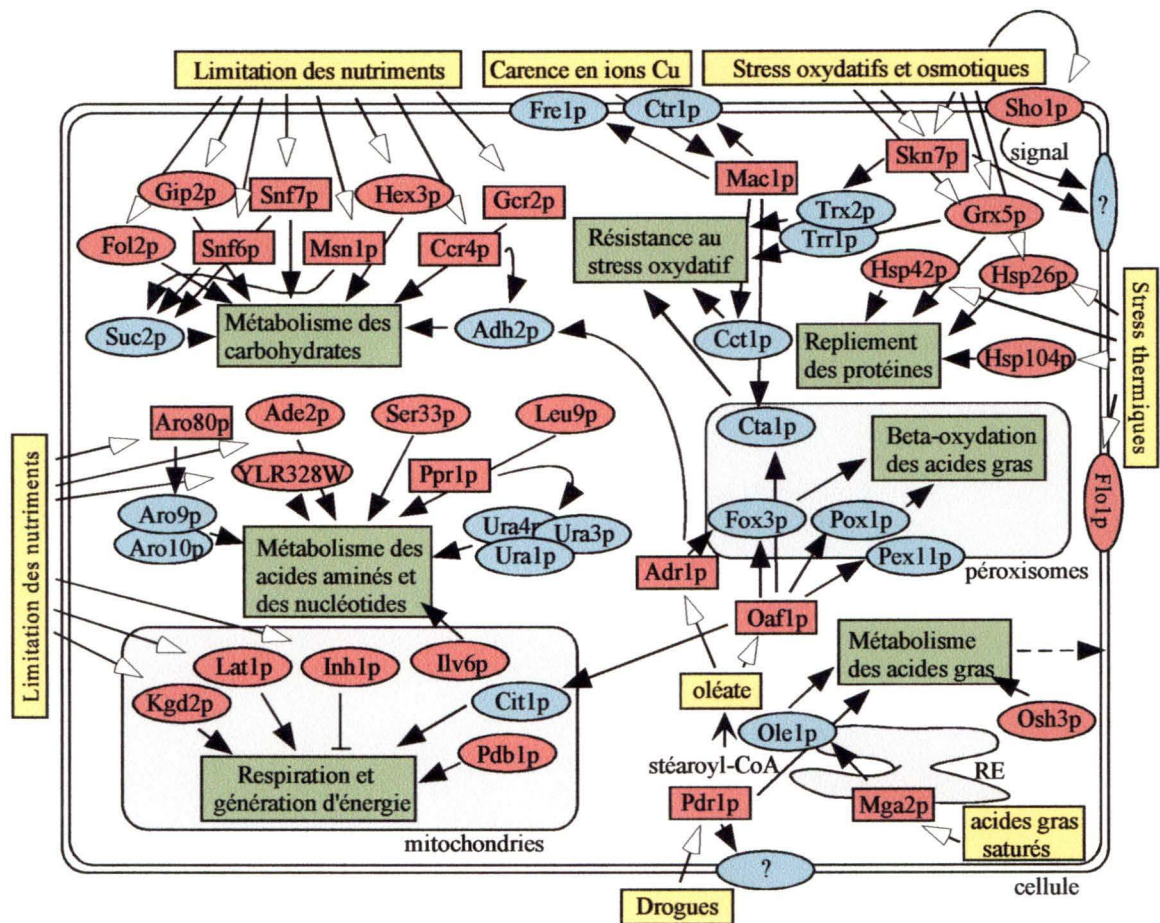


Figure 13: Schéma illustrant les liens entre les différents facteurs de transcription et protéines métaboliques impliqués dans différentes réponses aux stress. Tous les facteurs (rectangles) et autres protéines (ovales) liant Rnt1p sont en rouges. Les ovales bleus sont des protéines dont l'expression est activée par les facteurs de transcription. Les rectangles jaunes et verts indiquent les événements de stress et les voies métaboliques respectivement. Les flèches blanches indiquent quelles protéines sont induites par les événements de stress et les noires indiquent la réponse de ses protéines (par exemple activation d'une autre protéine ou activité enzymatique dans une voie quelconque).

l'importance du rôle de Rnt1p dans cet évènement, quelle sera l'importance du rôle de Rnt1p dans ces nouvelles voies où sa compagnie semble très sollicitée?

Heureusement, l'interaction de Rnt1p avec plusieurs de ces protéines coïncide avec des phénotypes observés dans les cellules $\Delta RNT1$. La délétion de *RNT1* rend les levures sensibles aux températures élevées et celles-ci ne peuvent plus que croître très lentement à une température sous-optimale de 26°C (Abou Elela et Ares, 1998). Or dans le criblage, plusieurs protéines de stress activées lors d'un choc thermique ont été repêchées. L'activité de Hsp104p pourrait par exemple faire défaut dans les mutants $\Delta RNT1$ parce que l'interaction de Rnt1p avec Hsp104p serait nécessaire à un point donné de cette voie. De plus, il a été observé chez les levures $\Delta RNT1$ que le transfert d'une culture de cellules de 26°C à 37°C entraîne rapidement la flocculation des levures qui s'aggrègent et tombent dans le fond de l'erenmeyer (donnée non-publiée). Flo1p est une protéines de la paroi impliquées dans la flocculation avec laquelle Rnt1p interagirait selon le système double-hybrides. En l'absence de Rn1tp, il semblerait que la flocculation soit activée ou non-inhibée permettant la précipitation massive des levures lorsque exposées à des températures élevées.

Autre phénomène remarqué dans les cellules délétées de Rnt1p possédant une mutation dans le gène *LEU2*; alors qu'habituellement, l'ajout d'un plasmide contenant le gène marqueur *LEU2* devrait compléter le phénotype *leu2⁻* et permettre la croissance des levures sur milieu sans *L*-leucine à 26°C, les cellules sans Rnt1p ne le peuvent toujours pas (observation non-publiée). Les levures semblent ne pouvoir croître sans leucine qu'en présence d'une Rn1tp fonctionnelle. Ainsi, si un plasmide contenant le gène *LEU2* et

exprimant Rnt1p est inséré dans ces cellules, celles-ci pourront être sélectionnées sur milieu minimal sans leucine. De plus, la présence du domaine N-terminal de Rnt1p n'est pas nécessaire pour qu'il y ait croissance, mais les deux domaines nucléase et dsRBD sont requis (Lamontagne *et al.*, 2000). L'activité de Rnt1p semble donc nécessaire dans la voie du métabolisme de la leucine. Lors du criblage, une interaction de Rnt1p avec Leu9p a été détectée. Leu9p est une α -isopropylmalate synthase II (α -IPMS II) impliquée dans la première étape de la biosynthèse de la *L*-leucine (Casalone *et al.*, 2000) en amont de Leu2p (4^{ème} étape). L'absence d'interaction de Rnt1p avec l' α -IPMS II pourrait être responsable d'un blocage de la biosynthèse de la leucine en amont de Leu2p. Le blocage de la synthèse en amont de l'étape catalysée par Leu2p expliquerait pourquoi l'insertion d'un gène *LEU2* normal dans les levures $\Delta RNT1$ ne rétablit pas la croissance sur milieu minimal. Ainsi, le blocage pourrait être confirmé en délétant le gène *RNT1* d'une souche de levures non-mutées dans le gène *LEU2* et en observant toujours l'absence de croissance sur milieu sans leucine puisqu'elles sont incapables d'en synthétiser. Cependant, Leu9p n'est responsable que de 20% de l'activité α -IPMS, Leu4p est l' α -IPMS I qui effectue 80% de l'activité. Pour bloquer la synthèse de la *L*-leucine à cette étape donc, les deux gènes doivent être délétés (*leu4 leu9*) dans la même souche. L'interaction de Rnt1p avec Leu9p doit donc affecter les deux α -IPMS pour qu'il y ait blocage complet. En plus d'interagir avec Leu9p, Rnt1p interagit avec deux autres protéines agissant en amont dans la voie de synthèse de la valine, leucine et isoleucine, soit Ilv6p, une acétolactate synthase et Pdb1p, la sous-unité β de la pyruvate deshydrogénase. La synthèse de la leucine pourrait donc requérir l'interaction de Rnt1p avec une protéine ou plus de la voie métabolique et comme la présence du domaine

nucléase est nécessaire, on peut penser que c'est l'activité ribonucléasique de Rnt1p qui est requise dans la voie.

Selon les résultats du criblage, Rnt1p formerait aussi des liaisons avec des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et la méiose. Pour la progression du cycle cellulaire, il faut que la cellule aie atteint une certaine taille, et ce serait potentiellement grâce à l'évènement de synthèse des ribosomes que cette progression serait retardée. Il pourrait donc y avoir un ou des mécanismes ou un ou des facteurs impliqués dans la biogénèse des ribosomes qui assureraient une régulation serrée entre la croissance des cellules et le cycle cellulaire pour qu'aucune division ne se fasse tant que la cellule n'est prête. La RNase III de *S. cerevisiae* pourrait être l'un de ces facteurs de régulation. Son implication dans les premières étapes du «processing» de l'ARNr, des snoRNAs et des snRNAs et la découverte de nombreuses interactions avec des protéines impliquées dans différentes voies métaboliques ou dans le cycle cellulaire, en fait une candidate idéale. De plus, ce ne serait pas la première fois qu'une RNase III serait requise dans le cycle cellulaire et la méiose (sporulation). La sur-expression de Pac1p dans la levure *S. pombe* inhibe la conjugaison et la sporulation (Xu *et al.*, 1990) peut-être en partie grâce à son inhibition de l'expression de Mei2p (Watanabe *et al.*, 1988) requise dans la transition du cycle cellulaire mitotique à la méiose, et/ou par l'intermédiaire d'un mécanisme de régulation négative de la méiose comme le fait Pat1p, dont Pac1p est un suppresseur de la mutation (Iino *et al.*, 1991). Par ailleurs, en observant les levures $\Delta RNT1$ au microscope confocal, des modifications morphologiques sont visibles. Plusieurs cellules présentent une mauvaise formation du bourgeon lors de la division cellulaire ainsi qu'une mauvaise ségrégation des chromosomes (S. Larose, comm. pers.). La mitose semble donc

visiblement affectée en absence de la RNase III de *S. cerevisiae*. L'interaction de Rnt1p avec des protéines comme Bbp1p, Bik1p, Bim1p, Boi2p, Cbf2p, Chs1p, Dsk2p, Pat1p, Spc72p et Tub4p (annexe II), toutes impliquées dans la mitose pourrait être à la base d'un mécanisme de régulation par Rnt1p via ces facteurs. Et tout comme Pac1p, quoiqu'aucune déficience en sporulation n'aie été vérifiée ou remarquée jusqu'à maintenant concernant des souches délétées en *RNT1* ou dans lesquelles la protéine est sur-exprimée, Rnt1p pourrait jouer un rôle important dans la méiose. En effet, si notre criblage double-hybrides ne ment pas, les interactions répertoriées entre Rnt1p et des protéines impliquées dans cet évènement, Bbp1p, Mum2p, Pat1p, Red1p et Spo13p, le prouveraient.

Dernièrement, une nouvelle RNase III a été isolée chez l'humain, p241 (Wu *et al.*, 2000), et celle-ci a le plus de ressemblance avec les protéines drosha de *D. melanogaster* et *C. elegans*, des ribonucléases III de classe III. L'enzyme de 160 kDa contient, en plus d'un dsRBD et de deux domaines nucléases, un domaine riche en prolines et un domaine riche en arginines et sérines, tous deux situés en N-terminal, et un domaine central similaire aux domaines N-terminaux des deux droshas. Wu et ses collègues ont démontré que p241 ne clive que l'ARNdb et serait impliquée comme Rnt1p, dans le processing de l'ARNr. De plus, son niveau d'expression ne varierait pas selon le cycle cellulaire, mais sa localisation oui: durant la phase S une fraction significative de la protéine semble être importée du noyau au nucléole (Wu *et al.*, 2000). Est-il possible que la RNase III humaine soit davantage requise dans le noyau que dans la maturation de l'ARNr au nucléole en dehors de la phase S? Or, dans le cas de Rnt1p, c'est plutôt le contraire qui est observé, après un arrêt des cellules en G₁ afin de les synchroniser, GFP-Rnt1p est présente dans le nucléole

et y reste jusqu'en phase G₂/M, où elle se déplacera au noyau durant la mitose (M. Catala, comm. pers.). Comme p241 n'est pas la seule RNase III qui aie été découverte chez l'humain, il est possible qu'une autre RNase III soit impliquée dans le processing du pré-ARNr à d'autres moment du cycle, et que p241 se soit spécialisée dans d'autres activités dans le noyau. Pendant la division cellulaire Rnt1p n'est plus requise dans le nucléole puisque que la synthèse de ribosomes s'arrête temporairement. En phase G₁, c'est la période où la levure acquièrent sa taille nécessaire avant la réplication de son ADN et sa division par bourgeonnement, la synthèse de ribosome est très importante. Cependant, d'après les résultats du criblage, il est possible que Rnt1p soit très en demande au noyau lors de la transcription et maturation de gènes impliqués dans le métabolisme des nutriments requis pour la croissance et impliqués dans la réponse au stress. On se serait donc attendu à voir aussi la ribonucléase dans le noyau pour interagir avec ses partenaires dans le stress. L'exposition des levures exprimant GFP-Rnt1p à un stress thermique de 37°C pendant 30 minutes n'a pas permis d'observer une différence dans la localisation de la protéine qui demeure toujours au nucléole. Même constatation quand les cellules sont incubées dans 6% d'éthanol (M. Catala, comm. pers. résultats préliminaires). Il ne semble donc pas facile de détecter la présence de Rnt1p en dehors du nucléole. Cependant, comme la localisation de Rnt1p est nucléaire durant la phase G₂/M (M. Catala, comm. pers.), elle pourrait donc interagir avec les protéines nucléaires durant cette phase du cycle cellulaire.

Il n'est probablement pas si étonnant que ça qu'on trouve autant de partenaires protéiques à Rnt1p si l'on se souvient de ce qui a déjà été observé concernant la RNase III de *E. coli*. L'absence de la RNase III dans la bactérie a des effets sur l'expression de plusieurs

protéines. D'après une analyse sur gel du protéome de *E. coli*, environ 10% des protéines détectées sont, soit sur-exprimées, soit sous-exprimées, dans la souche mutante *rnc105* (Gitelman et Apirion, 1980, Takata *et al.*, 1987). On peut penser que cette variation des protéines est indirectement dûe à la RNase III car en absence de celle-ci, l'ARNr n'est pas mûr correctement ce qui fait diminuer le nombre de ribosomes fonctionnels. Mais comme la RNase III bactérienne affecte aussi la stabilité d'un petit groupe d'ARNm, il est fort probable que la ribonucléase exerce également un effet direct sur l'expression de certaines protéines. D'ailleurs dans une souche déficiente en RNase III, une altération dans le métabolisme des ARNm a déjà été observée précédemment (Talkad *et al.*, 1978). C'est grâce au clivage d'une structure en épingle double-brins présente dans l'ARNm que la RNase III peut soit initier la dégradation de l'ARNm cible, résultant en moins de protéines exprimées, ou dans d'autres cas permettre ainsi la traduction de l'ARNm qui était bloquée par la présence de la structure secondaire. L'expression de certaines protéines peut donc être positivement ou négativement régulée par une activité ribonucléasique dans la cellule à différentes périodes de sa croissance. Pour Rnt1p, l'interaction avec certaines protéines pourrait avoir la même fonction potentielle de régulation globale de l'expression de gènes que chez *E. coli*. Si jusqu'à maintenant aucun ARNm n'a été découvert comme substrat, cela n'exclue pas la possibilité que Rnt1p soit impliquée dans la stabilité d'ARNm.

Nous avons pensé que l'association de Rnt1p avec des facteurs de transcription pourrait être une façon de recruter la RNase pour qu'elle procède à un clivage de l'ARNm transcrit par le facteur. Cela permettrait par exemple, la maturation de l'ARNm immédiatement après sa synthèse pour faciliter sa traduction de façon coordonnée. Ou encore, initier la

dégradation de l'ARNm lorsque toute expression de la protéine doit être éliminée suite à un changement de conditions de croissance. Des expériences ont été tentées afin de vérifier le niveau d'expression de gènes transcrits par l'un des facteurs de transcription, Mac1p. Aucun résultat concluant n'a été obtenu pour les expériences de northern blot dans lesquelles les ARN totaux des cellules *RNT1* et des cellules *rnt1⁻* ont été hybridés avec une sonde oligo pour les ARNm de *CTR1* et *CTR3* (gènes activés par Mac1p) et *MAC1*. De plus, les expériences d'extension d'amorces pour *CTR1* et *MAC1* n'ont pas été plus fructueuses et n'ont donc pas permis l'identification d'une différence dans la maturation du pré-ARNm en 5' de partie codante en présence ou absence de Rnt1p. Ces expériences auraient besoin d'être répétées en utilisant d'autres sondes et amorces, et le test de protection à la RNase pourrait aussi être utilisé pour vérifier s'il y a processing en 3' de l'ARNm. Cependant, un rôle pour Rnt1p dans la maturation des ARNm est peut probable car la maturation en 3' de tous les ARNm est réalisé par le complexe de polyadénylation (Chen et Moore, 1992, Dichtl et Keller, 2001, Gross et Moore, 2001) et en 5' par le complexe du «capping» (Itoh *et al.*, 1987). Par ailleurs, si le rôle de Rnt1p est d'initier la dégradation de l'ARNm en exposant celui-ci aux exonucléases après clivage d'une structure double-brins terminale, il se peut qu'on ne puisse pas détecter cette espèce d'ARNm clivé dans les cellules *RNT1* parce qu'il a déjà été dégradé. Dans ce cas-là, l'observation d'une différence dans la taille de l'ARNm ne pourrait être faite que si l'activité exonucléasique était éliminée de la cellule. Une dernière expérience qui a été faite pour trouver l'effet de Rnt1p avec Mac1p a été de comparer la croissance des deux souches *rnt1⁻* ($\Delta RNT1$) et *mac1⁻* (SLY12) dans des milieux qui affectent les *mac1⁻*. La croissance des levures délétées en *MAC1* suit une courbe normale lorsque cultivées en présence de dextrose. Mais, si l'on transfère ces cellules dans un milieu ne contenant que

de l'éthanol ou avec du glycérol comme seules sources de carbone, la croissance est complètement arrêtée. Par contre si dans ce même milieu de culture un excès d'ions Cu^{2+} est ajouté, après une certaine période de latence, les cellules *mac1⁻* recommencent à croître et atteignent même la phase stationnaire à une densité plus élevée. Mac1p est un facteur de transcription sensible au niveau de Cu intracellulaire qui va activer la transcription de gènes de protéines membranaires impliquées dans la réduction du Cu^{2+} en Cu^{1+} à la surface (Fre1p) et dans le transport du Cu^{1+} dans la cellule (Ctr1p et Ctr3p) lorsque le niveau de Cu est faible. Une fois à l'intérieur les protéines chaperones acheminent le Cu^{1+} aux différentes composantes qui le requiert. Le Cu^{1+} est entre autres, nécessaire à la cytochrome c oxydase impliquée dans la phosphorylation oxydative. Sans Cu, l'enzyme n'est pas fonctionnelle et aucune respiration n'est possible. C'est ce qui explique pourquoi en absence de Mac1p les cellules ne peuvent pas croître sur des milieux non-fermentables. Dans les cellules délétées en *MAC1*, Ctr1p et Ctr3p ne sont pas exprimées, il n'y a donc aucun Cu environnemental entrant dans la cellule. Tant que les cellules sont dans des milieux où elles peuvent fermentées plutôt que de respirer, la croissance sera à peu près normale. Par contre, la croissance des levures sur une source de carbone qui les force à respirer plutôt que de fermenter, comme de l'éthanol ou du glycérol, est compromise par l'absence d'activité de la cytochrome c oxydase. L'ajout d'un excès de Cu^{2+} dans le milieu de culture permet aux cellules *mac1⁻* de survivre sur éthanol malgré l'absence des transporteurs trans-membranaires parce qu'un peu de Cu réussira à faire son chemin jusqu'à l'intérieur de la cellule lorsqu'elle celle-ci commencera à vieillir. L'observation du même phénotype pour les levures *rnt1⁻* (*MAC1*) pourrait signifier que Rnt1p interagit avec Mac1p afin de le réguler positivement ou réguler positivement l'expression des transporteurs Ctr1p et Ctr3p peut-être via la

maturation de leur ARNm. Or, lorsque les levures $\Delta RNT1$ ont été cultivées sur éthanol, celles-ci pouvaient encore croître quoique avec un ralentissement plus prononcé que les levures $RNT1$. Ce ralentissement ne semble pas être dû au manque de Cu à l'intérieur de la cellule car l'ajout d'un excès de Cu ne vient pas réparer l'allure de la courbe de croissance sur éthanol (le temps de doublement calculé est même plus long en excès de Cu). Donc le rôle de Rnt1p vis-à-vis de Mac1p pourrait plutôt être l'inverse, c'est-à-dire contribuer à la répression de l'entrée du Cu dans la cellule, par exemple lorsqu'un niveau toxique de Cu dans l'environnement est atteint. Cela pourrait être en participant à la dégradation de l'ARNm de Mac1p dont la protéine est rapidement dégradée en excès ($>10 \mu\text{M}$) de Cu ou encore des ARNm des transporteurs et réductases. Dans ce cas-là, l'effet de Rnt1p dans le maintien de l'homéostasie en Cu dans la cellule serait plus subtil et pourrait être difficilement observable par simple croissance sur des milieux en excès de Cu.

Pour ce qui est du ralentissement de la croissance des cellules $\Delta RNT1$ sur éthanol, cela pourrait être dû à d'autres facteurs que Mac1p. Selon le criblage, Rnt1p interagirait aussi avec Adr1p et Ccr4p, deux régulateurs transcriptionnels de l'expression du gène de l'alcool déshydrogénase, Adh2p. Or, des expériences préliminaires ont révélées que l'ajout de 6% d'éthanol dans une culture de levures $\Delta RNT1$ exprimant GFP-Rnt1p résulte en un signal de fluorescence environ 2 fois plus élevé après 30 minutes d'incubation (M. Catala, comm. pers.). La localisation de GFP-Rnt1p était toujours au nucléole, mais Rnt1p serait davantage exprimée lors de ce stress éthylique. Est ce que les levures ont besoin de plus d'activité de Rnt1p pendant ce genre de stress afin de pallier au manque d'ARNm mature pour l'Adh2p? Ou, étant donné la localisation nucléolaire, la cellule a-t-

elle besoin de produire plus de ribosomes? Davantage d'expériences devront être réalisées.

La fonction de l'interaction de Rnt1p avec des facteurs de transcription n'a pas été élucidée encore, mais celle-ci pourrait être conservée pour les RNases III de d'autres espèces. Un criblage double-hybrides d'une banque de cDNA humains a été réalisé avec le facteur de transcription oncogène humain Sp1 impliqué dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes dans différents tissus et cellules (Gunther *et al.*, 2000). Parmi les 28 protéines ou ORFs différents identifiés pour l'interaction avec Sp1, l'un des ORFs code pour p241, l'homologue humaine de la RNase III. L'interaction de celle-ci avec Sp1 a été confirmée par précipitation de la protéine synthétisée *in vitro* à partir du cDNA et marquée radioactivement avec GST-Sp1 (Gunther *et al.*, 2000).

Pour les protéines d'une même classe, il est possible que la découverte du comment et du pourquoi Rnt1p s'associe avec l'une d'entre elles, permette de comprendre ce qui se passe avec tous les autres membres du groupe. Il sera intéressant de voir si la RNase III exercera aussi une activité de ribonucléase dans les nouvelles voies et si oui quel en sera le substrat ARN.

Mais peut-être qu'au lieu de se demander qu'est-ce que l'interaction de la RNase III a à faire avec un facteur de transcription, on devrait se demander qu'est-ce que la liaison du facteur à Rnt1p a pour effet sur l'activité de l'enzyme. Une première expérience, assez simple à faire, qui peut nous donner un élément de réponse est de déterminer à quelle partie de Rnt1p les protéines se lient. La liaison d'une protéine au domaine d'activité

nucléase pourrait jouer un rôle d'inhibition de l'activité de Rnt1p, alors que la liaison d'une autre au dsRBD pourrait venir empêcher son interaction avec l'ARNdb. Le site de liaison des 3 facteurs de transcription dans Rnt1p a été scruté par système double-hybrides avec toutes les délétions de Rnt1p. Mac1p, Snf6p et Mga2p se sont tous révélés à interagir fortement avec le domaine dsRBD de Rnt1p, et ne pas lier le domaine N-terminal. Par ailleurs, un tout petit fragment d'à peine 43 acides aminés en C-terminal de Rnt1p est suffisant pour assumer l'interaction avec chacun des 3 facteurs, alors qu'un autre fragment incluant tout le dsRBD mais se terminant à 21 acides aminés de la fin de la protéine n'interagit pas (tableau 8). Cela suggère que la région située en dehors du dsRBD consensus des RNases III pourrait servir de domaine de liaison pour des protéines. Il est donc possible que les 30 acides aminés constituant une extension à la fin du dsRBD présent chez *S. cerevisiae* et non chez la RNase III de *E. coli* soit un nouveau domaine (qu'on appellera C30) nécessaire chez les eucaryotes pour réguler l'activité de la RNase. D'autres protéines, Ade2p, Kgd2p, YCR087c-A et YGR268c appartenant à différentes classes de candidats ont aussi montrés qu'ils pouvaient interagir spécifiquement avec le DS1 mais n'ont pas été testées avec DS4 (tableau 4). Ce domaine d'interaction (C30) pourrait donc ne pas être restreint aux facteurs de transcription et être un site général d'interaction. Finalement, les protéines liant Rnt1p ne semblent pas être à prime abord des répresseurs de la ribonucléase puisqu'il y aurait eu un moyen plus simple d'inhiber son activité en se fixant à son site actif ou à son site de liaison à l'ARN, ce qui n'est pas le cas (en supposant que la liaison au domaine C30 n'empêche pas la liaison de Rnt1p à l'ARNdb). La figure 14 est un modèle représentant les différents effets possibles de la liaison d'une protéine X à Rnt1p. La protéine X pourrait effectuer le recrutement de Rnt1p pour la mettre en contact avec son substrat. Par exemple, les facteurs de

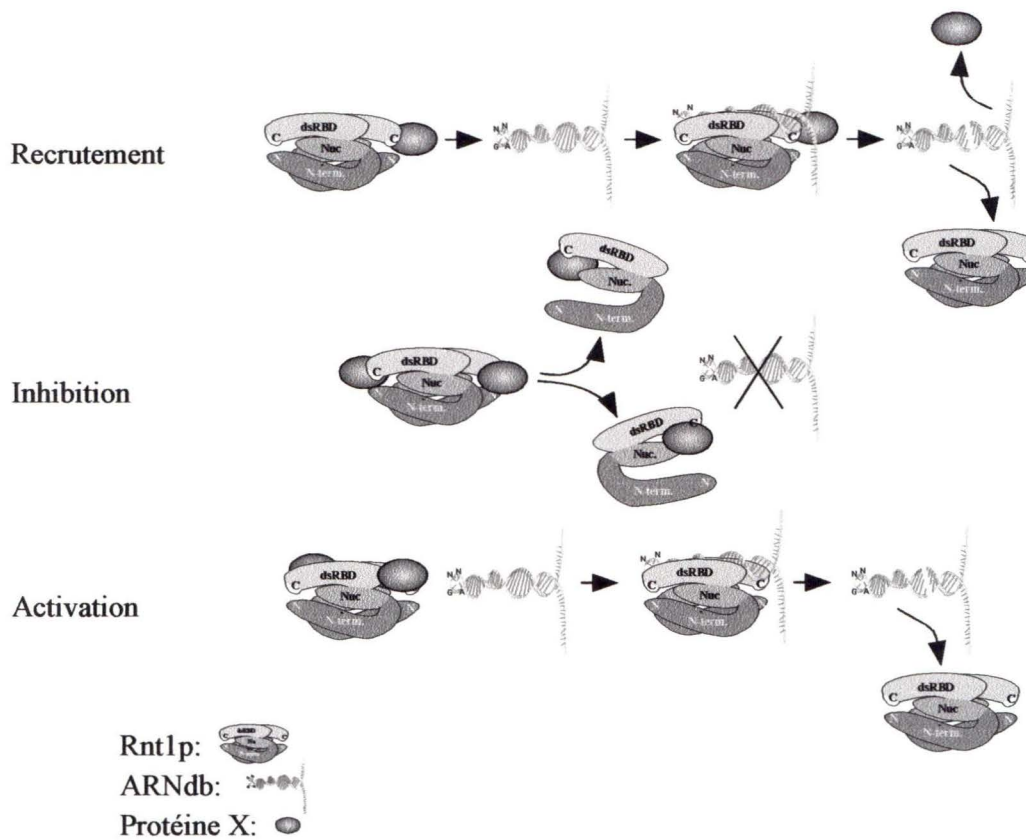


Figure 14: Modèle représentant les effets possibles de la liaison d'une protéine X à Rnt1p. Il pourrait y avoir recrutement de Rnt1p par la protéine X à son substrat, ou inhibition de l'activité de Rnt1p par la liaison de la protéine X en l'empêchant par exemple de dimériser et de se lier à l'ARNdb ou encore activation de Rnt1p par la protéine X en favorisant le changement de sa conformation pour son positionnement sur l'ARNdb et son clivage.

transcription pourraient recruter la RNase pour qu'elle effectue la maturation d'un ARNm transcrit ou au contraire pour qu'elle initie la dégradation d'un ARNm à éliminer. Autre suggestion; l'activation de Rnt1p par la protéine X. Ce pourrait être, par exemple la liaison d'une phosphatase qui phosphorylera l'enzyme afin de l'activer, ou une autre protéine qui par sa liaison à Rnt1p modifiera sa conformation pour faciliter son interaction avec l'ARNdb. Le modèle propose aussi la liaison d'une protéine X à Rnt1p pour l'inhibition de son activité: Une facteur viral ou cellulaire pourrait se lier au dsRBD ou au domaine d'activité nucléase de Rnt1p pour inhiber le processing de l'ARNr par exemple. Une protéine de stress pourrait être intéressée à ralentir temporairement la biogénèse des ribosomes de cette façon. De plus, on pourrait ajouter les protéines qui vont interagir Rnt1p en tant que chaperones afin d'aider le repliement de la protéine après sa synthèse. Ou, une protéine X pourrait interagir avec Rnt1p pour la transporter au noyau. Ou une autre, s'associer transitoirement à Rnt1p dans la transduction d'un signal. Et finalement, d'après des candidats repêchés, on pourrait aussi découvrir qu'un facteur du cycle cellulaire se lie à la RNase III afin de synchroniser deux évènements comme l'arrêt du cycle cellulaire et la maturation de l'ARNr. Ce ne sont là que des possibilités mais, que de belles possibilités!

Finalement, depuis le criblage spécifique décrit ici avec Rnt1p comme appât, plusieurs groupes ont utilisé différentes stratégies applicables à grande échelle pour déterminer l'ensemble des protéines du protéôme de la levure *S. cerevisiae* qui interagissent entre elles (certains utilisant même le terme interactôme). Ce sont-ils servi de Rnt1p comme appât, ou l'ont-elle repêchée? Ainsi, le système double-hybrides a été simplifié pour pouvoir être appliqué au criblage d'interactions physiques à la grandeur du protéôme.

Uetz *et al.* (2000) ont utilisé deux méthodes de criblages. Dans l'une, un étalage («array») d'environ 6000 transformants exprimant une protéine fusionnée au AD de Gal4p a été construit et testé avec 192 levures exprimant une protéine fusionnée à la partie BD de Gal4p. Les levures étant de «mating type» opposés, le test double-hybrides a été fait par croisement des deux souches de levures et sélection pour l'activation des gènes rapporteurs. L'autre méthode utilisait deux banques de levures exprimant chacune 5345 protéines différentes fusionnées à AD ou BD de Gal4p. Les deux banques de levures ont été croisées («mating») dans des plateaux de 96 puits et les cellules diploïdes ont été testées sur milieu minimal pour les interactions. Avec la première technique, 281 paires de protéines interagissant ensemble ont été découvertes alors que 692 interactions entre 817 ORFs ont été identifiées avec la seconde. Malheureusement, Rnt1p n'a jamais été utilisé en tant qu'appât et n'a pas été repêchée comme partenaire par d'autres protéines dans ces expériences. L'absence de Rnt1p du criblage s'explique pour nous, par le fait que la construction AD/Rnt1p n'est pas fonctionnelle pour activer la transcription des gènes rapporteurs (voir chapitre 1). Les interactions avec AD/Rnt1p peuvent donc difficilement être détectées. Ito et ses collègues ont utilisé le même genre de technique «high-throughput» que la deuxième méthode de Uetz (Ito *et al.*, 2000, Ito *et al.*, 2001) mais semblent avoir eu plus de succès. Pour leur part, ces derniers ont enregistré 4549 interactions double-hybrides indépendantes entre 3278 protéines. Parmi celles-ci, une seule interaction impliquait Rnt1p qui a été recrutée par Srp1p. Cette interaction a de bonnes chances d'être réelle puisque la même interaction a été découverte par un autre groupe utilisant un autre type de méthode.

Ainsi, deux groupes indépendants ont utilisé une technique de co-précipitation de complexes cellulaires par l'intermédiaire d'une protéine dont un «tag» a été ajouté pour permettre sa liaison à une colonne d'affinité, combinée à une technique de spectrométrie de masse pour l'identification des protéines purifiées (Ho *et al.*, 2002 et Gavin *et al.*, 2002). Cette méthode permet de caractériser les complexes protéiques formés autour d'une seule protéine étiquetée («tagged») en plus des interactions à deux. Les interactions identifiées ainsi ne sont donc pas toujours directes et peuvent être médiées par une autre protéine liant la protéine étiquetée ou par une molécule d'acide nucléique. Ho *et al.* (2002) ont identifié Rnt1p parmi les 30 protéines co-précipitées par Srp1p. Dans ce cas-ci cependant, il est possible que l'interaction entre les deux protéines soit directe puisque la même interaction a été identifiée dans le système doubles-hybrides précédemment. Srp1p est un facteur d'importation nucléaire homologue à l'importin- α , qui reconnaît et lie le signal de localisation nucléaire des protéines et est responsable du transport de la protéine au noyau à travers les pores. Srp1p est ensuite ré-exportée dans le cytoplasme grâce à Cse1p et Nup2p où elle peut recommencer son manège. Comme Rnt1p possède un signal de localisation nucléaire et qu'elle doit être importée au noyau après sa synthèse, c'est donc probablement Srp1p qui est son transporteur. Parmi les 30 protéines co-précipitées avec Srp1p, on compte plusieurs protéines impliquées dans le transport telles que Nup1p, Nup2p, Nup60p, ainsi que Kap95p et d'autres protéines impliquées dans la maturation de l'ARN ribosomal comme Rnt1p: Dis3p, Reb1p, Rlr1p, Rrp4p, Rrp6p et Rrp43p (Ho *et al.*, 2002). Il y a donc de nombreux facteurs nucléolaires qui utilisent la même porte d'entrée que Rnt1p. Gavin *et al.* (2002) n'ont quant à eux récolté aucune association incluant Rnt1p et ne l'ont pas utilisée non plus comme protéine étiquetée pour la co-précipitation.

Chapitre 3

Caractérisation de la fonction de l'interaction entre Rnt1p et Gar1p.

Matériel et méthodes:

Génotypes des souches de levures et bactéries

Escherichia coli DH5 α : F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *endA1 recA1 hsdR17* (r_K⁻m_K⁺) *deoR thi-1 phoA supE44 λ gyrA96 relA1*

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS: F⁻, *ompT, hsdS_B (r_B-r_B⁻), dcm, gal, (DE3), pLysS, Cm^r* (Promega Corp., Madison, WI)

Saccharomyces cerevisiae Δ RNT1: *MATa α ; ura3-1/ura3-1; trp1 Δ /trp1 Δ ; ade2-1/ade2-1; leu2-3,112/leu2-3,112; his3-11,15/his3-11,15 rnt1 Δ ::TRP1* (Chanfreau *et al.*, 1998)

Saccharomyces cerevisiae Δ GAR1: *MATa α ; ura3-1/ura3-1; trp1 Δ /trp1 Δ ; ade2-1/ade2-1; leu2-3,112/leu2-3,112; his3-11,15/his3-11,15 gar1 Δ ::HIS3*

Saccharomyces cerevisiae W303: *MATa α ; ura3-1/ura3-1; trp1 Δ /trp1 Δ ; ade2-1/ade2-1; leu2-3,112/leu2-3,112; his3-11,15/his3-11,15*

Saccharomyces cerevisiae PJ69-4a: *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 (LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ)* (James *et al.*, 1996)

Construction des plasmides et mutations dans Rnt1p:

GAR1 (a.a. 1-205) a été cloné par amplification par PCR avec les oligos 5'-TAATGAGTTTCAGAGG-3' et 5'-CTAGCTAGATTATCTTC-3' à partir d'ADN génomique de levures et clonage du produit dans le site SmaI du vecteur pUNI15 (Liu *et al.*, 1998, 2000) pour donner pUNI-Gar1p. Le gène complet de Gar1p a été cloné en fusion avec le domaine d'activation de Gal4p par transfert du fragment EcoRI-XhoI de pUNI-Gar1p dans le vecteur pACT2 (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA). Le plasmide

d'expression de GST-Gar1p pour les bactéries a été généré par recombinaison site-spécifique (*cre-lox*) avec le vecteur pHB2-GST (Liu *et al.*, 1998, 2000). Le plasmide d'expression dans les levures de 6xHis-Gar1p a été réalisé par amplification de GAR1 à partir de pUNI-Gar1p avec les oligos 5'-TAATGAGTTTCAGAGG-3' et 5'-CTAATGG-TGGTGATGATGATGTCTTCTACCTCCTC-3' introduisant un tag 6xHis en 3' de Gar1p, et clonage du produit dans le site EcoRV du vecteur pCu423 et le site SmaI du vecteur pCu416 (Labbé et Thiele, 1999). Le plasmide pCBF5-BFG pour l'expression de HA-Cbf5p dans les levures a été décrit (Zebarjadian *et al.*, 1999). La construction de BD/Rnt1p et AD/Rnt1p et ses délétions a été décrite au chapitre 1. BD/Rnt1p-ST a été construit par amplification par PCR de Rnt1p à partir de BD/Rnt1p avec les oligos 5'-CAAGCTTTTGGATCCAATGGGCTC-3' et 5'-GGCTTAAAAATCTAAC-3', ce dernier servant à introduire un codon stop après l'acide aminé Y441 de Rnt1p. Le fragment de PCR a été réinséré dans le site SmaI du vecteur pGBDU (James *et al.*, 1996). Le plasmide BD/K463-M a été obtenu par transfert d'un fragment AgeI-BglIII de AD/RNT1 modifié par mutagenèse aléatoire (Cadwell et Joyce, 1992), dans le plasmide BD/RNT1 digéré avec AgeI et BglIII. Tous les autres mutants ont été obtenus en utilisant une méthode de double PCR décrite ici (Good et Nazar, 1992). Plus spécifiquement, pour BD/AA446-EE, l'oligo 5'-AAACAAAGAGAAGAAATTCCTAG-3' a été utilisé pour le premier PCR avec un oligo hybridant avec la partie en 3' de RNT1 dans BD/RNT1 et le second PCR a été réalisé avec le premier PCR purifié comme oligo et un oligo hybridant en 5' de RNT1 dans BD/RNT1. Le produit final a été digéré avec PvuI et Sall et cloné dans les sites PvuI et Sall de BD/RNT1. Pour BD/AA427-EE et BD/K421-A, exactement la même stratégie a été utilisée mais avec les oligos: 5'-ATTAGGGAG-GAAGAAAATG-3' et 5'-AGAAATATCGCAATTGCGG-3' respectivement. Concer-

nant BD/K463-A, K464-A, c'est l'oligo 5'-CAAAAGAATGCGGCAAGAAAATT-3' qui a été utilisé pour insérer les mutations à partir de BD/DS1 lors du premier PCR avec un oligo en hybridant en 3' du vecteur. Lors du deuxième PCR, BD/DS1 a encore été utilisé comme ADN «template» avec l'oligo 5'GTTGCCCTCGAGAAGACG-3' et le premier PCR purifié pour l'amplification. Le clonage dans BD/Rnt1p s'est fait en utilisant les sites AgeI et BglII du PCR et du plasmide.

Construction d'une souche de levures $\Delta GARI$

Des levures W303 contenant le vecteur pCu416-6xHis-GAR1 ont été transformées avec 5 µg de produit de PCR purifié où le gène *HIS3* de pCu423 a été amplifié grâce aux oligos suivants: 5'-CACCTTTTCGATAGAGTATCTGATTGCTCTCTTCTCTTGGCCTCCTCCTCTAG-3' et 5'-CGTTAGACGTGCTTCGGCAGATATAGTAAGTTGGATCGTTCAGAATGACACG-3' incluant chacun 35 nucléotides d'homologie avec la partie 5' ou 3' du gène *GARI*. L'évènement de «gap repair» a été sélectionné sur milieu SCD-ura-his. Les colonies ont été répliquées sur pétris contenant du 5-FOA obligeant la levure à rejeter le plasmide pCu416-6xHis-GAR1 pour permettre d'identifier les colonies dont la délétion de *GARI* est réelle (absence de croissance sur 5-FOA car *GARI* est essentiel). Cette souche $\Delta GARI$ a servie à tester par complémententation la fonctionnalité des protéines Gar1p clonées par PCR dans les différents vecteurs de levures.

Test d'interaction de AD/Gar1p et AD/Mga2p avec les délétions et mutants de BD/Rnt1p

Les tests d'interaction dans le système double-hybrides ont été réalisés tels qu'au chapitre 1 (voir section matériel et méthodes). Les PJ69-4a ont été transformées avec AD/Gar1p

(a.a. 1-205 et 22-205) et toutes les délétions de Rnt1p fusionnées à BD de Gal4p et testées pour l'activation des 3 gènes rapporteurs (figure 15). Ensuite AD/Gar1p (1-205), AD/Mga2p (691-1113), AD/NT2 (1-191), AD/ Δ NT2 (188-471) et AD/NT1 (1-116) ont été co-transformés avec chacun des mutants BD/Rnt1p et testés également dans le système double-hybrides pour l'activation des gènes rapporteurs (figure 21, tableau 9). Les tests de β -gal en liquide avec ONPG ont été réalisés en triplicatas.

Test de complémentation des Δ RNT1 par les mutants et courbes de croissance

Chaque BD/Rnt1p muté a été testé pour sa capacité à compléter le phénotype de sensibilité aux températures élevées par transformation des Δ RNT1 (voir matériel et méthodes, chapitre 1, pour les détails). Tous ont été testés à 26°C, 30°C et 37°C pour la croissance sur pétris SCD-ura. Pour le measurement du temps de doublement de chacun, les transformants ont été inoculés en culture liquide contenant 25-50 mL SCD-ura et incubés à 26°C avec agitation à 200 rpm jusqu'en phase stationnaire (50 heures). Des aliquots de 1 mL ont été prélevés à intervalles réguliers pour en mesurer l'absorbance à 600 nm. Les temps de doublement ont été mesurés à partir de la phase logarithmique des courbes de croissance.

Purification de GST-Gar1p

La purification de 6xHis-Rnt1p et 6xHis-dsRBD par B. Lamontagne a été décrite (Lamontagne *et al.*, 2000 et Lamontagne et Abou Elela, 2001). Pour l'expression de la protéine recombinante GST-Gar1p, les cellules *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Promega Corp. Madison, WI) ont été transformées avec le plasmide pHB2-GST-Gar1p. Les bactéries ont

été cultivées dans un volume de 500 mL de LB avec 60 µg/mL ampicillin et 30 µg/mL kanamycin avec agitation à 30°C pour 12 heures, suivie d'une induction de l'expression de GST-Gar1p avec 0.1mM IPTG à 30°C pour 3 heures. Les bactéries ont été centrifugées à 4500 rpm, 12 minutes et lavées dans 10 mL PBSE 1X (300 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM NaH₂PO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 20 mM EDTA) froid, et resuspendues dans 2.5 mL PBSE 1X avec 1X inhibiteurs de protéases (1X PMSF et 1X cocktail d'inhibiteurs, annexe IV) et transférées dans un tube de verre sur la glace. La lyse des cellules a été faite par deux sonications (niveau 50) de 5 minutes sur la glace. Le lysat a été transféré dans un tube de 15 mL et 1% de Triton X-100, 3 µL de β-mercaptoéthanol et 1X PMSF ont été ajoutés avant incubation à 4°C en rotation pour 10 minutes. Le lysat a été centrifugé à 13000 rpm, 45 minutes à 4°C puis le surnageant a été filtré avec un filtre seringue de 0.22 µm (ajout de 1X PMSF). Le lysat de 2.5 mL a ensuite été mélangé avec 2 mL de billes de glutathione sépharose 4B 100% lavées (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) et incubé 1 heure à 4°C en rotation. Les billes ont été décantées et lavées 4 fois dans 10 mL de PBSE 1X (avec 1X inhibiteurs). Les billes ont ensuite été incubées dans 10 mL de tampon Mg+KCl+ATP (voir Lamontagne et Abou Elela, 2001) pour 10 minutes à 4°C en rotation, décantées, lavées dans 10 mL PBSE 1X (avec 1X inhibiteurs) et ré-incubées 10 minutes. GST-Gar1p a été éluée par 3 incubations de 15 minutes avec 1 mL de tampon d'éluion glutathione (10 mM glutathione réduit dans 50 mM Tris-HCl pH 8.0) avec 20 mM EDTA, plus une dernière éluion avec 1 mL laissée toute la nuit. Chacune des fractions ont été dialysées 2-3 heures à 4°C contre 400 mL de tampon de dialyse (50% glycérol, 0.5 M KCl, 30 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA pH 8.0) puis à nouveau pour la nuit. La qualité

de la purification a été vérifiée sur gel SDS-PAGE 10% coloré au bleu de coomassie. La concentration de GST-Gar1p a été mesurée par un test de Bradford, (élution 1 = 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, élution 2 = 1.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, élution 3 = 0.78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, élution 4 = 0.95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Précipitation dans des lysats bactériens

Des fractions de 10 mL de cultures de *E. coli* BL21(DE3)pLysS avec GST-Gar1p ou GST cultivées telles que ci-haut ont été centrifugées et lavées puis congelées à -20°C pour utilisations ultérieures dans des précipitations. Deux culots de 10 mL bactéries contenant GST-Gar1p et un de GST ont été resuspendus dans 2.5 mL PBSE 1X (+ PMSF et cocktail d'inhibiteurs) et transférés dans un tube de verre sur la glace chacun. Une sonication sur la glace (niveau 50) de 5 minutes, ou jusqu'à ce qu'il y ait un changement d'opacité, a été faite. Les sonicats ont été transférés dans un tube de 13 mL chacun, et 250 μL de Triton X-100 10% et 3 μL de β -mercaptoéthanol ont été ajoutés avant incubation de 10 minutes à 4°C en rotation. Les sonicats sont ensuite centrifugés à 13 000 rpm, 20 minutes, 4°C . Les expériences de précipitation par GST-Gar1p ou GST ont été faites avec 500 μL de ces lysats (surnageant) à lesquels 20 μg de 6xHis-Rnt1p ou 6xHis-dsRBD purifiés a été ajouté. L'effet de l'ARN sur la liaison a été testé avec l'ajout de l'un des constituants avant 6xHis-Rnt1p; RNase A, ARN total des levures W303 ou ARNt de *E. coli* (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada). Les lysats ont ensuite été incubés 30 minutes à 4°C en rotation avant l'ajout de 100 μL de billes de glutathione sépharose lavées 50%, et l'incubation a été poursuivie pour 1 heure. Les lavages ont été faits avec 4 fois 1 mL de PBSE 1X (avec inhibiteurs) avec des incubations de 5 minutes. À la fin des lavages, les billes ont été resuspendues dans 40 μL de colorant pour protéine avec SDS et 10% β -

mercaptoéthanol et chauffées à 85°C, 5 minutes, puis précipitées par une centrifugation rapide. Tous les échantillons ont été migrés sur deux gels SDS-PAGE, l'un de 12.5% pour coloration au bleu de coomassie et l'autre de 10% pour transfert sur membrane de nitrocellulose (MSI, Westborough, MA).

Précipitation et immunoprécipitation des lysats de levures

Les levures W303 transformées avec pCBF5-BFG, pCU423-6xHis-Gar1p et BD/Rnt1p ont été cultivées dans un milieu SCD sans leucine, histidine, et uracil à 30°C avec agitation jusqu'à D.O.₆₀₀ de 0.450. La culture a été aliquotée pour avoir 50 D.O. par tube (environ 110 mL) et centrifugée. Les cellules sont lavées dans du glycérol 10% glacé et conservées à -20°C pour utilisation ultérieure. La même chose a été faite avec une culture de W303 sans plasmides. Pour les expériences de précipitation au Ni-NTA et immunoprécipitation, chaque culot est décongelé et lavé dans du tampon de lyse (20mM Tris pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 150 mM KOAc, 20 mM β-mercaptoéthanol, 0.5% Triton X-100, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteurs). Pour briser les levures, chaque culot est resuspendu dans 500 µL de tampon de lyse et 1.5 mL de billes de verre (lavées à l'acide) et «vortexé» 10 fois 30 secondes en alternant avec des périodes sur la glace. Le surnageant est transféré dans un tube eppendorf et les billes sont rincées avec 500 µL de tampon de lyse qui est ensuite transféré dans le tube. Le lysat de levures est centrifugé à 12000 rpm, à 4°C, 20 minutes pour enlever les débris cellulaires. Pour chaque test, 300 µL de lysat de cellules W303 et W303 avec HA-Cbf5p, 6xGis-Gar1p et BD/Rnt1p est utilisé. Pour la précipitation par 6xHis-Gar1p, 100 µL de billes 100% Ni-NTA lavées dans le tampon de lyse est ajouté au lysat, alors que pour l'immunoprécipitation avec α-

Rnt1p (anticorps produit par immunisation sous-cutanée de lapin blanc de Nouvelle Zélande [Cocalico Biologicals, Inc., Reamstown, PA]), 50 μ L de sérum de lapin immunisé ou pré-immunisation couplé à la protéine A sépharose (Amersham Bioscience, Baie d'Urfé, QC, Canada) a été utilisé. Le couplage de α -Rnt1p avec la protéine A a été fait par incubation durant 1 heure à 4°C, de 100 μ L de protéine A sépharose 50% avec 10 μ L de serum immun. dans 500 μ L de PBS 1X, puis les billes couplées à l'anticorps ont été lavées 2 fois dans 1 mL de tampon de lyse. Les lysats ont été incubés 2 heures à 4°C en rotation et ensuite lavés 4 fois avec 1 mL de tampon de lyse. Les éluions des protéines des billes de Ni-NTA a été faite avec 70 μ L de colorant pour protéines avec SDS, et pour les billes de protéine A sépharose, avec 30 μ L. Les échantillons ont été chauffés à 100°C, 5 minutes, puis centrifugés 5 minutes à 12000 rpm. Les surnageants contenant les protéines précipitées ont été migrés sur gels SDS-PAGE de 10% et transférés sur membrane de nitrocellulose (MSI, Westborough, MA) pour analyses western.

Western blot

Les western blots ont été réalisés tels que décrits (Harlow et Lane, 1988). Pour détecter 6xHis-Rnt1p et 6xHis-dsRBD dans les précipitations avec GST-Gar1p, l'anticorps polyclonal de lapin anti-His (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) a été utilisé. Pour détecter BD/Rnt1p et HA/Cbf5p dans la précipitation des extraits dans les levures par 6xHis-Gar1p sur colonne Ni-NTA, ou dans l'immunoprécipitation avec l'anticorps α -Rnt1p, l'anticorps monoclonal contre BD de Gal4p (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) ou l'anticorps monoclonal contre le tag hemagglutinine (HA) (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) ont été utilisés. Les

protéines BD/Rnt1p mutées extraites des levures Δ RNT1 ont été détectées par western blot avec l'anticorps α -Rnt1p dilué 1:15000 et Pgk1p avec anti-Pgk1p (cadeau de R. Wellinger, U. de Sherbrooke, Qc.).

Résultats:

Suite à l'obtention d'une liste exhaustive de protéines interagissant potentiellement avec Rnt1p dans le criblage double-hybrides, il devient maintenant très important de 1) vérifier si ces interactions sont vraies par d'autres tests d'interactions *in vitro* et/ou *in vivo* et 2) trouver la signification biologique de chaque interaction et son rôle dans la cellule. Pour débiter ce long processus, l'étude de l'interaction Rnt1p:Gar1p a été choisie à cause du lien fonctionnel évident qui existe déjà entre les deux protéines dans la biogénèse des ribosomes. Gar1p, une protéine essentielle de 205 acides aminés, possède deux domaines GAR riches en glycines et arginines (ou boîtes RGG), l'un en C-terminal, résidus 1 à 25 et l'autre en N-terminal, résidus 143 à 205. Elle possède aussi un domaine central entre les 2 domaines GAR contenant 2 boîtes de liaison à l'ARN (résidus 59-83 et 114-127) responsables de la liaison avec les snoRNAs H/ACA. La protéine de fusion repêchée dans le criblage, couvre les acides aminés 22 à 205 de Gar1p (figure 15A); ce qui exclue donc le premier domaine GAR. Toutefois, pour s'assurer que l'interaction protéine-protéine repérée n'est pas un artefact dû, par exemple, au mauvais repliement de AD/Gar1p tronquée, le gène complet de Gar1p a été cloné en fusion avec le domaine AD de Gal4p et re-testé pour l'interaction avec BD/Rnt1p dans le double-hybrides. De plus, les deux protéines de fusions, tronquée et complète, ont été testées avec toutes les délétions de Rnt1p construites en fusion avec BD de Gal4p (figure 15D) afin d'identifier le domaine d'interaction de Gar1p dans Rnt1p. Il fut ainsi démontré que la forme complète de AD/Gar1p interagit également avec BD/Rnt1p *in vivo* dans le système double-hybrides. Par ailleurs, AD/Gar1p n'interagit pas avec les formes tronquées de Rnt1p qui ne contiennent pas le dsRBD, telles que BD/NT2, BD/ADS1 et BD/ Δ CT

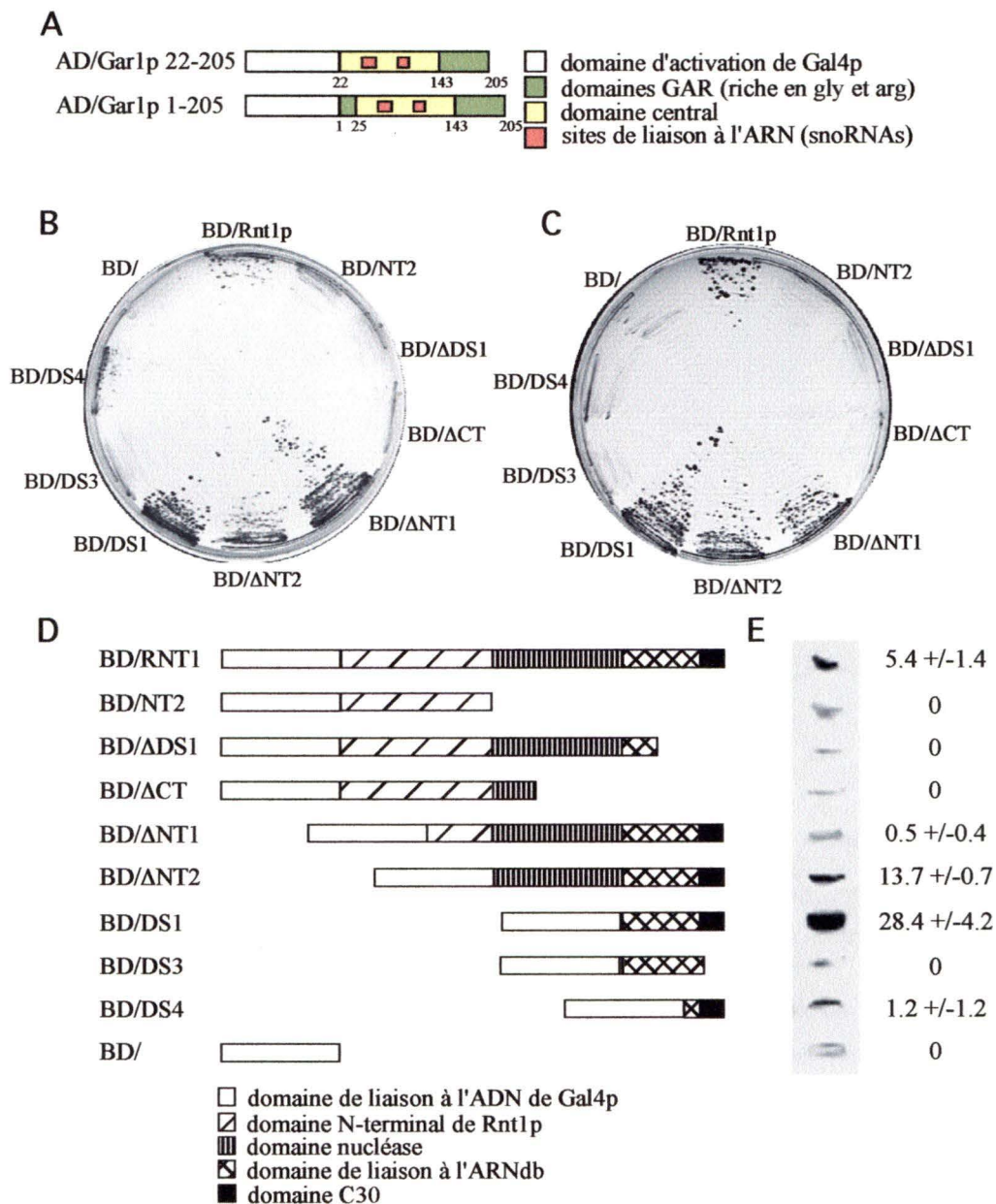


Figure 15: Rnt1p interagit avec Gar1p *in vivo*. (A) Schémas des fusions AD de Gal4p avec Gar1p; le fragment repêché dans le criblage double-hybride comprend les acides aminés 22 à 205, alors que la construction AD/Gar1p 1-205 a été clonée. Les deux constructions ont été testées pour l'activation des gènes rapporteurs *ADE2*, *HIS3* et *lacZ* avec les différentes délétions de Rnt1p fusionnées à BD de Gal4p (D) sur milieu minimal sans histidine (B) ou sans adénine (C) et dans un test de X-gal sur pétri et β -gal en liquide (E). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les deux constructions de Gar1p, ce qui est montré ici, est avec AD/Gar1p 1-205.

(absence de croissance sur SCD–his et –ade), mais active très bien l'expression des trois gènes rapporteurs, *HIS3* (fig.15B), *ADE2* (fig. 15C) et *lacZ* (fig. 15E) lorsque co-transformée avec les fragments C-terminaux BD/ Δ NT1, BD/ Δ NT2 et BD/DS1. L'interaction la plus forte est avec la construction BD/DS1, englobant tout le domaine dsRBD conservé chez les RNases III et le prolongement C-terminal de 30 acides aminés spécifique à Rnt1p, 28.4 unités de Miller ont été mesurées dans le test de la β -gal avec ONPG comparativement à 5.4 avec BD/Rnt1p. L'interruption de ce fragment après le résidu 450 dans BD/DS3, enlevant 21 résidus à BD/DS1, prévient complètement la liaison de Gar1p à Rnt1p. Alors qu'une frêle expression de gènes rapporteurs tels que *HIS3* et *lacZ* (1.2 Unités, fig. 15E) est observable pour BD/DS4 n'exprimant que les 33 derniers acides aminés de la protéine Rnt1p. Cette petite partie C-terminale de Rnt1p, au rôle inconnu, pourrait donc constituer un domaine d'interaction protéine-protéine permettant l'interaction avec Gar1p tout comme pour les 3 facteurs de transcription testés (tableau 8, chapitre 2). Cependant, certains résidus dans le domaine de liaison à l'ARNdb de Rnt1p pourraient être nécessaires pour stabiliser l'interaction avec Gar1p étant donné que la présence des deux domaines, dsRBD et C30, augmente l'expression des gènes rapporteurs du système double-hybrides.

D'autre part, cette interaction double-hybrides identifiée *in vivo* dans la levure pourrait être médiée par d'autres facteurs protéiques ou même ribonucléiques étant donné que les deux protéines possèdent un domaine de liaison à l'ARN. Afin de confirmer l'interaction physique entre Rnt1p et Gar1p par une méthode autre que le système double-hybrides, des précipitations *in vitro* ont été réalisés. Des lysats de bactéries exprimant Gar1p fusionnée

à la glutathione *S*-transférase (GST) à lesquels une Rnt1p recombinante avec un tag 6xHis purifiée a été ajoutée ont été utilisés. La figure 16 (en A) montre un gel coloré au bleu de coomassie avec dans la piste 1, un lysat de *E. coli* BL21 exprimant GST-Gar1p non-induit versus le lysat des mêmes cellules après induction avec IPTG (piste 2); on y voit très bien GST-Gar1p à environ 52 kDa. Même chose que pour les BL21 exprimant GST (piste 4). On peut aussi voir sur le gel, 6xHis-Rnt1p qui a été ajoutée en quantité équimolaire (pistes 2 et 4). Cependant, après les lavages, 6xHis-Rnt1p n'est présent que dans la fraction contenant GST-Gar1p (piste 3) et a été complètement éluée avec les autres protéines sans être retenues par GST seul (piste 5). Aucune 6xHis-Rnt1p n'est même détectable par western blot avec l'anticorps anti-His dans la précipitation avec GST (en B, piste 5) alors que sa présence est sans équivoque dans la précipitation en présence de GST-Gar1p (piste 3). La même expérience a été répétée avec 6xHis-dsRBD purifiée (en C) à la place de 6xHis-Rnt1p et le résultat est le même et tout aussi clair. L'interaction de Rnt1p avec Gar1p est donc spécifique et directe car elle ne nécessite la présence d'aucune autres protéines de *S. cerevisiae* pour faire le pont entre les deux partenaires. Cependant, pour s'assurer que des ARNs de la bactérie ne sont pas responsables de cette interaction, la précipitation de Rnt1p a aussi été faite après incubation du lysat de bactéries contenant GST-Gar1p avec 50 et 100 µg de RNase A (en D, pistes 4 et 5), et aussi avec un excès d'ARN bactériens par ajout de 10 et 20 µg d'ARNt de *E. coli* (pistes 8 et 9). Même si une baisse de la quantité de Rnt1p précipitée est observée après traitement à la RNase A, Rnt1p est toujours précipitée. Cette diminution de la quantité précipitée pourrait être due à la quantité excessive de RNase A ajoutée qui pourrait venir interférer dans l'interaction. De toute façon, l'ajout de davantage d'ARN bactérien dans le lysat ne vient pas non plus

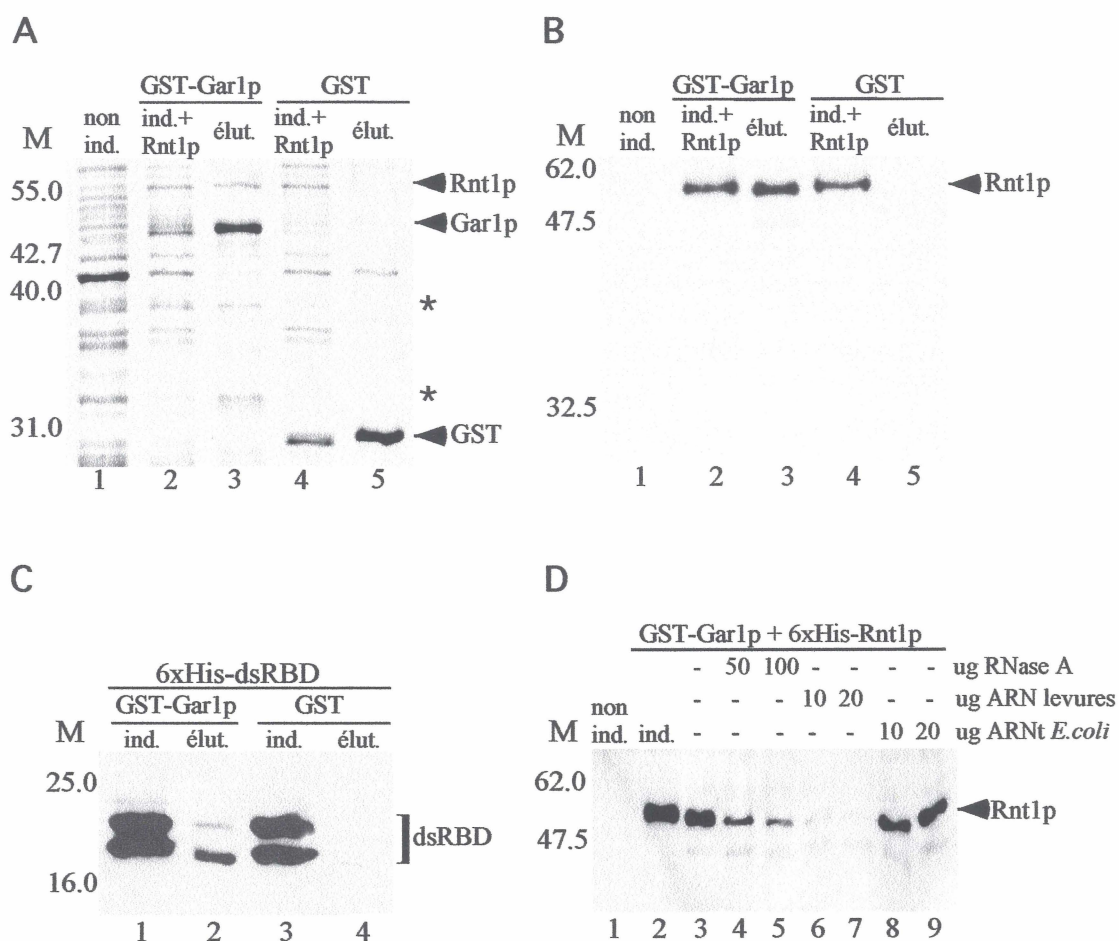


Figure 16: Rnt1p interagit spécifiquement avec Gar1p *in vitro* en absence d'autres facteurs. Des bactéries exprimant GST-Gar1p ou GST ont été lysées par sonication et une quantité équimolaire (20 μ g) de 6xHis-Rnt1p purifiée (A, B et D) ou 6xHis-dsRBD purifié (C) a été ajoutée au lysat avant purification sur colonne de glutathione sépharose. (A) SDS-PAGE montrant l'induction de l'expression de GST-Gar1p (ligne 2) et GST (ligne 4), la quantité éluee (lignes 3 et 5) ainsi que la quantité de 6xHis-Rnt1p présents dans les lysats (lignes 2 et 4) et dans les éluutions (lignes 3 et 5). Les protéines ont aussi été transférées sur une membrane de nitrocellulose et hybridées avec α -HIS pour confirmer la présence de 6xHis-Rnt1p dans l'éluat (B, C et D). (C) L'expérience en A et B a été répétée en remplaçant 6xHis-Rnt1p par 6xHis-dsRBD. (D) L'expérience en A et B a été répétée mais en incubant d'abord le lysat contenant GST-Gar1p avec soit de la RNase A (lignes 4 et 5), soit de l'ARN total de levures (lignes 6 et 7), soit de l'ARNt de *E. coli* (lignes 8 et 9) comme contrôle avant d'ajouter 6xHis-Rnt1p pour la précipitation.

faciliter la liaison de Rnt1p à GST-Gar1p. Cependant, l'addition d'un excès d'ARN total de levures, au contraire de faciliter l'interaction entre les deux protéines, empêche même la liaison entre Gar1p et Rnt1p (pistes 6 et 7), en se liant soit à Rnt1p, soit à Gar1p ou les deux. Ce n'est donc pas l'ARN non plus qui supporte l'interaction physique entre Rnt1p et Gar1p.

Maintenant que l'on sait que l'interaction entre Rnt1p et Gar1p est directe, on pourrait se demander si l'interaction Rnt1p:Gar1p est à la base d'un complexe protéique plus gros. Comme Gar1p est souvent trouvée dans un complexe de pseudouridylation comprenant Nop10p, Nhp2p et Cbf5p (Henras *et al.*, 1998, Watkins *et al.*, 1998), la présence de l'une des protéines, Cbf5p, avec les deux partenaires a été testée *in vivo* par immunoprécipitation. Les levures W303 exprimant les 3 protéines avec chacune un «tag» différent, BD/Rnt1p, HA-Cbf5p et 6xHis-Gar1p ont été lysées en conditions non-dénaturantes et ont été utilisées pour deux types de précipitations. L'une grâce au tag de Gar1p qui se lie aux billes d'une colonne de Ni-NTA et est retenu et l'autre par immunoprécipitation en utilisant l'anticorps polyclonal α -Rnt1p couplé à des billes de protéine A sépharose. Dans le cas de la précipitation par 6xHis-Gar1p (figure 17A), après lavages et élution du lysat contenant les 3 protéines recombinantes, on peut voir qu'effectivement les deux protéines, BD/Rnt1p et HA-Cbf5p ont été retenues dans la colonne par 6xHis-Gar1p. Cependant, l'immunoprécipitation avec l'anticorps α -Rnt1p ne permet pas de précipiter HA-Cbf5p, même si on peut voir que Rnt1p est en effet retenu par l'anticorps couplé à la protéine A. Malheureusement, la membrane n'a pas été hybridée avec anti-His, ce qui aurait permis de confirmer la présence de 6xHis-Gar1p

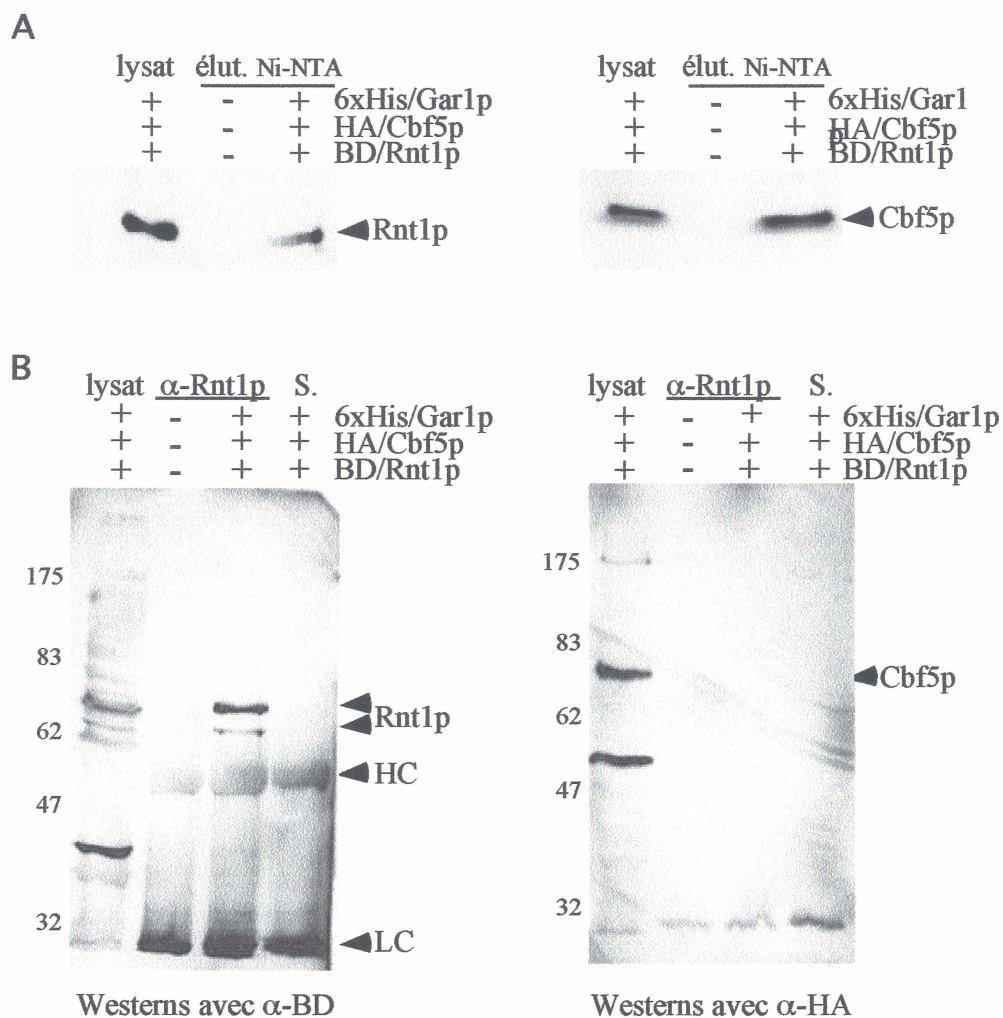


Figure 17: Gar1p interagit avec Rnt1p et/ou Cbf5p dans un extrait cellulaire, mais Rnt1p n'interagit pas avec Cbf5p. (A) Précipitation avec billes de Ni-NTA de 6xHis/Gar1p dans un extrait cellulaire de levures W303 contenant BD/Rnt1p, HA-Cbf5p et 6xHis/Gar1p. (B) Immunoprécipitation avec α -Rnt1p et billes de protéine A sepharose d'un extrait cellulaire de levures W303 contenant BD/Rnt1p, HA-Cbf5p et 6xHis-Gar1p (S. = sérum de lapin pré-immunisation comme contrôle négatif de précipitation). Le lysat cellulaire ainsi que les billes couvertes des protéines précipitées ont été resuspendus dans le colorant pour protéine et bouillis avant le chargement d'un gel SDS-PAGE de 10%. Les protéines ont été transférées sur membranes de nitrocelluloses pour être hybridées avec les anticorps α -BD et α -HA. HC et LC indiquent les chaînes lourdes et légères de l'anticorps respectivement.

avec BD/Rnt1p. Mais l'absence de Cbf5p suggère qu'il n'y a pas d'interaction directe entre la pseudouridylylase et la RNase III, et que lorsque Gar1p se lie à Rnt1p, Cbf5p n'est pas présente dans le complexe même par interaction seulement avec Gar1p. Les contrôles négatifs utilisés dans ces deux expériences, la souche W303 sans les 3 vecteurs, ne constitue pas le meilleur contrôle. Il aurait fallu plutôt utiliser pour la précipitation avec 6xHis-Gar1p, des levures W303 exprimant HA-Cbf5p et BD/Rnt1p sans 6xHis-Gar1p pour démontrer que la colonne ne retient pas l'une des deux protéines de façon non-spécifique. Alors que pour l'immunoprécipitation, seulement le vecteur exprimant BD/Rnt1p aurait dû être absent de la souche afin de démontrer que l'anticorps α -Rnt1p ne lie pas directement Cbf5p ou Gar1p. Le contrôle avec le sérum de lapin pré-immunisation montre que la précipitation de Rnt1p est spécifique à l'anticorps, et non pas due à la présence d'une protéine du lapin interagissant avec Rnt1p ou Cbf5p. De plus, il démontre que les anticorps utilisés dans le western blot (α -BD et α -HA) n'hybrident pas avec des protéines contenues dans le sérum du lapin.

Pour aider à identifier la signification biologique de l'interaction de Gar1p avec Rnt1p, il a été décidé de trouver les résidus du C30 et/ou du dsRBD nécessaires à la liaison de Gar1p. La figure 18 montre un alignement de parties C-terminales de 4 RNases III; Rnt1p, RNase III de *E. coli*, l'ORF F26 de *C. elegans*, et Pac1p de *S. pombe* avec en jaune, le motif dsRBD, et en gris, les résidus conservés de chaque protéine. Cette figure montre bien le prolongement de 6 à 33 acides aminés présent chez les 3 espèces eucaryotes. Le plus petit fragment de Rnt1p pouvant encore interagir avec Gar1p, DS4, est souligné. Les résidus en extra au dsRBD de Rnt1p ne présentent pas de motif

particulier, mais on observe plusieurs résidus chargés positivement. Des mutations dirigées ont été faites dans les deux domaines, dsRBD et C30. Des résidus connus comme étant importants pour la liaison à l'ARNdb par le dsRBD de PKR ou pour sa dimérisation ont été modifiés, afin d'une part, vérifier si ces mêmes résidus remplissent les mêmes fonctions chez Rnt1p, et d'autre part, vérifier si ceux-ci sont impliqués dans la liaison avec Gar1p. Ainsi, le résidu K421 de Rnt1p, dont son équivalent chez PKR est nécessaire pour l'interaction avec l'ARNdb, a été changé en A par PCR pour former la protéine BD/K421-A. Les deux alanines adjacentes, situées aux positions 427 et 428 de Rnt1p, seraient, chez PKR, responsables de la dimérisation des dsRBDs. Celles-ci ont donc été modifiées en résidus glutamate par mutagenèse dirigée pour former BD/AA427-EE. De plus, des mutations ont été faites dans le domaine C30, pour confirmer son rôle peut-être de domaine d'interaction avec Gar1p et d'autres protéines, et par la même occasion vérifier si celui-ci est nécessaire pour l'activité de Rnt1p. Ainsi, un codon stop a été introduit par PCR après l'acide aminé Y441, à 3 résidus de la fin du motif dsRBD conservé, générant BD/Rnt1p-ST. La présence de plusieurs résidus chargés positivement dans cette partie du dsRBD et le C30, suggérerait la possibilité d'une interaction électrostatique entre Gar1p et Rnt1p, deux résidus lysines ont donc été mutés aux positions 463 et 464, afin d'obtenir BD/K463-A, K464-A. D'ailleurs, lors d'une expérience de mutagenèse aléatoire de Rnt1p réalisée par B. Lamontagne, le résidu K463 a été modifié en M, cette mutation a donc aussi été clonée dans BD/Rnt1p pour en vérifier l'effet. Les deux derniers résidus qui ont été sélectionnés pour la mutagenèse de BD/Rnt1p sont les deux résidus A446 et A447 qui tous les deux ont été modifiés en glutamate dans BD/AA446-EE en pensant que ceux-ci pourraient aussi être impliqués dans des

interactions protéine-protéine comme pour les résidus A427 et A428. Toutes les mutations réalisées dans BD/Rnt1p sont marquées de rouge dans la figure 18.

Ces nouvelles mutations dans Rnt1p ont d'abord été testées pour leur capacité à compléter le phénotype de sensibilité aux températures élevées des Δ RNT1, une façon simple de voir si la RNase est toujours fonctionnelle. À la figure 19, un exemple de test de croissance sur pétri des Δ RNT1 transformées avec 3 des 6 mutants comparativement à BD/Rnt1p sans mutation et à BD (aucun *RNT1* dans la cellule) est présenté. À la température permissive de 26°C, des colonies sont observables pour tous les transformants, mais on voit déjà une différence dans la taille des stries pour BD et BD/Rnt1p-ST (figure 19A). À température restrictive de 37°C, la différence est nettement plus marquée, BD/Rnt1p-ST, semblable à BD, n'est pas en mesure de croître (figure 19B). L'introduction d'un stop à la fin du dsRBD rendrait donc la protéine non-fonctionnelle. Pour ce qui est de BD/K463-A, K464-A et BD/K463-M, la modification de ces résidus situés plus en aval du dsRBD, ne semble pas affecter l'activité de la RNase III. La croissance à 37°C semble normale, pareille à Rnt1p. Pour s'assurer que les protéines mutées qui ne complètent pas sont correctement exprimées dans les Δ RNT1, les protéines ont été extraites des levures et migrées sur gel SDS-PAGE pour être transférées par western blot sur membrane. L'utilisation d'un anticorps α -Rnt1p pour détecter les constructions montrent que tous les mutants sont exprimés et ont la bonne taille (figure 19C). De plus, le niveau d'expression des trois mutants est comparable à BD/Rnt1p, ce n'est donc pas le nombre de copies de Rnt1p qui en affecte la complémentation. Ces expériences ont aussi été faites pour les 3 autres mutants et les résultats sont résumés dans

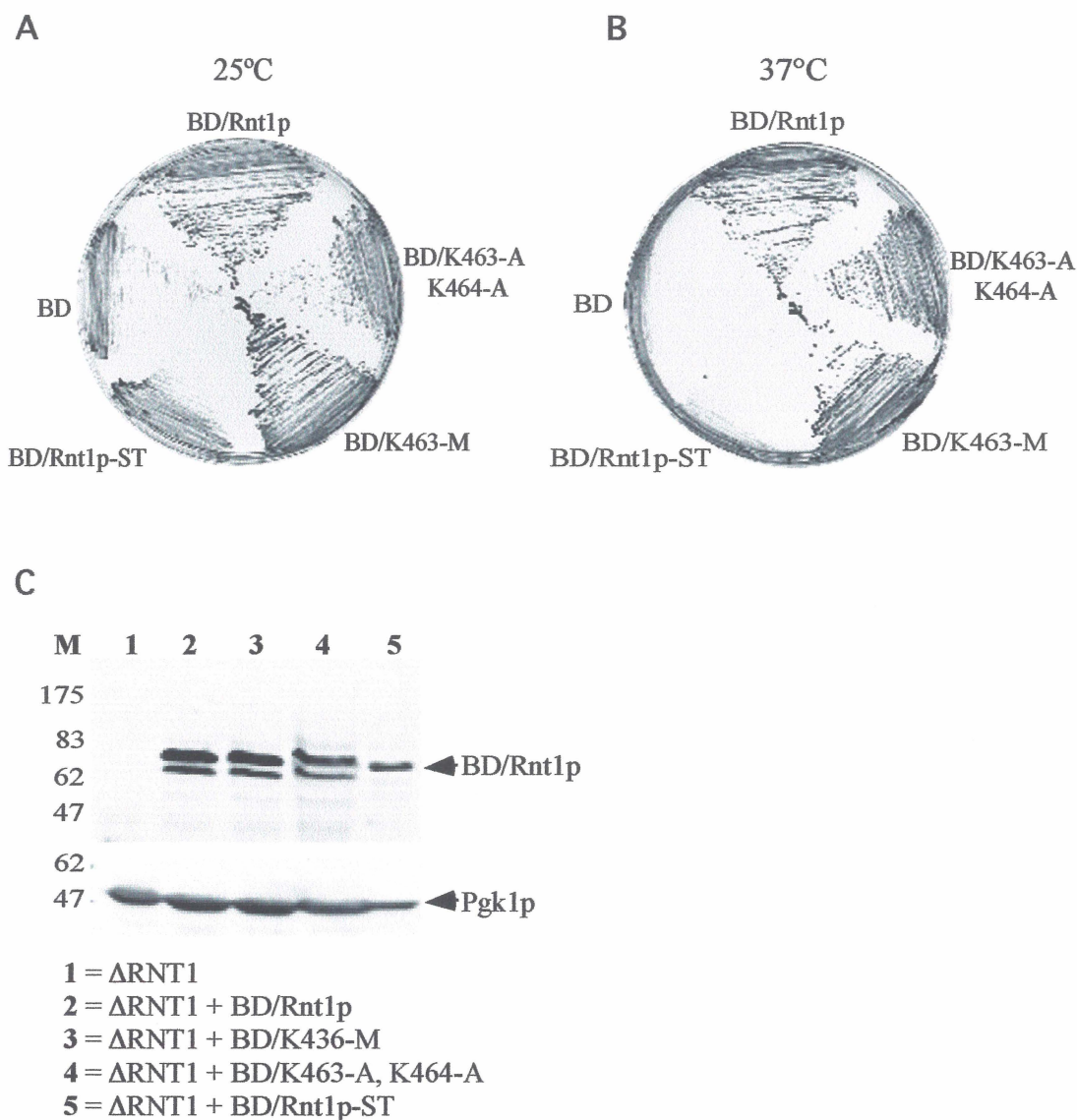
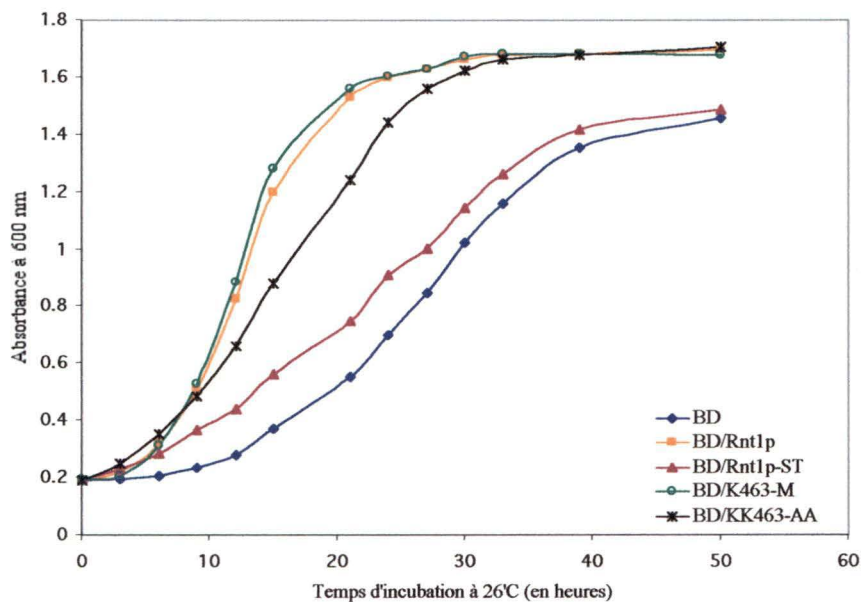


Figure 19: L'intégrité du domaine C30 de Rnt1p est importante pour la fonction de l'enzyme *in vivo*. Test de complémentation des Δ RNT1 avec les différents mutants de BD/Rnt1p dans le domaine C30; croissance sur milieu minimal sans uracil à température permissive de 26°C (A) et non-permissive de 37°C (B). (C) Western blot avec les protéines totales extraites pour les Δ RNT1 transformées avec chaque mutant. La membrane a été consécutivement hybridée avec les anticorps α -BD et α -Pgk1p.

le tableau 9. La complémentation du phénotype a été observée pour BD/K421-A, suggérant que, au contraire de PKR, la mutation de ce seul résidu lysine du dsRBD n'affecte pas la liaison de Rnt1p à son substrat *in vivo* puisque la protéine mutante est demeurée fonctionnelle. Également, le changement des A446 et A447 en E dans le C30, n'affecte pas l'activité de Rnt1p. Par contre, le changement des deux alanines du dsRBD a un effet négatif sur l'activité de l'enzyme car les levures ne peuvent survivre à température restrictive. Par western blot, ce mutant est celui qui semble avoir le plus bas niveau d'expression, mais une petite quantité devrait être suffisante pour permettre la croissance. Afin de mieux mesurer l'effet de ces mutations sur la croissance des levures, chacun des mutants a été cultivé en milieu minimal sans uracil à 26°C et des aliquots ont été prélevés à différents intervalles de temps pour mesurer la densité cellulaire de la culture. Les courbes de croissance qui en ont été déduites sont présentées à la figure 20. L'effet de l'absence de Rnt1p dans la cellule est représenté par la courbe de BD (en bleue) et l'effet de la présence d'une copie normale de *RNT1* est représentée par la courbe de BD/Rnt1p (en orange). Les mutants BD/K463M (vert en A), BD/K421-A (rouge en B) et BD/AA446-EE (noir en B) n'ont aucun effet détrimentionnel sur les levures, leurs courbes sont semblables à Rnt1p. Deux autres mutants, BD/Rnt1p-ST (en rouge en A) et BD/AA427-EE (en vert en B) affectent beaucoup la croissance des Δ RNT1 comme on peut en juger par l'allure des courbes qui ressemblent davantage à BD. Le changement des acides aminés A427-E et A428-E dans Rnt1p a même un effet négatif dominant; la transformation des levures Δ RNT1 avec ce Rnt1p mutant affecte davantage la croissance des cellules que l'absence totale de *RNT1*. Ce fait est aussi confirmé par le temps de doublement qui est de 13 heures pour BD/AA427-EE alors qu'il est de 10.25 heures pour

A



B

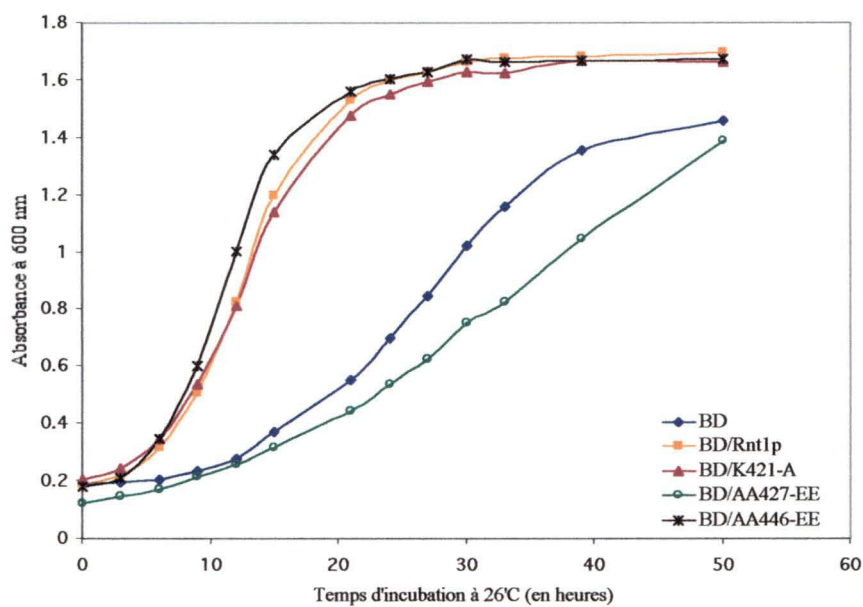


Figure 20: Courbes de croissance des différents mutants réalisés dans BD/Rnt1p. Les levures $\Delta RNT1$ ont été transformées avec les diverses constructions BD/Rnt1p mutées et ont été cultivées en milieu minimal sans uracil à 26°C durant plusieurs jours. Les mutations réalisées dans le domaine C30 (A) affectent plus ou moins l'activité de Rnt1p, alors que parmi les mutations modifiant des résidus du dsRBD (B), seulement un mutant se retrouve complètement inactif.

BD. Le dernier mutant, BD/K463-A, K464-A, n'a qu'un effet intermédiaire sur les levures qui prennent 6.75 heures à doubler à 26°C au lieu de 4.25 heures (tableau 9). Ces deux mutations n'effectent que partiellement l'activité de l'enzyme.

Maintenant, est-ce que ces effets sur la croissance des cellules pourraient être dû au manque d'interaction avec Gar1p ou de toute autre protéine qui nécessitait ces acides aminés spécifiques pour se lier à Rnt1p? Les PJ69-4a ont été transformées avec les plasmides exprimant les BD/mutants en duos avec AD/Gar1p, AD/Mga2p ou l'une des constructions AD/Rnt1p qui interagissaient avec BD/Rnt1p, et ont été testées pour l'activation des gènes rapporteurs (tableau 9). La figure 21 montre, en exemples, les résultats obtenus pour les 3 mutants du C30 dont l'interaction avec Gar1p est affectée. La délétion du domaine C30 (BD/Rnt1p-ST) empêche toute liaison de AD/Gar1p à Rnt1p telle que révélée par l'absence de croissance des levures sur milieu sans histidine (A) et sans adénine (B). De façon surprenante, elle empêche aussi l'interaction du domaine N-terminal avec Rnt1p (croissance très faible sans histidine (C) et pratiquement nulle sur moins adénine (D)), alors qu'on s'attendait à ce que le domaine N-terminal puisse encore interagir avec ces mutants qui ne sont modifiés qu'en C-terminal. Même si l'interaction N-term:dsRBD est affectée, l'interaction N-term:N-term devrait être toujours possible. Concernant BD/K463-M, on voit très bien que l'interaction N-term:Rnt1p n'est pas du tout affectée par la mutation d'une lysine alors que l'interaction avec Gar1p semble partiellement dérangée. Par contre, la mutation des deux résidus lysines dans BD/K463-A, K464-A, nuie totalement à l'interaction de Gar1p avec Rnt1p et vient réduire de beaucoup la stabilité de l'interaction du domaine N-terminal avec Rnt1p. Le tableau 9 résume les capacités d'interagir de tous les mutants avec toutes les fusions à AD de Gal4p

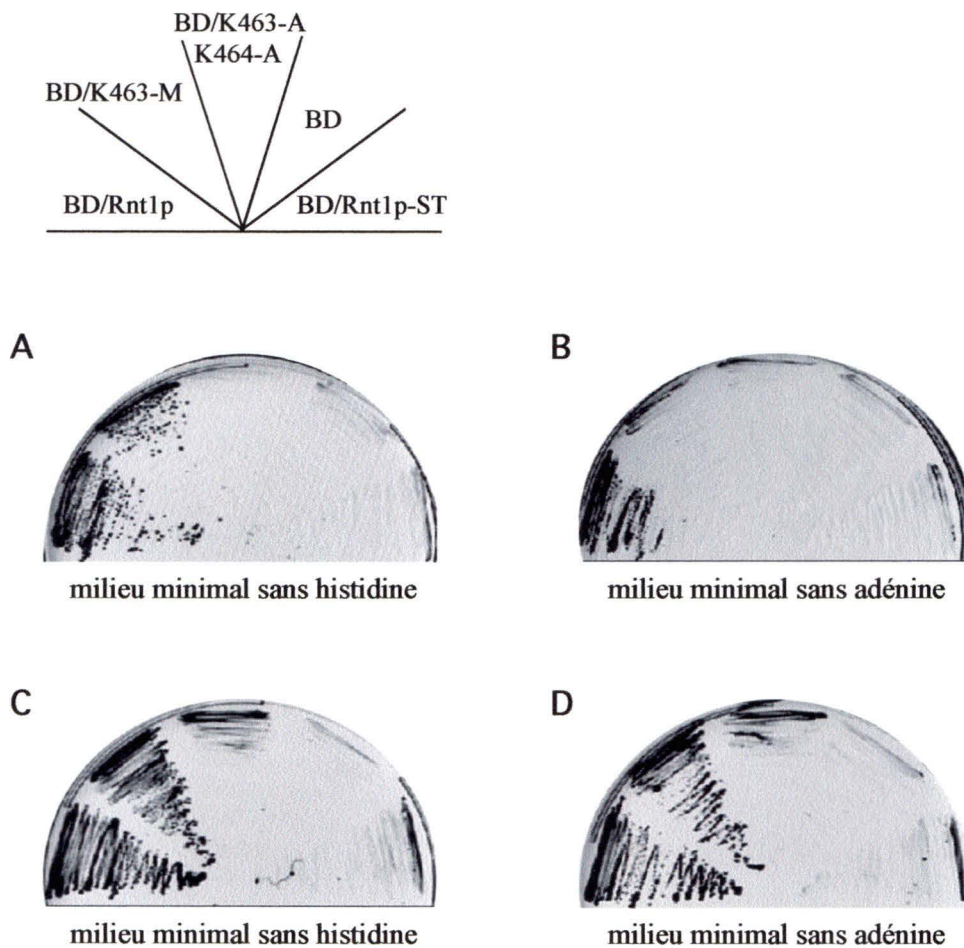


Figure 21: La substitution de deux résidus lysines dans le C30 de Rnt1p abolie l'interaction avec Gar1p et affecte l'interaction N-term/dsRBD. Les constructions exprimant BD/Rnt1p mutées au niveau du domaine C30 (schéma du haut) ont été transformées dans les levures PJ69-4a avec AD/Gar1p 1-205 (A et B) ou AD/NT2 (C et D) et testées pour l'interaction sur des pétris contenant du milieu minimal sans histidine (A et C) ou sans adénine (B et D).

	AD/Mga2p 691-1113	AD/Gar1p 1-205	AD/NT2 1-191	AD/ Δ NT2 188-471	AD/NT1 1-116	Complé- mentation	Temps de doublement	Niveau d'expression
BD/Rnt1p (1-471)	hhh/aaa/18.2±1.9	hhh/aa/5.4±1.4	hhh/aaa/13.3±1.3	h/-/0	hhh/aaa/16.1±1.0	oui	4.25	+++
BD/DS1 (344-471)	hh/aa/57.1±10.5	hhh/aaa/28.4±4.2	hh/aa/20.3	-/-/0	hh/aa/ND	non	ND	ND
BD/DS3 (344-450)	-/-/0	-/-/0	-/ -/3.86	-/-/0	-/-/ND	non	ND	ND
BD/DS4 (428-471)	hh/aa/8.1±1.6	hh/-/1.2±1.2	hh/aa/-	-/-/0	hhh/aa/ND	non	ND	ND
BD/K421-A	ND/ND/11.2±1.4	h/a/ 2.4±0.8	hhh/aaa/7.1±0.8	hh/-/0	hh/aa/3.8±3.1	oui	4.9	++++
BD/AA427-EE	ND/ND/0	-/-/0	h/a/1.5±0.7	-/-/0	-/-/0	non	13.0	+
BD/AA446-EE	ND/ND/13.4±0.3	hh/aa/1.8±0.8	hhh/aaa/8.3±1.0	h/-/0	hhh/aaa/7.5±3.2	oui	3.75	++++
BD/Rnt1p-ST	ND/ND/0	-/-/0	hh/a/0	-/-/0	-/-/0	non	11.88	++
BD/K463-M	ND/ND/6.3±0.7	hhh/-/0	hhh/aaa/5.3±0.8	-/-/0	hhh/aa/3.3±0.4	oui	4.0	+++
BD/K463-A, K464-A	ND/ND/0	-/-/0	hh/aa/0.8 ±0.4	ND/ND/0	ND/ND/0	oui	6.75	++
BD	-/-/0	-/-/0	-/-/0	-/-/0	-/-/0	non	10.25	++++

Tableau 9: Tableau résumant tous les tests réalisés et résultats obtenus pour chaque mutants. À titre de comparaison, les délétions N-terminales de BD/Rnt1p ont été ajoutées. Des tests doubles-hybrides évaluant l'interaction de ces mutants avec AD/Mga2p, AD/Gar1p, AD/NT2, AD/ Δ NT2 et AD/NT1 sur milieu minimal sans histidine (+10 mM 3-AT) ou sans adénine ont été faits. La facilité des colonies à croître sur ces milieux est indiquée par le nombre de «h» ou de «a» (un – indique l'absence de croissance, et ND = non-déterminé). Les interactions ont été confirmées et mesurées par un test d'expression de la β -gal en liquide avec ONPG (les données sont en unités de Miller). Tous les mutants de Rnt1p ont été utilisés pour transformer les cellules Δ RNT1 et tester leur capacité à compléter le phénotype de sensibilité aux températures élevées. Le temps de doublement (en heures) lorsque ces mêmes levures sont cultivées en milieu minimal sans uracil (en duplicata ou triplicata), a été calculé à partir de leurs courbes de croissance. Pour la plupart des mutants, le niveau d'expression de la protéine de fusion dans les levures Δ RNT1 a été vérifié par western blot avec l'extrait total de protéines de chaque transformant et hybridation avec α -Rnt1p (le nombre de + correspond à la quantité de protéines exprimées).

qui fonctionnaient bien avec BD/Rnt1p. Ainsi, en ce qui concerne les autres mutations qui faisaient perdre toute activité à Rnt1p, on observe que BD/AA427-EE n'est plus en mesure d'interagir avec Gar1p ou Mga2p alors qu'avec AD/NT2 il y a une faible activation des 3 gènes rapporteurs (pas avec AD/NT1 cependant). Donc, cela suggère que soit ces résidus sont importants pour la liaison de Gar1p, soit la mutation de ces résidus change complètement la conformation de la protéine en C-terminal empêchant l'interaction. Les deux derniers mutants qui complémentaient bien les Δ RNT1, interagissent encore bien avec Gar1p et les constructions AD/Rnt1p. Les résidus K421, A446, et A447 ne semblent pas jouer de rôle dans l'interaction avec d'autres protéines ou dans l'activité de Rnt1p, par exemple au niveau de la liaison de l'ARNdb, puisque leur modification n'a visiblement rien altéré.

Finalement, parmi ces mutations, nous espérons identifier des mutations dans Rnt1p empêchant toute interaction avec Gar1p sans altérer significativement l'activité de la RNase III. Or, BD/K463-A, K464, s'avère être le meilleur mutant, l'interaction avec Gar1p est nulle, et l'activité de l'enzyme n'est pas trop altérée *in vivo* avec un temps de doublement légèrement plus long de 6.75 heures que Rnt1p (4.25 heures). Toutes les autres mutations obtenues avec lesquelles Gar1p ne pouvaient pas interagir produisaient une Rnt1p inactive. La protéine mutante BD/K463-A, K464-A pourra donc être utilisée dans des expériences futures qui permettront de déterminer le rôle de l'interaction de Gar1p avec Rnt1p soit *in vivo* ou *in vitro*. À remarquer, que le facteur de transcription Mga2p n'interagit pas non plus avec ce mutant (tableau 9), suggérant que l'interaction de plusieurs protéines du criblage avec Rnt1p pourrait être affectée dans la cellule.

Discussion:

Le criblage double-hybrides avec Rnt1p a ouvert plusieurs nouvelles avenues dans lesquelles la RNase III pourrait jouer un rôle, de façon directe ou indirecte par l'intermédiaire d'interactions avec d'autres protéines. Pour chaque protéine identifiée comme partenaire de Rnt1p, il y aura des recherches effectuées dans le futur, afin de découvrir le pourquoi de cette association. Est-ce que Rnt1p jouera le même rôle avec chacune des protéines, ou jouera-t-elle des rôles différents appliqués à chaque classe fonctionnelle? Est-ce que, par exemple, la découverte de la signification biologique de l'interaction de Rnt1p avec l'un des facteurs de transcription résoudra le rôle joué par Rnt1p en association avec chacun des autres facteurs de transcription? Il sera fort intéressant de voir ce que chaque partenaire de Rnt1p nous révélera sur la fonction de l'enzyme dans la cellule. Mais, cela demandera beaucoup de temps à accomplir, des années de travail en perspective. Il serait donc important de confirmer le plus tôt possible que dans l'ensemble, les résultats du criblage sont le reflet réel du réseau d'interactions autour de Rnt1p dans la cellule. C'est à dire démontrer que la plupart des faux positifs ont été efficacement éliminés lors de la stratégie de sélection du double-hybrides, en analysant ces interactions par d'autres méthodes pour quelques candidats repêchés représentatifs. Parce que cette partenaire potentielle de Rnt1p est déjà connue pour son implication dans la même voie que les RNases III, soit la biogénèse des ribosomes, l'étude de l'interaction Gar1p:Rnt1p fut entreprise.

Comme mentionné dans l'introduction, Gar1p forme un complexe avec 3 autres protéines essentielles associées à tous les snoRNAs H/ACA, Nop10p, Nhp2p et Cbf5p (Henras *et*

al., 1998, Watkins *et al.*, 1998). Cbf5p est la pseudouridine synthase responsable de l'isomérisation des U en Ψ dans le pré-ARN ribosomal (Koonin, 1996, Zebarjadian *et al.*, 1999). Nhp2p et Nop10p n'ont pas de fonctions associées, mais on sait que Nhp2p lie directement l'ARN grâce à son domaine central (Henras *et al.*, 2001). Les 4 protéines sont nécessaires pour la pseudouridylation du pré-ARNr et le processing de l'ARNr 18S, (clivages en A1 et A2) (Girard *et al.*, 1992, Cadwell *et al.*, 1997, Lafontaine *et al.*, 1998, Henras *et al.*, 1998). D'après la taille des complexes associés à snR30 et à snR42 au microscope électronique, les particules pourraient avoir une masse totale de 360 kDa, ce qui correspondrait à la présence de 2 copies de chaque protéine pour chaque snoRNA (Watkins *et al.*, 1998). Nhp2p, Cbf5p et Nop10p sont nécessaires à l'accumulation des snoRNAs H/ACA et à la stabilité de Gar1p (Lafontaine *et al.*, 1998, Henras *et al.*, 2001). Alors, qu'en absence de Gar1p, le niveau de snoRNAs n'est pas affecté mais leur liaison avec l'ARNr est compromise (Bousquet-Antonelli *et al.*, 1997). Le défaut dans le processing de l'ARNr en absence de l'une des composantes protéiques des snoRNPs pourrait donc être un effet indirect, dû à la dégradation des snoRNAs requis pour certains clivages, comme snR10 ou snR30, et/ou être dû à l'instabilité de Gar1p qui est requise pour l'interaction des snoRNAs avec l'ARNr. Il a été démontré que Nhp2p et Nop10p sont toutes les deux capables d'interagir avec les pré-snoRNAs dans le cytoplasme des cellules *rnt1-Δ* (Henras *et al.*, 1998). Cette interaction avec les snoRNAs avant, pendant ou après le premier processing de ceux-ci par Rnt1p, pourrait prévenir leur dégradation par les exonucléases.

La fonction de Gar1p dans ce complexe n'est pas claire jusqu'à maintenant. Sauf pour les domaines GARs, que l'on retrouve également chez d'autres protéines, le reste de la protéine ne contient pas de motif connu pouvant être associé à une fonction précise. Le domaine central (acides aminés 25 à 143) s'est révélé suffisant pour secourir le phénotype léthal des Δ GAR1 et cibler la protéine au nucléole (Girard *et al.*, 1994). Il contient deux sites importants pour la liaison des snoRNAs (59-83 et 114-127) et toute délétion partielle dans ce domaine est létale. Concernant le domaine GAR, il aurait démontré des propriétés de déstabilisation d'hélices ARN *in vitro* pour la nucleolin (Ghisolfi *et al.*, 1992), serait impliqué dans des interactions non-spécifiques avec l'ARN chez hnRNP A1 (Burd et Dreyfuss, 1994), dans des interactions protéines-protéines dans la nucleolin et hnRNP A1 (Cartegni *et al.*, 1996, Bouvet *et al.*, 1998) et serait nécessaire pour la localisation nucléaire de Npl3p impliquée dans le transport d'ARN (Flach *et al.*, 1994). Cependant, chez Gar1p, les domaines GARs ne sont pas requis pour la viabilité et ne sont pas requis pour sa localisation nucléolaire (Girard *et al.*, 1994). Par contre, un effet subtil sur la croissance a été observé dans une souche délétée en *GAR1* complémentée avec une copie *GAR1* Δ GAR (sans domaine GAR). Une expérience de marquage de l'ARN à la (methyl-³H) méthionine par «pulse chase» révéla une légère accumulation de pré-ARNr 32S et des délais dans la maturation des ARNr 18S et 25S. La protéine Gar1p sans ses domaines GAR n'est donc pas complètement fonctionnelle (Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été démontré chez l'humain, que la protéine SMN, le produit du gène causant la maladie d'amyotrophie spinale, interagit avec hGAR1 et la fibrillarin grâce à leurs domaines GARs. Pour hGAR1, les deux domaines N- et C-terminaux sont nécessaires pour la liaison, mais cela n'exclue pas que d'autres parties de la protéine

pourraient être requises. Chez plusieurs patients, cette interaction est défectueuse à cause d'une mutation dans le septième exon de SMN (Pellizzoni *et al.*, 2001). Lors de l'arrêt de la transcription par l'ARN pol I, SMN est redistribuée en périphérie du nucléole et les protéines hGAR1 et fibrillarin ne co-localisent plus avec SMN dans les gems (corps nucléaires). Cela suggère un rôle pour SMN dans l'assemblage et le métabolisme de snoRNPs (Pellizzoni *et al.*, 2001). Cependant, cela ne veut pas dire nécessairement que la cause de la maladie est due à un problème dans la biogénèse des ribosomes, car SMN a aussi été découverte dans d'autres complexes impliqués dans l'assemblage de snRNPs, l'épissage des ARNm et la transcription par la pol II (Fischer *et al.*, 1997, Pellizzoni *et al.*, 1998, Buhler *et al.*, 1999, Pellizzoni *et al.*, 2001).

De plus, les résidus arginines du domaine GAR de Gar1p peuvent être méthylés par Rmt1p, une protéine arginine *N*-méthyltransférase de type I (Frankel *et al.*, 1999). La méthylation de résidus R serait utilisée dans des événements de transduction de signaux et les protéines liant l'ARN sont les substrats majeurs des protéines arginine *N*-méthyltransférases (Gary et Clarke, 1998). La méthylation *in vitro* de Gar1p par GST-Rmt1p dans des extraits cellulaires s'est révélée être dépendante de la présence d'ARN: Elle n'est possible qu'après le traitement de l'extrait à la RNase, suggérant que les sites de méthylation pourraient être bloqués par la présence soit d'ARN, soit d'ARN lié par des protéines (Frankel *et al.*, 1999). La méthylation des domaines GARs de Gar1p pourrait peut-être servir à réguler les interactions protéine-protéine et/ou protéine-ARN.

La découverte de la signification biologique de l'interaction entre Rmt1p et Gar1p apportera peut-être quelques éclaircissements sur la fonction et le rôle de Gar1p dans la

cellule. Rnt1p interagit *in vivo* avec la protéine Gar1p complète et avec la version tronquée en N-terminal. Les résultats des analyses double-hybrides (figure 15) ont démontré que les deux protéines complètes s'associent et que le premier domaine GAR de Gar1p n'est pas requis pour cette association. Malheureusement, à part cette troncature repêchée dans le criblage, aucune autre délétion n'a été faite dans Gar1p afin de découvrir la partie de la protéine responsable de l'interaction avec Rnt1p. Le deuxième domaine GAR, le domaine central ou une partie du domaine central, ou encore les deux domaines pourraient être le site reconnu par Rnt1p. Mais, dans le cas de la protéine SMN humaine, les deux domaines GAR étaient nécessaires, alors que pour Rnt1p, l'un n'est pas requis, ce qui suggère que le site d'interaction de Rnt1p pourrait être différent. D'autre part, si la RNase III n'interagissait seulement qu'avec les domaines GARs de Gar1p qui sont non-essentiels pour la fonction de la protéine, alors cela voudrait dire que l'interaction Rnt1p:Gar1p n'est pas essentielle pour l'activité de Gar1p. Nous verrons plus loin, pourquoi en théorie, Rnt1p devrait interagir avec le domaine central de Gar1p.

Toutefois, l'inverse a été fait; soit, la détermination du site de liaison de Gar1p dans Rnt1p. Gar1p interagit avec la partie C-terminale de Rnt1p en aval du motif dsRBD conservé, un prolongement de la protéine présent seulement chez quelques RNases III d'espèces eucaryotes. Chez Rnt1p, ce domaine a été désigné: C30 pour représenter les 30 derniers acides aminés de la protéine. Les résultats du test d'interaction de Gar1p avec les fragments de Rnt1p ont permis d'avancer que le domaine C30 pourrait être le site principal de la liaison de Gar1p. Et pas seulement pour Gar1p, les trois facteurs de transcription testés (tableau 8) incluant Mga2p, semblaient aussi se lier au même endroit. De plus, la mutation des résidus K463 et K464, faisant partie du domaine C30, dans la protéine

BD/Rnt1p empêche toute interaction de Gar1p (figure 19) sans affecter l'activité de Rnt1p *in vitro* (Tremblay *et al.*, 2002, annexe III). Cependant, même si Rnt1p/K463-A, K464-A peut compléter le phénotype de sensibilité à la température de 37° des cellules sans *RNT1*, on voit que la fonction de l'enzyme doit être légèrement affectée car la croissance est un peu ralentie, temps de doublement de 6.75 heures au lieu de 4.25 (figure 20 et tableau 9). De plus, l'enlèvement de tout le domaine C30 par l'introduction d'un stop après le résidu Y441, inactive complètement l'activité de l'enzyme. Pourtant, Rnt1p-ST est correctement exprimée *in vivo* (figure 19C) et le domaine N-terminal est encore capable d'interagir avec la protéine quoique plus faiblement (tableau 9). D'après le programme de prédiction de la structure secondaire (King et Sternberg, 1996) de cette partie de Rnt1p, ce domaine ne présente pas de structure organisée et semble donc assez flexible alors que la dernière hélice α du dsRBD se termine vis-à-vis le stop introduit. C30 pourrait donc constituer un nouveau domaine important de Rnt1p servant de site d'interaction avec d'autres protéines et pourrait aussi accomplir d'autres fonctions puisqu'il semble essentiel à l'activité de l'enzyme. Pour ce qui est de l'interaction de Gar1p, si les deux résidus lysines constituent des points de contacts importants, peut-être dans des interactions électrostatiques, d'autres résidus présents dans le dsRBD pourraient aussi contacter Gar1p pour stabiliser le complexe.

L'association de Rnt1p et Gar1p a aussi été testée *in vitro* et il a été ainsi démontré que l'interaction entre les deux protéines est directe et spécifique. Gar1p exprimée dans les bactéries en fusion avec GST, est capable de précipiter la protéine recombinante 6xHis-Rnt1p en absence de toute autre protéine ou ARN de la levure. Et GST est incapable de

lier et précipiter Rnt1p. De plus, l'élimination de l'ARN bactérien contenu dans le lysat par traitement à la RNase A avant l'ajout de Rnt1p, n'empêche pas significativement la liaison de Rnt1p à Gar1p. Aucun ARN ou protéine de la levure ne devait donc faire le pont entre les deux protéines *in vivo*, ce qui veut dire que l'interaction est directe et spécifique. D'ailleurs, au contraire d'être l'intermédiaire liant les deux protéines, l'ARN serait plutôt inhibiteur de l'interaction Gar1p:Rnt1p. En effet, dans l'expérience de précipitation de Rnt1p par GST/Gar1p, l'ajout d'ARN total extrait des levures dans le lysat contenant GST-Gar1p (figure 16D) ou dans un mélange des deux protéines pures (Tremblay *et al.*, 2002, fig. 3B), compromet toute interaction et Rnt1p ne peut plus être précipité. Des ARNs présents dans cet extrait sont donc liés soit par Gar1p soit par Rnt1p et les deux protéines ne peuvent plus s'associer. Il a été prouvé que cela était dû au moins en partie aux substrats reconnus par Rnt1p, car l'ajout d'ARNr 25S 3'end synthétisé *in vitro* en quantité égale à Rnt1p empêche la formation du complexe (Tremblay *et al.*, 2002). La liaison d'ARN double-brins par le dsRBD semble bloquer l'accès de Gar1p aux résidus du domaine C30 adjacent. D'un autre côté, l'ajout de quantités croissantes de GST-Gar1p purifiée a le même effet d'inhibition sur l'interaction de Rnt1p avec son substrat (Tremblay *et al.*, 2002). Gar1p et l'ARNdb substrat de Rnt1p compétitionnent donc pour la liaison à la RNase III de *S. cerevisiae*.

Gar1p étant une composante d'un complexe snoRNP H/ACA incluant entre autres Cbf5p, des tests d'interaction entre Cbf5p et Rnt1p ont été faits. Les résultats préliminaires d'expériences d'immunoprécipitation et double-hybrides *in vivo* suggèrent qu'il n'y aurait pas d'interaction directe. L'immunoprécipitation dans des cellules de levures de HA-Cbf5p avec BD/Rnt1p et l'anticorps α -Rnt1p n'ont permis de récolter aucune Cbf5p.

Même pas, non plus, par l'intermédiaire de Gar1p pour faire le pont entre les deux protéines. Malheureusement, si la colonne de protéine A couplée à α -Rnt1p a su retenir Rnt1p tel que confirmé par le western blot, la présence de 6xHis-Gar1p avec Rnt1p n'a pas été vérifiée. Cependant le succès de la précipitation de BD/Rnt1p et HA-Cbf5p par 6xHis-Gar1p dans les mêmes cellules confirme la capacité des protéines étiquetées à interagir (figure 17). De toute façon, les tests double-hybrides réalisés avec les fragments de BD/Rnt1p en clonant Cbf5p en fusion avec le domaine AD de Gal4p se sont révélés négatifs (Y. Yam, comm. pers.) confirmant les résultats négatifs de l'immunoprécipitation. De plus, Rnt1p n'interagirait pas non plus avec les snoRNAs *in vivo* ou *in vitro* (B. Lamontagne, S. Larose et S. Abou Elela, comm. pers.). Gar1p pourrait donc être le seul facteur de ce type de snoRNPs à contacter directement Rnt1p.

Pour la suite des expérimentations qui mèneront à l'identification de la signification de l'interaction entre Gar1p et Rnt1p, réalisées par les autres membres du labo, le mutant de Rnt1p ayant perdu la capacité d'interagir avec Gar1p sans avoir perdu toute son activité a été utilisé à titre de comparaison. Étant donné que Rnt1p est impliquée dans la biogénèse des snoRNAs C/D et H/ACA en plus de l'ARNr, l'effet spécifique de l'interaction Gar1p:Rnt1p dans la maturation de l'ARNr, par exemple au niveau de la pseudouridylation, serait difficile à découvrir sans ce genre de mutant. Rnt1p doit être capable de produire les snoRNAs H/ACA et de cliver l'ARNr, même avec la mutation détruisant le site d'interaction de Gar1p, à moins que cette interaction ne soit nécessaire pour l'accomplissement de ses fonctions. L'enzyme avec les mutations K463-A et K464-A a donc été exprimée avec un tag 6xHis et été purifiée, puis a été testée pour le clivage *in vitro* du substrat modèle de Rnt1p; l'extrémité 3' du pré-ARNr 25S. Aucune différence

de clivage d'avec Rnt1p n'a été observée indiquant que la liaison à l'ARN et le centre catalytique de la RNase ne sont pas affectés par les mutations (Tremblay *et al.*, 2002, fig. 4). Toutefois, *in vivo* un décalage dans la production de l'extrémité 3' mature du pré-ARNr a été observé dans les levures $\Delta RNT1$ exprimant BD/K463-A, K464-A. Ce décalage est cependant moins long que dans les cellules n'exprimant aucune Rnt1p et le résultat final de la maturation de l'ARNr 25S est le même que pour BD/Rnt1p (Tremblay *et al.*, 2002, fig. 5). Le processing de l'ARNr n'est donc pas trop affecté par l'absence d'interaction avec Gar1p, ou toute autre protéine qui pourrait se lier à Rnt1p grâce aux mêmes résidus lysines. Quand le niveau de pseudouridylation de l'ARN ribosomal fut mesuré pour BD/K463-A, K464-A versus BD/RNT1p versus BD, une différence marquée fut observée entre Rnt1p et Rnt1p ne pouvant plus interagir avec Gar1p. En effet, le niveau d'isomérisation des U en Ψ en absence d'interaction est d'environ 40% moins élevée que Rnt1p, soit similaire au niveau de pseudouridylation des cellules sans *RNT1* (Tremblay *et al.*, 2002, fig. 6B). Cela suggère que l'interaction de Gar1p avec Rnt1p est essentielle pour qu'il y ait une modification efficace de l'ARNr par le complexe de pseudouridylation. Cet effet pourrait être indirectement relié au manque d'interaction et être dû à une diminution de la quantité soit de snoRNAs H/ACA matures produits par la Rnt1p mutée, soit des protéines faisant partie des snoRNP H/ACA. Mais les résultats des analyses western blot et northern blot permettent d'éliminer cet argument (Tremblay *et al.*, 2002, fig. 6C et D).

Quelle est donc la cause de la baisse de la pseudouridylation? Un premier indice fut découvert grâce à des expériences comparatives de co-sédimentation dans un gradient de

glucose des facteurs composant les snoRNPs H/ACA en présence d'une allèle normale de Rnt1p ou de l'allèle mutée inapte à interagir avec Gar1p. Dans l'extrait sédimenté de la souche contenant BD/Rnt1p, le patron de sédimentation de Gar1p suit le même patron que Rnt1p, apparaissant dans les mêmes fractions, tous les deux principalement dans 6 à 8. Nhp2p et Cbf5p, malgré une présence plus étendue dans le gradient pour cette dernière, sont toutes les deux présentes également dans les fractions 6 à 8, et même snR10 a été détecté dans ces fractions. Il est donc possible de retrouver Rnt1p associée à ce complexe par l'intermédiaire de Gar1p. La disruption de l'interaction le prouve bien aussi dans cette expérience de co-sédimentation. Avec les mutations K463-A et K464-A, Rnt1p et Gar1p adoptent des patrons de sédimentation opposés, Rnt1p mutée est sortie dans les premières fractions, ne formant probablement aucun complexe alors que Gar1p est concentrée dans des fractions plus loin. Nhp2p se retrouve un peu partout dans le gradient et le patron de Cbf5p est déplacé à l'opposé de Gar1p (Tremblay *et al.*, 2002, fig. 6A). L'interaction de Rnt1p avec Gar1p semble donc requise pour l'assemblage correct du complexe responsable de la pseudouridylation.

La plus informative des expériences réalisées est sans nulle doute l'analyse par immunofluorescence *in situ* de la localisation de Gar1p, Cbf5p et Nhp2p dans les souches de levures délétées en *RNT1* (BD), ou contenant BD/Rnt1p ou BD/Rnt1p déficiente en liaison avec Gar1p. Dans la souche sauvage (*wild-type*) et les $\Delta RNT1$ complétées avec BD/Rnt1p, la localisation de Gar1p, Cbf5p, Nhp2p ainsi que Rnt1p est nucléolaire pour les 4. Dans les cellules $\Delta RNT1$, transformées avec Rnt1p/K463-A, K464-A ou BD seul, la localisation des 3 composantes des snoRNPs H/ACA est cytoplasmique ou

cytoplasmique et un peu nucléaire, alors que la localisation de Rnt1p mutée demeure nucléolaire. La localisation au nucléole de Gar1p, Cbf5p et Nhp2p est donc dépendante de l'interaction de Gar1p avec Rnt1p. Cela suggère qu'aucune des trois protéines ne possède de signal de localisation nucléaire (NLS) et que celles-ci comptent sur le NLS de Rnt1p pour les transporter au nucléole. D'ailleurs la fusion du domaine AD et BD de Gal4p contenant le NLS fort du *simian virus 40* (SV40) à Gar1p et Cbf5p respectivement permet la bonne localisation des 3 protéines au noyau et leur rétention au nucléole dans les cellules délétées en *RNT1*. Même l'utilisation de BD/Cbf5p seulement est suffisante pour la localisation nucléolaire des 3 protéines (Tremblay *et al.*, 2002, fig. 7). L'une des fonctions de la RNase III de *S. cerevisiae* pourrait donc être le simple transport du cytoplasme au noyau, puis au nucléole du complexe de pseudouridylation.

D'autres protéines ont été découvertes comme interagissant physiquement avec Gar1p de façon directe ou dans un complexe, par différents groupes: Ito *et al.*, (2001) ont capturé deux protéines dans un criblage double-hybrides avec Gar1p comme appât; Nab2p et Nup116p, impliquées respectivement dans l'exportation des ARNm du noyau et l'importation au noyau de protéines nucléaires. De plus, Kap104p une transportin impliquée dans le transport au noyau des hnRNPs a aussi été repêchée par immunoprécipitation avec Gar1p et identification par spectrométrie de masse (Ho *et al.*, 2002), ainsi que Nop2p, une possible ARN méthyltransférase impliquée dans la maturation post-transcriptionnelles de l'ARNr, et Lsm8p une protéine Sm travaillant dans l'épissage des ARNm. Finalement, dans des travaux similaires à Ho, Gavin *et al.*, (2002) ont identifié comme partenaires de Gar1p; Nop4p, une protéine nucléolaire impliquée dans le processing de l'ARNr, Cbf5p (ce qui confirmait que leur méthode fonctionne),

Mrp7p (une protéine ribosomale mitochondriale), et d'autres protéines suspectes comme Fyv14p et Mis1p, Pol2p (ADN polymérase II), Tif4632p (homologue à eIF-4), et Lhp1p (homologue de la protéine La humaine impliquée dans le processing d'ARNt). Toutes ces protéines ne sont peut-être pas des partenaires réelles de Gar1p, mais certaines d'entre elles pourraient être intéressantes comme les quelques nucléoporines et les protéines impliquées dans la maturation de l'ARNr. De plus, dans une de ces analyses, Rnt1p a aussi été repêchée par Srp1p, un autre facteur d'importation, qui celui-ci, lie le signal de localisation nucléaire des protéines nucléaires (Gavin *et al.*, 2002). Mais toutes ces associations restent à être confirmées.

En résumé, il a été découvert que Gar1p interagit directement et spécifiquement avec Rnt1p, grâce au domaine C30 situé après le dsRBD de la ribonucléase. Cette interaction n'est possible que lorsque Rnt1p n'est pas liée à son substrat ARNdb, suggérant qu'en présence d'ARN, soit Rnt1p adopte une conformation différente, soit le substrat recouvre le site d'interaction de Gar1p. Cependant, la présence de quantités égales ou d'excès de Gar1p par rapport au substrat peut compétitionner pour l'interaction avec Rnt1p. Ce qui fait qu'il y a peut-être plus de chances que l'interaction de Gar1p avec Rnt1p puisse arriver dans le cytoplasme dès la synthèse des deux protéines que dans le nucléole rempli de pré-ARNr substrats. La disruption de l'interaction entre les deux protéines grâce à la modification de deux résidus lysines du domaine C30 de Rnt1p, a permis de découvrir que la localisation de Gar1p au nucléole était dépendante de cette interaction avec Rnt1p. De plus, la localisation de Nhp2p et Cbf5p est affectée de la même façon que leur partenaire Gar1p, même si aucun lien direct n'a été trouvé entre Cbf5p et Rnt1p. Cela suggère que les protéines du complexe de pseudouridylation pourrait nécessiter Rnt1p

pour leur transport au nucléole. Chez Rnt1p un signal de localisation nucléaire semble être présent dans son domaine N-terminal alors qu'il y aurait un signal de localisation nucléolaire dans le dsRBD. Une fusion du domaine N-terminal de Rnt1p à GFP, est détectée dans tout le noyau au microscope alors que la fusion du dsRBD à GFP ne se situe que dans le nucléole (M. Catala, comm. pers.). Tandis que pour Gar1p, Nhp2p et Cbf5p aucun NLS n'a été reporté pour ces protéines jusqu'à maintenant. L'interaction de la transportin Srp1p avec Rnt1p pourrait jouer un rôle dans ce transport. Comme Srp1p agit comme un récepteur de NLS classique et transporteur au noyau de la protéine l'arborant avec l'aide de Kap95p (Enenkel *et al.*, 1995, Görlich *et al.*, 1995), ces dernières pourraient être le transporteur cargo de Rnt1p pour la faire passer à travers les nucléoporines. D'un autre côté, Gar1p semblerait elle aussi interagir avec des transporteurs puisque que des interactions avec Kap104p (Ho *et al.*, 2002), Nab2p et Nup116p (Ito *et al.*, 2001) ont été identifiées. Nup116p est une composante associée aux nucléoporines des pores nucléaires qui participe à l'exportation de ARNm, et à l'importation des protéines nucléaires par Kap95p/Srp1p (Iovine *et al.*, 1995, Bailer *et al.*, 2000, Strawn *et al.*, 2001). Nab2p est une hnRNP impliquée dans le transport des ARNm hors du noyau et passe à travers les pores du noyau grâce à Kap104p (Aitchison *et al.*, 1996). Kap104p ne serait responsable que du transport de deux hnRNPs différentes qu'elle reconnaît et lie grâce à une boîte RRG (l'équivalent du domaine GAR), qui peut être considérée comme un NLS non classique (Lee et Aitchison, 1999). Comme Gar1p possède deux domaines GARs, il est possible que celle-ci puisse réussir à entrer au noyau par cette voie, peut-être par erreur, quand il y a trop de Gar1p ou de complexe contenant Gar1p aux portes du noyau. La figure 22 propose un modèle selon quoi Rnt1p serait

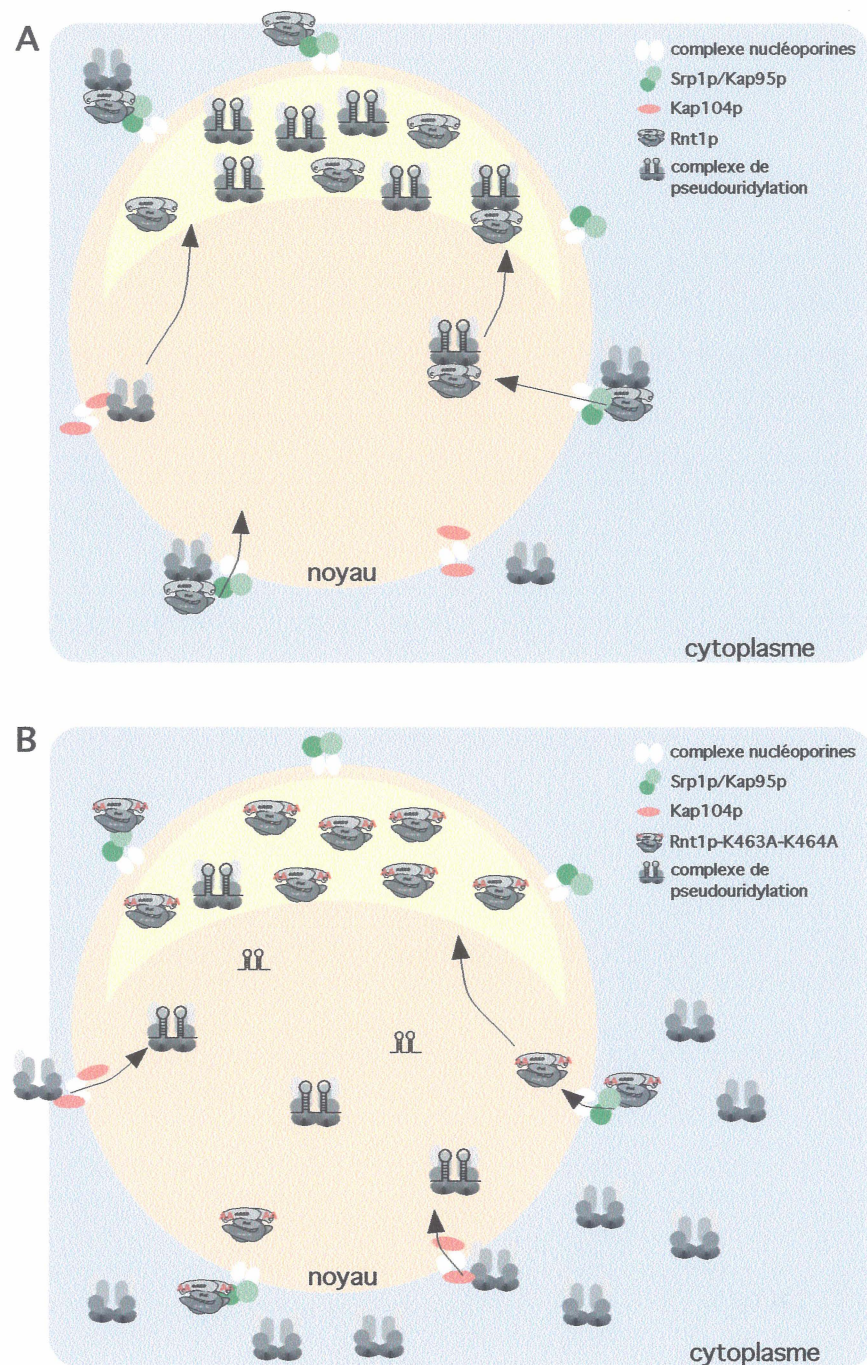


Figure 22: Modèle illustrant le transport au nucléole du complexe de pseudouridylation par Rnt1p liée à Gar1p (A) dans une cellule exprimant une copie normale de Rnt1p et (B) dans une cellule exprimant Rnt1p mutée aux acides aminés K463 et K464 ne pouvant plus interagir avec le complexe par l'intermédiaire de Gar1p. En présence de Rnt1p, le complexe peut entrer par la voie Srp1p-dépendante, mais en absence d'interaction, avec Gar1p, le complexe de pseudouridylation n'entre au noyau que grâce à Kap104p, habituellement utilisée pour le transport des hnRNPs.

responsable de la majorité du transport de Gar1p et de ses partenaires au noyau par la voie Srp1p dépendante (en A). En absence de Rnt1p ou en absence d'interaction avec Rnt1p, la seule façon pour Gar1p de se retrouver au noyau serait de passer par le même chemin que les hnRNPs, un porte d'entrée secondaire peut-être moins efficace pour le transport du complexe protéique (figure 22B). C'est ce qui pourrait expliquer la coloration à la fois du noyau et du cytoplasme dans les cellules sans Rnt1p. Il a été observé que dans des cellules délétées en *GARI*, la protéine Gar1p Δ GAR se localise au nucléole de la même façon que la protéine complète montrant que les domaines GAR ne sont pas nécessaires à la localisation de la protéine (Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000). Donc, si Rnt1p interagit avec Gar1p grâce à son domaine central, effectivement, Gar1p n'a pas besoin de ses domaines GAR pour son transport au noyau. Cependant dans une souche délétée en *RNT1*, peut-être que sans ses domaines GAR, Gar1p et le complexe de pseudouridylation ne pourraient plus du tout entrer au noyau et au nucléole et à ce moment-là on pourrait observer l'absence complète de pseudouridylation de l'ARNr ou plutôt la létalité de la souche. Il y aurait peut-être une façon de tester ça éventuellement et de pouvoir vérifier si effectivement Gar1p pourrait passer par Kap104p.

Pour ce qui est de la localisation nucléolaire, il n'existe pas vraiment de signal de localisation nucléolaire proprement dit. On devrait plutôt parler, d'un domaine important pour la rétention d'une protéine dans le nucléole car les particules qui sont transportées au noyau entrent au nucléole par diffusion et vont s'y accumuler seulement s'il y a une composante nucléolaire pour les y retenir. Ce peut être un ARN (ARNr), une autre protéine ou un complexe qui va interagir avec la protéine et la séquestrer. Par exemple, pour Rnt1p, son domaine de liaison à l'ARNdb est nécessaire pour sa localisation

nucléolaire parce qu'elle y sera retenue par l'interaction du dsRBD au pré-ARNr. Dans le cas du complexe de pseudouridylation, une fois transporté au noyau par Rnt1p celui-ci devrait être en mesure de s'accumuler au nucléole par l'interaction du complexe avec l'ARNr. Or dans les cellules où Rnt1p ne peut pas interagir avec Gar1p, même si une certaine quantité du complexe entre au noyau, celui ne se concentre pas facilement au nucléole. Cela doit être seulement dû à un ralentissement dans le transport au noyau et non pas à l'absence de Rnt1p pour les maintenir au nucléole, car l'ajout d'un NLS classique à Cbf5p et/ou Gar1p permet la localisation normale au nucléole dans les cellules $\Delta RNT1$. De façon similaire à Rnt1p le complexe de pseudouridylation doit donc être séquestré au nucléole par sa liaison à l'ARNr.

L'interaction de Rnt1p avec le complexe impliqué dans l'isomérisation des U en Ψ dans l'ARNr pourrait permettre de coordonner le processing du pré-ARNr avec les modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles. Étant donné que l'interaction avec Gar1p est interrompue par la présence de substrats de Rnt1p, après son entrée au nucléole, le complexe de Rnt1p et Gar1p pourrait être dissocié, l'un débutant le clivage du précurseur du pré-ARNr 35S à l'extrémité 3' et l'autre commençant ses modifications. Ce mécanisme d'entrée au noyau permettrait d'apporter les facteurs de maturation de l'ARNr en quantités équimolaires dans le nucléole.

De nombreux facteurs incluant Rnt1p ainsi que le complexe de pseudouridylation se sont révélés être importants pour la maturation de l'extrémité 5' du pré-ARNr 35S. Des délais dans le processing sont observés lorsque *RNT1* est délété ou que l'expression de n'importe lequel des composants du complexe de pseudouridylation est inhibée ou que

l'interaction entre Rnt1p et Gar1p est abolie. Cependant, on constate que dans tous ces cas, ce ralentissement pourrait être relié au manque de snR10 et snR30, essentiels à la maturation de l'extrémité 5', ou à leur mauvaise localisation. La délétion de Rnt1p ou la disruption de l'interaction avec Gar1p cause une mauvaise localisation des snoRNPs impliquant Gar1p, y compris ceux de snR10 et snR30. Alors que l'inhibition de Cbf5p, Nhp2p ou Nop10p entraîne la dégradation des snoRNAs et de Gar1p. Donc, si l'un de ces facteurs est impliqué directement dans la maturation de l'ARNr 18S, ce sera difficile à identifier.

Enfin, le rôle de Gar1p a été défini jusqu'alors comme étant accessoire dans le complexe de pseudouridylation. Son activité dans le nucléole n'a toujours pas été identifiée mais maintenant on peut ajouter que Gar1p est requise pour le transport dans le noyau du reste du complexe protéique. Gar1p pourrait être la responsable de la coordination de la maturation de l'ARNr en général. Celle-ci semble d'ailleurs interagir avec deux autres protéines requises dans ce processus, Nop2p (Ho *et al.*, 2002), une protéine avec une homologie avec des ARN (m5C) méthyltransferases (Reid *et al.*, 1999) qui est requise pour le processing de l'ARNr 27S en 5.8S et 25S (Hong *et al.*, 1997 et 2001), et Nop4p (Gavin *et al.*, 2002) une protéine ayant 4 motifs de liaison à l'ARN aussi impliquée dans le processing de l'ARNr 27S (Sun et Woolford, 1994 et 1997). En plus, les domaines GAR de Gar1p ont la possibilité d'être méthylés afin de réguler peut-être les interactions de la protéine avec l'ARN ou d'autres protéines. Gar1p pourrait donc constituer un signal de régulation en *trans* de plusieurs processus de maturation de l'ARNr.

Remerciements:

J'aimerais grandement remercier mes collègues qui ont partagé leurs résultats scientifiques et discutés la Science de Rnt1p avec moi par e-mail ou par téléphone et tout particulièrement ceux qui étaient présents dans les moments durs et les moments moins durs quand j'étais au laboratoire; Bruno Lamontagne, Stéphanie Larose, Yeung Yam et Mathieu Catala. De plus, j'aimerais remercier Geneviève Pinard pour l'aide apportée dans les tests de 37 candidats et le séquençage de 26 positifs ainsi que Dr Liam Good pour le séquençage de 83 candidats.

Je tiens également à remercier Dr Sherif Abouelela (le boss), pour son aide dans l'accomplissement de mes études de maîtrise. Je sais qu'en sortant de son laboratoire, je bénéficie maintenant de tout les atouts pour réussir ma carrière, peu importe dans quoi je travaillerai.

Et finalement, je veux bien sûr remercier mes juges, Dr Raymund Wellinger et Dr Simon Labbé et Dr Sherif Abouelela, qui vont contribuer à faire de ce mémoire un excellent mémoire de par leur lecture minutieuse et leurs commentaires judicieux.

Références:

Abou Elela, S., Igel, H. et M. Ares, Jr. (1996) RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 85:115-124.

Abou Elela, S. et M. Ares, Jr. (1998) Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *EMBO J.* 17:3738-3746.

Aitchison, J.D., Blobel, G. et M.P. Rout. (1996) Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science*. 274:624-627.

Apikian, P., Moorefield, B. et R.H. Reeder. (2001) New model for the yeast RNA polymerase I transcription cycle. *Mol. Cell. Biol.* 21:4847-4855.

Bachellet, J.-P. et J. Cavallé. (1997) Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem. Sci.* 22:257-261.

Bailer, S.M., Balduf, C., Katahira, J., Podtelejnikov, A., Rollenhagen, C., Mann, M., Pante, N. et E. Hurt. (2000) Nup116p associates with the Nup82p-Nsp1p-Nup159p nucleoporin complex. *J. Biol. Chem.* 275:23540-23548.

Balakin, A.G., Smith, L. et M.J. Fournier. (1996) The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell*. 86:823-834.

Bass, B.L. (2000) Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*. 101:235-238.

Beach, D., Rodgers, L. et J. Gould. (1985) *ran1+* controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Curr Genet.* 10:297-311.

Bernstein, E., Denli, A.M. et G.J. Hannon. (2001) The rest is silence. *RNA*. 7:1509-1521.

Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunencko, M., Routzahn, K.M., Waugh, D.S., Court, D.L. et X. Ji. (2001) Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure* 9:1225-1236.

Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., Gélugne, J.-P., Caizergues-Ferrer, M. et T. Kiss. (1997) A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs. *EMBO J.* 16:4770-4776.

Bousquet-Antonelli, C., Vanrobays, E., Gélugne, J.-P., Caizergues-Ferrer, M. et Y. Henry. (2000) Rrp8p is a yeast nucleolar protein functionally linked to Gar1p and involved in pre-rRNA cleavage at site A2. *RNA* 6:826-843.

Bouvet, P., Diaz, J.J., Kindbeiter, K., Madjar, J.J. et F. Almaric. (1998) Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J. Biol. Chem.* 273:19025-19029.

Bram, R.J., Young, R.A. et J.A. Steitz. (1980) The ribonuclease III site flanking 23S sequence in the 30S ribosomal precursor RNA of *Escherichia coli*. *Cell*. 19:393-401.

Burd, C.G. et G. Dreyfuss. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins, *Science* 265:615-621.

Burd, C.G. et G. Dreyfuss. (1994) RNA binding specificity of hnRNP A1: Significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 13:1197-1204.

Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A.G., Proctor, M. et D. St Johnston. (1995) NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *EMBO J.* 14:3563-3571.

Cadwell, C., Yoon, H.-J., Zebarjadian, Y. et J. Carbon. (1997) The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor *RRN3*. *Mol. Cell. Biol.* 17:6175-6183.

Cadwell, R.C. et G. F. Joyce. (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 2:28-33.

Carpick, B.W., Graziano, V., Schneider, D., Maitra, R.K., Lee, X. et B.R.G. Williams. (1997) Characterization of the solution complex between the interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase and HIV-I trans-activating region RNA. *J. Biol. Chem.* 272:9510-9516.

Cartegni, L., Maconi, M., Morandi, E., Cobianchi, F., Riva, S. et G. Biamonti. (1996) hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 259:337-348.

Casalone, E., Barberio, C., Cavalieri, D. et M. Polsinelli. (2000) Identification by functional analysis of the gene encoding alpha-isopropylmalate synthase II (LEU9) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 16:539-545.

Chamberlain, J.R., Lee, Y., Lane, W.S. et D.R. Engelke. (1998) Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev.* 12:1678-1690.

Chanfreau, G., Abou Elela, S., Ares, Jr, M. et C. Guthrie. (1997) Alternative 3' end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes & Dev.* 11:2741-2751.

Chanfreau, G., Buckle, M. et A. Jacquier. (2000) Recognition of a conserved class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3142-3147.

Chanfreau, G., Legrain, P. et A. Jacquier. (1998a) Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J. Mol. Biol.* 284:975-988.

Chanfreau, G., Rotondo, G., Legrain, P. et A. Jacquier. (1998b) Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1. *EMBO J.* 17:3726-3737.

Chen, D. et S. Huang. (2001) Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J. Cell. Biol.* 153:169-176.

Chen, J. et C. L. Moore. (1992) Separation of factors required for cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 12:3470-3481.

Conrad, C., Evguenieva-Hackenberg, E. et G. Klug. (2001) Both N-terminal catalytic and C-terminal RNA binding domain contribute to substrate specificity and cleavage site selection of RNase III. *FEBS L.* 509:53-58.

Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, 16:10881-10890.

Cosentino, G.P., Venkatesan, S., Serluca, F.C., Green, S.R., Mathews, M.B. et N. Sonenberg. (1995) Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9445-9449.

Court, D. (1993) RNA processing and degradation by RNase III. *J. G. A. B. Belasco, G. ed. New York: Academic Press, NY.*

Davidov, Y., Rahat, A., Flechner, I. et O. Pines. (1993) Characterization of the *rnc-97* mutation of RNase III: a glycine to glutamate substitution increases the requirement for magnesium ions. *J. Gen. Microbiol.* 139:717-724.

Dichtl, B., et W. Keller, (2001) Recognition of polyadenylation sites in yeast pre-mRNAs by cleavage and polyadenylation factor. *EMBO J.* 20: 3197-3209.

Dunn, J.J. (1976) RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage. *J. Biol. Chem.* 251:3807-3814.

Enenkel, C., Blobel, G. et M. Rexach. (1995) Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J. Biol. Chem.* 270:16499-16502.

Fawcett, D. W. et E. Raviola. (1994) Bloom and Fawcett: A textbook of histology. 12th edition. Chapman and Hall, New York, NY, 964 pages. Figure 1-17.

Fields, S. et O. Song. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340:245-246.

Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M. et S.S. Gill. (2000) A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene.* 245:213-221.

Fischer, U., Liu, Q. et G. Dreyfuss. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell.* 90:1023-1029.

Fjose, A., Ellingsen, S., Wargelius, A. et H.C. Seo. (2001) RNA interference: mechanisms and applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 7:31-57.

Flach, J., Bossie, M., Vogel, J., Corbett, A., Jinks, T., Willins, D.A. et P.A. Silver. (1994) A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol. Cell. Biol.* 14:8399-8407.

Frankel, A. et S. Clarke. (1999) Rnase treatment of yeast and mammalian cell extracts affects in vitro substrate methylation by type I protein arginine *N*-methyltransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259:391-400.

Gary, J.D. et S. Clarke. (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61:65-131.

Gautier, T., Berges, T., Tollervey, D. et E. Hurt. (1997) Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17:7088-7098.

Gavin, A.-C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.-A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. et G. Superti-Furga (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415:141-147.

Ghisolfi, L., Joseph, G., Almaric, F. et M. Erard. (1992) The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J. Biol. Chem.* 267:2955-2959.

Giorgi, C., Fatica, A., Nagel, R. et I. Bozzoni. (2001) Release of U18 snoRNA from its host intron requires interaction of Nop1p with Rnt1p endonuclease. *EMBO J.* 20:6856-6865.

Gitelman, D.R. et D. Apirion. (1980) The synthesis of some proteins is affected in RNA processing mutants of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1063-1070.

Girard, J.-P., Bagni, C., Caizergues-Ferrer, M., Almaric, F. et B. Lapeyre. (1994) Identification of a segment of the small nucleolar ribonucleoprotein-associated protein GAR1 that is sufficient for nucleolar accumulation. *J. Biol. Chem.* 269:18499-18506.

Girard, J.-P., Lehtonen, H., Caizergues-Ferrer, M., Almaric, F., Tollervey, D. et B. Lapeyre. (1992) GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J.* 11:673-682.

Good, L. et R. N. Nazar. (1992) An improved thermal cycle for two-step PCR-based targeted mutagenesis. *Nuc. Acids Res.* 20:4934.

Görlich, D., Vogel, F., Mills, A. ., Hartmann, E. et R. A. Laskey. (1995) Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature.* 377:246-248.

Gross, S. et C. Moore. (2001) Five subunits are required for reconstitution of the cleavage and polyadenylation activities of *Saccharomyces cerevisiae* cleavage factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 6080-6085.

Grummt, I. (1999) Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62:109-154.

Gunther, M., Laithier, M. et O. Brison. (2000) A set of proteins interacting with transcription factor Sp1 identified in a two-hybrid screening. *Mol. Cell. Biochem.* 210:131-142.

Guthrie, C. et G. R. Fink. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

Hannan, K.M., Hannan, R.D., Rothblum, L.I. (1998) Transcription by RNA polymerase I. *Front Biosci.* 26:376-398.

Harlow, E. et D. Lane. (1988) *Antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P. et J.J. Jacoby. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 32:671-680.

Henras, A., Dez, C., Noaillac-Depeyre, J., Henry, Y., et M. Caizergues-Ferrer. (2001) Accumulation of H/ACA snoRNPs depends on the integrity of the conserved central domain of the RNA-binding protein Nhp2p. *Nuc. Acids Res.* 29:2733-2746.

Henras, A., Henry, Y., Bousquet-Antonelli, C., Noaillac-Depeyre, J., Gélugne, J.P. et M. Caizergues-Ferrer. (1998) Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.* 17:7077-7090.

Hill, J., Donald, K.A., Griffiths, D.E., et G. Donald. (1991) DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nuc. Acids Res.* 19(20):5791

Ho, C.K. et S. Shuman. (1996) Physical and functional characterization of the double-stranded RNA binding protein encoded by the vaccinia virus E3 gene. *Virology* 217:272-284.

Hong, B., Brockenbrough, J.S., Wu, P. et J.P. Aris. (1997) Nop2p is required for pre-rRNA processing and for 60S ribosome subunit synthesis in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 17:378-388.

Hong, B., Wu, K., Brockenbrough, J.S., Wu, P. et J.P. Aris. (2001) Temperature sensitive *nop2* alleles defective in synthesis of 25S rRNA and large ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl. Acids Res. 29:2927-2937.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W., Figgeys, D. et M. Tyers. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. Nature 415:180-183.

Huang, Y. (2002) Transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Nucleic Acids Res. 30:1465-1482.

Hughes, J.M.X. et M.J. Ares. (1991) Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. EMBO J. 10:4231-4239.

Hu, J.C. (1995) Repressor fusions as a tool to study protein-protein interactions. Structure. 3:431-433.

Iino, Y. et M. Yamamoto (1985) Mutants of *Schizosaccharomyces pombe* which sporulate in the haploid state. Mol. Gen. Genet. 198:416-421.

Iino, Y., Sugimoto, A. et M. Yamamoto. (1991) *S. pombe* *pac1+*, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III-like RNase. EMBO J. 10:21-226.

Itoh, N., H. Yamada, Y. Kaziro, et K. Mizumoto. (1987) Messenger RNA guanylyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*: large scale purification, subunit functions, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 262:1989-1995.

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., et Y. Sakaki. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:4569-4574.

Ito, T., Tashiro, K., Muta, S., Ozawa, R., Chiba, T., Nishizawa, M., Yamamoto, K., Kuhura, S. et Y. Sakaki. (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:1143-1147.

Iovine, M.K., Watkins, J.L. et S.R.Wente. (1995) The GLFG repetitive region of the nucleoporin Nup116p interacts with Kap95p, an essential yeast nuclear import factor. *J. Cell. Biol.* 131:1699-1713.

Jacob, S.T., Ghosh, A.K. (1999) Control of RNA polymerase I-directed transcription: recent trends. *J. Cell. Biochem. Suppl* 32-33:41-50.

James, P., Halladay, J. et E. A. Craig. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* 144:1425-1436.

Jungmann, J., Reins, H.-A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D. et S. Jentsch. (1993) MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *The EMBO J.* 12:5051-5056.

Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. ET R.H. Plasterk. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15:2654-2659.

Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M. et A. Pastore. (1995) Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III. *EMBO J.* 14:3572-3584.

Kief, D.R., et J.R. Warner. (1981) Coordinate control of synthesis of ribosomal ribonucleic acid and ribosomal proteins during nutritional shift-up in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1:1007-1015

King, R.D. et M.J.E. Sternberg. (1996) Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Science*, 5: 2298-2310.

Koonin, E.V. (1996) Pseudouridine synthases: four families of enzymes containing a putative uridine-binding motif also conserved in dUTPases and dCTP deaminases. *Nuc. Acids Res.* 24:2411-2415.

Kufel, J., Dichtl, B. et D. Tollervey. (1999) Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not in the 5' ETS. *RNA.* 5:909-917.

Labbé, S. et D. J. Thiele. (1999) Copper ion inducible and repressible promoter systems in yeast. *Methods Enzymol.* 306:145-153.

Lafontaine, D.L. Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M. et D. Tollervey. (1998) The box H+ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes & Dev.* 12:527-537.

Lafontaine, D.L. et D. Tollervey. (1999) Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA.* 5:455-467.

Lafontaine, D.L. et D. Tollervey. (2000) Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs. *Mol. Cell. Biol.* 20:2650-2659.

Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J., S. Abou Elela. (2001) The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3:71-78.

Lamontagne, B. et S. Abou Elela. (2001) Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Rnt1p nuclease. *Methods Enzymol.* 342:159-167.

Lamontagne, B., Tremblay, A. et S. Abou Elela. (2000) The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol. Cell. Biol.* 20:1104-1115.

Lebars, I., Lamontagne, B., Yoshizawa, S., Abou Elela, S. et D. Fourmy. (2001) Solution structure of conserved AGNN tetraloops: insights into Rnt1p RNA processing. *EMBO J.* 20:7250-7258.

Lee, D. C. Y. et J. D. Aitchison. (1999) Kap104p-mediated nuclear import: Nuclear localization signals in mRNA binding proteins and the role of RAN and RNA. *J. Biol. Chem.* 274:29031-29037.

Li, H.V. Zagorski, J. et M.J. Fournier. (1990) Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:1145-1152.

Li, Z., Pandit, S. et M.P. Deutscher. (1999) Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA.* 5:139-146.

Li, Z., Pandit, S. et M.P. Deutscher. (1999) RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 18:2878-2885.

Liu, Q., Li, M. Z., Leibham, D., Cortez, D. et S. J. Elledge. (1998) The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr. Biol.* 8:1300-1309.

Liu, Q., Li, M. Z., Liu, D. et S. J. Elledge. (2000) Rapid construction of recombinant DNA by the univector plasmid-fusion system. *Methods Enzymol.* 328:530-549.

Manche, L., Green, S.R., Schmedt, C. et M.B. Mathews. (1992) Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol. Cell. Biol.* 12:5238-5248.

March P.E et M.A. Gonzalez. (1990) Characterization of the biochemical properties of recombinant ribonuclease III. *Nucleic Acids Res.* 18(11):3293-3298.

Matsuda, S., Ichigotani, Y., Okuda, T., Irimura, T., Nakatsugawa, S. et M. Hamaguchi. (2000) Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1490:163-169.

McLeod, M. et D. Beach. (1988) A specific inhibitor of the ran1+ protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* 332:509-514.

Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. et D. Tollervey. (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell.* 91:457-466.

Morrissey, J.P. et D. Tollervey. (1993) Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 13:2469-2477.

Nagel, R. et M. Ares Jr. (2000) Substrate recognition by a eukaryotic RNase III: the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p selectively binds RNA containing a 5'-AGNN-3' tetraloop. *RNA*, 6:1142-1156.

Nanduri, S., Carpick, B.W., Yang, Y., Williams, B.R.G. et J. Qin. (1998) Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *EMBO J.* 17:5458-5465.

Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B.R.G. et J. Qin. (2000) A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J.* 19:5567-5574.

Nicholson, A. W. (1996) Structure, reactivity, and biology of double-stranded RNA. *Prog. in Nucleic Acids Res. and Mol. Biol.* 52:1-65.

Nicholson, R.H. et A.W. Nicholson. (2002) Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm. Genome.* 12:67-73.

Nierras, C.R. et J.R. Warner. (1999) Protein kinase C enables the regulatory circuit that connects membrane synthesis to ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274:13235-13241.

Ozier-Kalogeropoulos, O., Malpertuy, A., Boyer, J., Tekai, F. et B. Dujon. (1998) Random exploration of the *Kluyveyromyces lactis* genome and comparison with that of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 26:5511-5524.

Patel, R.C. et G.C. Sen (1998) Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 18:7009-7019.

Patel, R.C., Stanton, P. et G.C. Sen. (1996) Specific mutations near the amino-terminus of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) differentially affect its double-stranded RNA binding and dimerization properties. *J. Biol. Chem.* 271:25657-25663.

Patel, R.C., Stanton, P., McMillan, N.M.J., Williams, B.R.G. et G.C. Sen. (1995) The interferon-inducible double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR, self-associates *in vitro* and *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8283-8287.

Pellizzoni, L., Baccon, J., Charroux, B. et G. Dreyfuss. (2001) The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. Curr. Biol. 11:1079-1088.

Potashkin, J., et D. Frendewey. (1990) A mutation in a single gene of *Schizosaccharomyces pombe* affects the expression of several snRNAs and causes defects in RNA processing. EMBO J. 9:525-534.

Powers, T. et P. Walter. (1999) Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell. 10:987-1000.

Qu, L. H., Henras, A., Lu, Y. J., Xhou, H., Zhou, W. X., Zhu, Y. Q., Zhao, J., Henri, Y., Caizergues-Ferrer, M. et J. P. Bachellerie. (1999) Seven novel methylation guide small nucleolar RNAs are processed from a common polycistronic transcript by Rat1p and RNase III in yeast. Mol. Cell. Biol. 19:1144-1158.

Ramos, A., Grünert, S., Adams, J., Mickle, D.R., Proctor, M.R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D. et G. Varani. (2000) RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. EMBO J. 19:997-1009.

Reid, R., Greene, P.J. et D.V. Santi. (1999) Exposition of a family of RNA m(5)C methyltransferases from searching genomic and proteomic sequences. Nucl. Acids Res. 27:3138-3145.

- Reynolds, A., Lundblad, V., Dorris, D. et M. Keaveney. (1997) Yeast vectors and assays for expression of cloned genes. *Dans* Current Protocols in Molecular Biology (F.A. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith et K. Struhl, eds.) pp. 13.6.1-13.6.5, John Wiley & Sons, New York.
- Robertson, H.D., Webster, R.E. et N.D. Zinder. (1968) Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243:82-91.
- Rohde, J., Heitman, J. et M.E. Cardenas. (2001) The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J. Biol. Chem.* 276:9583-9586.
- Rose, M.D., Winston, F. et P. Hieter. (1990) Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Rotondo, G., Gillespie, M. et D. Frenthewey. (1996) Purification and characterization of the Pac1 ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acids Res.* 24:2377-2386.
- Rotondo, G., Gillespie, M. et D. Frenthewey. (1995) Rescue of the fission yeast sbRNA synthesis mutant *smn1* by overexpression of the double-strand-specific Pac1 ribonuclease. *Mol. Gen. Genet.* 247:698-708.
- Rotondo, G., Huang, J.Y., et D. Frenthewey. (1997) Substrate structure requirements of the Pac1 ribonuclease from *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA* 3:1182-1193.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. et B.T. Chait. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148:635-651.
- Rymond, B.C., Zitomer, R.S., Schumperli, D. et M. Rosenberg. (1983) The expression in yeast of the *Escherichia coli galk* gene on *CYC1::galk* fusion plasmid. *Gene* 25:249-262.

Ryter, J.M. et S.C. Schultz. (1998) Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* 17:7505-7513.

Sambrook, J., Fritsh, E. F. et T. Maniatis. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ième édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R. et E.C. Hurt. (1989) A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J.* 8:4015-4024.

Seipelt, R. L., Zheng, B., Asuru, A. et B. C. Rymond. (1999) U1 snRNA is cleaved by RNase III and processed through an Sm site-dependent pathway. *Nucleic Acids Res.* 27:587-595.

Sharp, T.V., Romashko, A., Moonan, F., Joshi, B., Barber, G.N. et R. Jagus (1998) The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and substrate binding region of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* 250:302-315.

Shulman, R.W., Sripathi, C.E. et J.R. Warner. (1977) Noncoordinated transcription in the absence of protein synthesis in yeast. *J. Biol. Chem.* 252:1344-1349.

Spasov, K., Perdomo, L.I., Evakine, E. et R.N. Nazar. (2002) RAC protein directs the complete removal of the 3'external transcribed spacer by the Pac1 nuclease. *Mol. Cell.* 9:433-437.

St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G. et M. Jantsch. (1992) A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10979-10983.

Strawn, L.A., Shen, T. et S.R. Wentz. (2001) The GLFG regions of Nup116p and Nup100p serve as binding sites for both Kap95p and Mex67p at the nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.* 276:6445-6452.

Sun, C. et J.L. Woolford Jr. (1994) The yeast *NOP4* gene product is an essential nucleolar protein required for pre-rRNA processing and accumulation of 60S ribosomal subunits. *EMBO J.* 13:3127-3135.

Sun, C. et J.L. Woolford Jr. (1997) The yeast nucleolar protein Nop4p contains four RNA recognition motifs necessary for ribosome biogenesis. *J Biol Chem.* 272:25345-25352.

Sun, W., Jun, E. et A.W. Nicholson. (2001) Intrinsic double-stranded-RNA processing activity of *Escherichia coli* ribonuclease III lacking the dsRNA-binding domain. *Biochemistry* 40:14976-14984.

Takata, R., Mukai, T. et K. Hori. (1987) RNA processing by RNase III is involved in the synthesis of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase. *Mol. Gen. Genet.* 209:28-32.

Talkad, V., Achord, D. et D. Kennell. (1978) Altered mRNA metabolism in ribonuclease III-deficient strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 135:528-541.

Tan, S.-L., Gale, Jr., M.J. et M.G. Katze (1998) Double-stranded RNA-independent dimerization of interferon-induced protein kinase PKR and inhibition of dimerization by cellular P58^{IPK} inhibitor. *Mol. Cell. Biol.* 18:2431-2443.

Tollervey, D. (1987) A yeast small nuclear RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. *EMBO J.* 6:4169-4175.

Tremblay, A., Lamontagne, B., Catala, M., Yam, Y., Larose, S., Good, L. et S. Abou Elela. (2002) A physical interaction between Gar1p and Rnt1p is required for the nuclear

import of H/ACA small nucleolar RNA-associated proteins. *Mol. Cell. Biol.* 22:4792-4802.

Tsujii, R., Miyoshi, K., Tsuno, A., Matsui, Y., Toh-e, A., Miyakawa, T. et K. Mizuta. (2000) Ebp2p, yeast homologue of a human protein that interacts with Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, is required for pre-rRNA processing and ribosomal subunit assembly. *Genes Cells.* 5:543-553.

Tsuno, A., Miyoshi, K., Tsujii, R., Miyakawa, T. et K. Mizuta. (2000) RRS1, a conserved essential gene, encodes a novel regulatory protein required for ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20:2066-2074.

Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. et J.M. Rothberg. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 403:623-627.

Venema, J. et D. Tollervey. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33:261-311.

Warner, J.R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24:437-440.

Watanabe, Y., Iino, Y., Furuhata, K., Shimoda, C. et M. Yamamoto. (1988) The *S. pombe mei2* gene encoding a crucial molecule for commitment to meiosis is under the regulation of cAMP. *EMBO J.* 7:761-767.

Watkins, N.J., Gottschalk, A., Neubauer, G., Kastner, B., Fabrizio, P., Mann, M. et R. Luhrmann. (1998) Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative

RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure. *RNA* 4:1549-1568.

Watkins, N.J., Segault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C. et R. Luhrmann. (2000) A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell*. 103:457-466.

Wu, H., Xu, H., Miraglia, L.J. et S.T. Crooke. (2000) Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J. Biol. Chem.* 275:36957-36965.

Wu, H., Yang, P.K., Butcher, S.E., Kang, S., Chanfreau, G. et J. Feigon. (2001) A novel family of RNA tetraloop structure forms the recognition site for *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. *EMBO J.* 20:7240-7249.

Wu, P., Brockenbrough, J.S., Metcalfe, A.C., Chen, S. et J.P. Aris. (1998) Nop5p is a small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18 S rRNA processing in yeast. *J. Biol. Chem.* 273:16453-16463.

Wu, S. et R.J. Kaufman. (1997) A model for the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent dimerization and activation of the dsRNA-activated protein kinase PKR. *J. Biol. Chem.* 272:1291-1296.

Wu, S. et R.J. Kaufman. (1996) Double-stranded (ds) RNA binding and not dimerization correlates with the activation of the dsRNA-dependent protein kinase (PKR). *J. Biol. Chem.* 271:1756-1763.

Xu, H.P., Riggs, M., Rodgers, L. et M. Wigler. (1990) A gene from *S. pombe* with homology to *E. coli* RNase III blocks conjugation and sporulation when overexpressed in wild type cells. *Nucleic Acids Res.* 18:5304.

Young, R.A. et J.A. Steitz. (1978) Complementary sequences 1700 nucléotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:3593-3597.

Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J. et M.C. Schultz. (1998) Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 18:4463-4470.

Zebarjadian, Y., King, T., Fournier, M. J., Clarke, L. et J. Carbon. (1999) Point mutations in yeast CBF5 can abolish *in vivo* pseudouridylation of rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19:7461-7472.

Zeng, X. et J.C. Hu. (1997) Detection of tetramerization domains *in vivo* by cooperative DNA binding to tandem lambda operator sites. *Gene.* 185:745-749.

Zeng, X., Zhu, H., Lashuel, H.A. et J.C. Hu. (1997) Oligomerization properties of GCN4 leucine zipper *e* and *g* position mutants. *Protein Sci.* 6:2218-2226.

Zhang, F., Romano, P.R., Nagamura-Inoue, T., Tian, B., Dever, T.E., Mathews, M.B., Ozato, K. et A.G. Hinnebusch. (2001) Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. *J. Biol. Chem.* 276:24946-24958.

Annexe I

The N-Terminal Domain That Distinguishes Yeast from Bacterial RNase III Contains a Dimerization Signal Required for Efficient Double-Stranded RNA Cleavage

BRUNO LAMONTAGNE, ANNIE TREMBLAY, AND SHERIF ABOU ELELA*

Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

Received 1 September 1999/Returned for modification 18 October 1999/Accepted 17 November 1999

Yeast Rnt1 is a member of the double-stranded RNA (dsRNA)-specific RNase III family identified by conserved dsRNA binding (dsRBD) and nuclease domains. Comparative sequence analyses have revealed an additional N-terminal domain unique to the eukaryotic homologues of RNase III. The deletion of this domain from Rnt1 slowed growth and led to mild accumulation of unprocessed 25S pre-rRNA. In vitro, deletion of the N-terminal domain reduced the rate of RNA cleavage under physiological salt concentration. Size exclusion chromatography and cross-linking assays indicated that the N-terminal domain and the dsRBD self-interact to stabilize the Rnt1 homodimer. In addition, an interaction between the N-terminal domain and the dsRBD was identified by a two-hybrid assay. The results suggest that the eukaryotic N-terminal domain of Rnt1 ensures efficient dsRNA cleavage by mediating the assembly of optimum Rnt1-RNA ribonucleoprotein complex.

RNase III is a double-stranded-RNA (dsRNA)-specific endoribonuclease that introduces staggered cuts on each side of the RNA helix (28). In bacteria, RNase III is involved in processing pre-rRNA, tRNA, and phage polycistronic mRNA (7). Depletion of RNase III perturbs the expression level of about 10% of the bacterial proteins, suggesting a global role in gene regulation (10). Two eukaryotic homologues of RNase III were experimentally identified in *Saccharomyces cerevisiae* (Rnt1) (2) and *Schizosaccharomyces pombe* (Pac1) (14, 35, 41). In addition, database searches revealed homologues in the worm, mouse, and human (5, 35). Rnt1 was shown both in vivo and in vitro to process pre-rRNA (2, 18), three small nuclear RNAs (snRNAs) (1, 4, 40), and several small nucleolar RNAs (snoRNAs) (5, 6, 31). Similarly, Pac1 cleaves the 3' end of U2 snRNA and the 3' end of 25S rRNA (36, 37, 43). Also, it has been suggested that Pac1 plays a role in cell division, mating, and sporulation (14, 41). RNase III, Rnt1, and Pac1 cleave duplex RNAs longer than 20 nucleotides in vitro while their primary targets in vivo are intramolecular stem-loop structures (2, 33, 37). The basic features of the RNA cleavage mechanism appear to be similar for all three ribonucleases, but differences also exist that prevent free substrate exchange and genetic complementation (37).

Bacterial RNase III has two functionally and structurally separable subdomains: a C-terminal dsRNA-binding domain (dsRBD) and an N-terminal nuclease domain (8, 17). The dsRBD motif is located in the last 74 amino acids (aa) and adopts a tertiary fold consisting of two helices separated by three β -strands (17). This tertiary structure is conserved throughout the family of dsRNA binding proteins including the RNA-dependent kinase (PKR) (27) and the *Drosophila* staufen protein (3). The isolated dsRBD from *Escherichia coli* RNase III binds RNA to form a RNA-protein complex (17; A. Nicholson, personal communication). The solution structure of the bacterial RNase III dsRBD (17) and the protein-RNA

cocrystal structure of frog dsRNA binding protein A (38) suggest multiple RNA-protein contacts involving the two α -helices and the loop between the first two β -strands of the dsRBD. The structure of the N-terminal nuclease domain of RNase III is not known, but many mutations have helped identify the main features required for RNA cleavage (8, 28). The nuclease domain contains two stretches of conserved acidic amino acid residues at positions 37 to 47 and positions 60 to 74 (7, 28). These amino acids play either a key role in catalysis or an essential structural role. Mutations in these two regions abolish RNA cleavage without affecting RNA binding (21, 28).

Yeast Rnt1 shares with bacterial RNase III the main structural features of the nuclease domain and dsRBD, suggesting that they have similar functions (2). However, unlike the bacterial enzyme, eukaryotic Rnt1 possesses an N-terminal domain. The N-terminal domain constitutes 36% of the total Rnt1 protein with no significant homology to other eukaryotic homologues of RNase III, and it has no known function. To determine the function of the N-terminal domain and verify the activities of dsRBD and the nuclease domain, we have constructed a series of deletions separating the different domains of Rnt1 and tested them for RNA binding and cleavage. Here we show that dsRBD is sufficient for RNA binding and that the nuclease domain is required for RNA cleavage. Direct analysis of the N-terminal deletion effects on RNA binding and cleavage reveals an auxiliary role ensuring efficient RNA cleavage. Deletion of the N-terminal domain reduces the processing of the 25S rRNA 3' end by about 30% in vivo and slows growth by 35 to 40%. Biochemical and genetic assays suggest that the N-terminal domain influences Rnt1 function by mediating both inter- and intramolecular interactions.

MATERIALS AND METHODS

Strains and plasmids. Yeast was grown and manipulated by standard procedures (11, 34). The Δ RNT1 cell is the haploid BMA64 strain carrying chromosomal disruption of RNT1 (6). Yeast PJ69-4A (*MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 (LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ)*) was used for the yeast two-hybrid assays (15). λ KH54, the *E. coli* strain AG1688 (MC1061 F'128 *lacI^q lacZ::Tn5*), and plasmids pJH391, pFG157 and pKH101 (42) were used in the λ repressor system.

Plasmids used for protein expression were produced by cloning the PCR-amplified fragments of RNT1 in the bacterial expression vector pQE (Qiagen

* Corresponding author. Mailing address: Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4. Phone: (819) 564-5275. Fax: (819) 564-5392. E-mail: sabou@courrier.usherb.ca.

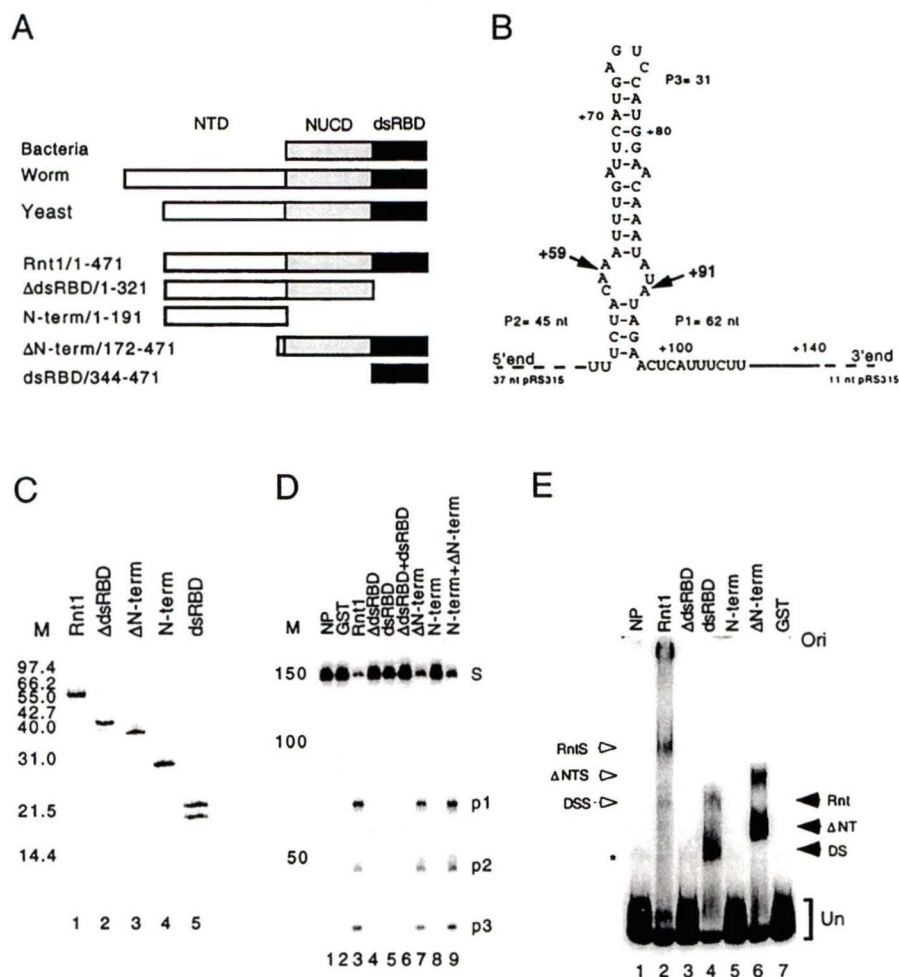


FIG. 1. Purification and in vitro analysis of Rnt1 domains. (A) On top is shown a comparison of the functional domains of RNase III between bacteria, worms, and yeast. All members of the RNase III family possess a nuclease domain (NUCD) and a dsRNA binding domain (dsRBD). The N-terminal domain (NTD) is unique to the eukaryotic members of the RNase III family. Sequence alignment was performed using CLUSTALW (13). A schematic representation of Rnt1 fragments and the associated functional domains is shown at the bottom. The expressed segments of Rnt1 are indicated in amino acids on the left. (B) Illustration of the U5 3'-end model substrate. The cleavage sites are indicated by arrows. The numbers are relative to the U5 snRNA mature 3' end. The dotted line represents the vector sequence (pRS315). (C) Purification of the N-terminal His₆-tagged Rnt1 fragments. All proteins were purified on metal chelating affinity columns. The N-term protein was repurified using hydrophobic interaction chromatography. Aliquots from the last purification step of each protein were fractionated on SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue R. The upper band in the dsRBD lane corresponds to a readthrough of the natural stop codon of *RNT1* to a bacterial stop codon downstream. The protein molecular weight markers are indicated on the left in thousands. (D) In vitro cleavage assay of Rnt1 derivatives, using the 3' end of U5 as a model substrate. The 138-nucleotide substrate was incubated with no protein (lane 1), GST (lane 2), Rnt1 (lane 3), one of the four different Rnt1 deletions (lanes 4, 5, 7, and 8), or combinations of two different deletions (lanes 6 and 9). On the right, the position of the substrate and the different cleavage products are indicated as follows: S, full-length 138-nucleotide substrate; P1, 62-nucleotide 3'-end cleavage product; P2, 45-nucleotide 5'-end cleavage product; P3, middle 31-nucleotide cleavage product. The DNA molecular weight markers are indicated on the left. (E) Gel retardation assay of Rnt1 derivatives. The RNA was incubated with no protein (lane 1), Rnt1 (lane 2), one of the four different deletions (lanes 3, 4, 5, and 6), or GST (lane 7). The reaction was carried out in 25 mM KCl at 4°C, and the products were loaded on a 4% native gel. The positions of the shifted RNAs are indicated by solid arrowheads (Rnt, ΔNT, and DS) on the right. The positions of supershifted RNAs are indicated by open arrowheads (RntS, ΔNTS, and DSS) on the left. The band indicated by the asterisk is a differently folded form of single-stranded RNA. The positions of the origin (ori) and unbound (Un) RNA are indicated on the right.

Inc., Mississauga, Ontario, Canada). pQE31/RNT1 was made by inserting a PCR fragment into the *Bam*HI-*Sal*I sites of pQE31 (primers 5'-CAAGCTTTGGATCCAATGGGCTC-3' and 5'-CCATCATGGTTCGACTAAAAGGAACG-3'). pQE31/ΔN-term was made by inserting a PCR fragment lacking the first 517 nucleotides of *RNT1* into the *Bam*HI-*Sal*I sites of pQE31 (5'-GAAAATTTGGATCCAAGGAAGATG-3' and 5'-CCATCATGGTTCGACTAAAAGGAACG-3'). pQE31/ΔdsRBD was produced by inserting a DNA fragment containing a stop codon 1,038 nucleotides from the first AUG of *RNT1*. The resulting protein contains an extra 15 aa (FEASRCRKHSGRKGKGC) at the C terminus. pQE30/dsRBD was made by cloning the 403-nucleotide *Hind*III fragment in the *Hind*III site of pQE30. pQE31/N-term was made by deletion of the 3'-end *Eco*RV-*Hind*III fragment of pQE31/RNT1.

Rnt1 was expressed in vivo using the yeast expression vectors pCU425 (19), pGBDU series (15), and pACT2 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, Calif.). pCU425/ΔNT2 was generated by inserting a PCR fragment into the *Sma*I site of

pCU425 (primers 5'-GAAAATTTCTCGAGAATGGAAGATG-3' and 5'-AACAGCTATGACCATG-3'). BD/RNT1 was produced by inserting the *RNT1* gene in the *Bam*HI-*Sal*I sites of pGBDU-C3. BD/ΔDS1 was generated by deleting a *Pst*I fragment from BD/RNT1. BD/ΔCT was generated by a deletion of *Avr*II fragment from BD/RNT1. BD/NT1 was generated by deleting a *Pvu*II-*Sal*I fragment from BD/RNT1. BD/ΔNT1 was made by deleting a *Bam*HI-*Pvu*II fragment from BD/RNT1. BD/ΔNT2 was made by inserting a BD/RNT1 *Eco*RV fragment into the *Sma*I-*Eco*RV sites of pGBDU-C1. BD/ΔNT3 was generated by deleting an *Eco*RI fragment from BD/RNT1. BD-DS1 was generated by inserting *Bam*HI-*Xho*I containing the last 383 nucleotides of *RNT1* into pGBDU-C1. AD/RNT1 was made by inserting a BD/RNT1 fragment into the *Bam*HI-*Bgl*II sites of pACT2. AD/NT2 was generated by inserting a blunt-ended *Bam*HI-*Nhe*I fragment from pQE31/N-term in a blunt-ended *Bam*HI site of pACT2. AD/ΔDS was generated by inserting a *Sma*I-*Hind*III fragment from BD/RNT1 into the

pACT2 *SmaI* site. BD/NT2 was produced by inserting a *SmaI-XhoI* fragment from AD/NT2 into the *SmaI-SalI* sites of pGBDU-C3.

pJH/RNT1 used in the λ repressor assay was made by inserting a blunt-ended *BglII-EcoRI* fragment generated by partial digestion of BD/RNT1 into the blunt-ended *Sall-BamHI* sites of pJH391.

Protein purification. All recombinant proteins in this work were produced either in *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Promega Corp., Madison, Wis.), *E. coli* M15(pREP4) (Qiagen Inc.), or *E. coli* DH5 α F' (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Recombinant proteins were purified on a Ni-nitrilotriacetic acid agarose column (Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada) as described previously (16) with the following modifications. The first purification step was performed with Nickel buffer (25% glycerol, 1 M NaCl, 30 mM Tris [pH 8.0]). Protein fractions were pooled and passed through a second column with Nickel buffer without glycerol. Further purification of the N-terminal protein was performed on a HIC ISO column (Pharmacia Biotech Inc.) with a 0.05 to 1.5 M gradient of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.5. The pure protein was collected in the unbound fraction. All purifications were conducted using the AKTA explorer fast protein liquid chromatography system (Pharmacia Biotech Inc.). The protein fractions were dialyzed against dialysis buffer (50% glycerol, 0.5 M KCl, 30 mM Tris [pH 8.0], 0.1 mM dithiothreitol [DTT], 0.1 mM EDTA [pH 8.0]) and stored at -20 or -80°C for long-term storage. The identity of the two proteins produced by the plasmid pQE30/dsRBD (Fig. 1C) was confirmed by monitoring the expression patterns of the two proteins and using Western blot analysis. Tests for RNA binding and dimerization confirm that the two proteins have similar activities.

Enzymatic assays. The radiolabeled RNA used as a substrate in the enzymatic assays was generated by T7 RNA polymerase in the presence of $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$. The RNA substrate was produced from a T7 promoter of plasmid pRS315/U5. To make this plasmid, a blunt-ended *NheI* fragment generated by PCR with primers 5'-CTTTTCTATTGCTAGCTTTCTAC-3' and 5'-GCTAGCAAATGCTTCAA TGAG-3' was cloned in the blunt-ended *XbaI* site of pRS315. For the *in vitro* cleavage, 200 fmol of substrate was incubated for 10 min at 30°C in 10 μl of reaction buffer (30 mM Tris [pH 7.5], 5 mM spermidine, 10 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA [pH 7.5]). The general effects of salt, N-terminal deletion, or N-terminal addition were confirmed using a wide range of substrate and protein concentrations. The amount of KCl used is indicated in the description of each experiment. The reaction was stopped by addition of a stop buffer (20 mM EDTA [pH 7.5] and 0.1% bromophenol blue in formamide) and directly loaded on denaturing 8% polyacrylamide gel. The cleavage rate was calculated using the Molecular Analyst programs (Bio-Rad Industries, Hercules, Calif.).

Gel mobility shift assay and in-gel cleavage assay. RNA binding reactions were performed using 2 fmol of radiolabeled RNA in 20 μl of binding buffer (20% glycerol, 30 mM Tris [pH 7.5], 5 mM spermidine, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA [pH 7.5]) for 10 min on ice. The amount of KCl and protein are indicated for each experiment. The reactions were fractionated on a 4% nondenaturing polyacrylamide gel at 0.5 V/cm² and 4°C . The in-gel cleavage assay was performed by cutting the bands corresponding to different complexes formed in the gel mobility shift assay and incubating them in a cleavage buffer (30 mM Tris [pH 7.5], 5 mM spermidine, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA [pH 7.5], 20 mM MgCl_2) at 30°C for 40 min. After the incubation period was complete, the gel pieces were removed and the RNA was extracted and loaded on 8% denaturing polyacrylamide gels.

RNase protection assay. A probe complementary to the 3' end of 25S rRNA and the 3' external transcribed spacer (ETS) was produced by T7 transcription (2). Total RNA (10 μg) was incubated at 42°C for 12 h with 10^5 cpm of probe in 80% formamide hybridization buffer (25). The hybridization mix was digested with 2 μg of RNase T₁ per ml for 1 h at 30°C , extracted with phenol-chloroform, ethanol precipitated, and loaded on a 6% polyacrylamide gel.

Gel filtration assay. A Superdex 200 HR 10/30 column (Pharmacia Biotech Inc.) (10 by 300 to 310 mm) was equilibrated in gel filtration buffer (50 mM sodium phosphate [pH 7.5], 2 mM EDTA [pH 7.5], 0.5 M KCl) at 23°C and calibrated with low- and high-molecular-weight markers (Pharmacia Biotech Inc.). For sample application, 245 μg of each protein was applied to the column and 250- μl fractions were collected and analyzed on sodium dodecyl sulfate (SDS) gels (20).

Protein cross-linking. Cross-linking experiments were performed as described previously (24). Purified proteins (0.3 μg) were incubated for 10 min at 30°C in 10 μl of gel filtration buffer with increasing concentration of freshly diluted glutaraldehyde (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada). The cross-linked proteins were analyzed by standard SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and detected by silver staining.

Yeast two-hybrid assays. Plasmids encoding the appropriate AD- and BD-RNT1 fusion were cotransformed in yeast PJ69-4A using a modified lithium acetate method (39). The cells harboring both plasmids were selected on SCD medium (11) lacking lysine, uracil, and leucine. The two-hybrid interactions were indicated by the ability of a pair of plasmids to activate the three test promoters in PJ69-4A (15). Three or four independent transformants for each plasmid pair were tested on medium lacking either adenine or histidine. The histidine-containing media were supplemented with 10 mM 3-aminotriazole to avoid basal expression of histidine (15). The activation of the third reporter gene was tested by β -galactosidase liquid assay as described earlier (32). Cells were harvested in

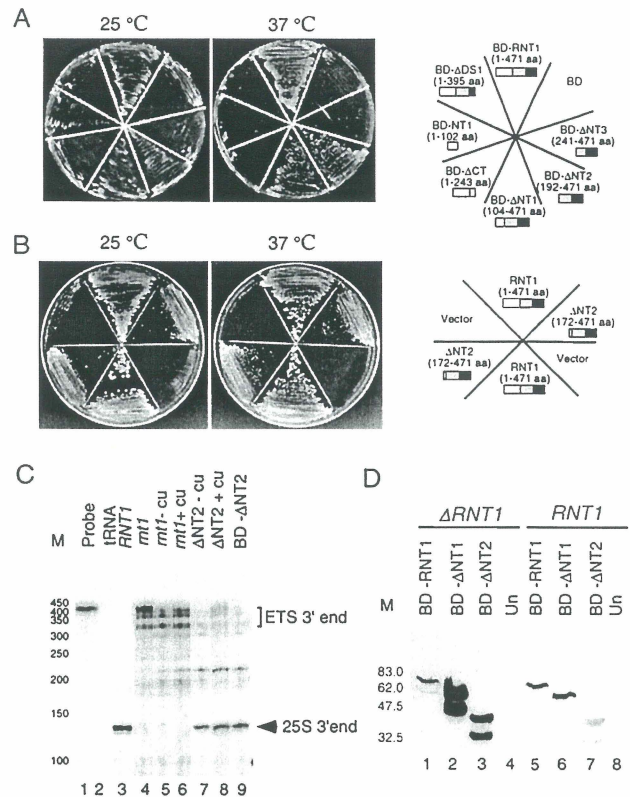


FIG. 2. The N-terminal domain of Rnt1 is not essential for growth at 37°C . (A) Cells lacking the *RNT1* gene were transformed with a series of *RNT1* deletions fused with a nuclear localization signal from the *GAL4* BD. The transformed yeast cells were streaked on minimal medium without uracil and incubated at 25 or 37°C . The position of each deletion is indicated on the right. The boxes illustrate deletions of the N-terminal domain (white), nuclease domain (light gray), and dsRBD (black). (B) Expression of the N-terminal deletion of Rnt1 from an inducible promoter without a nuclear localization signal. Segment 172 to 471 of Rnt1 was cloned under a copper-inducible promoter and transformed in cells lacking Rnt1. The cells were grown on minimal medium containing 100 μM Cu^{2+} at either 25 or 37°C . Boxes represent Rnt1 segments as described in panel A. (C) Mapping the 3' end of 25S rRNA using an RNase protection assay. The RNA was extracted from cells lacking Rnt1 (lanes 4, 5, and 6), expressing Rnt1 (lane 3), or expressing N-terminal deletions (lanes 7, 8, and 9) with or without a nuclear localization signal. The RNA was hybridized to a probe complementary to the 3' end of the 25S pre-rRNA and digested with RNase T₁. The probe was also hybridized to *E. coli* tRNA as a control (lane 2). The positions of mature and extended 3' ends are indicated on the right. The DNA molecular weight markers are indicated on the left. (D) Western blot analysis of Rnt1 and Δ N-term proteins. Proteins were extracted from *RNT1* or Δ *RNT1* cells expressing different deletions of Rnt1 fused to the Gal4 BD. Equal amounts of proteins were separated on an SDS-polyacrylamide gel and examined using monoclonal antibodies against the Gal4 BD. Protein extracts from untransformed cells (Un) were included as control. The upper protein band in each lane corresponds to the expected size of the fusion protein. The lower band corresponds to a smaller protein that may result from either a pre-mature stop or degradation at the protein C terminus.

mid-logarithmic phase, and their ability to hydrolyze *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside was measured as previously described (26).

λ repressor system. The λ repressor assay was performed essentially as described previously (42). For the dot plaque assay, *E. coli* AG1688 transformed with either pJH/RNT1, pFG157, or pKH101 was grown to saturation in λ broth (1% tryptone, 0.25% NaCl, 0.2% maltose, 10 mM MgSO_4 , 50 μg of ampicillin per ml). A 300- μl volume of this bacterial culture was mixed in 3 ml of λ top agar (0.5% yeast extract and 0.7% agar in λ broth) and poured on a fresh plate of λ agar (λ broth, 1% agar), forming a bacterial lawn. Each lawn of bacteria was infected with a serial dilution of λ KH54 phage lysate containing between 5×10^4 and 5×10^8 PFU. Infected lawns were incubated for 18 h at 30°C , and the sizes of the resulting plaques were measured.

Western blot analysis. Yeast cells were grown to stationary phase in the appropriate SCD medium (11), and cellular proteins were extracted as previously

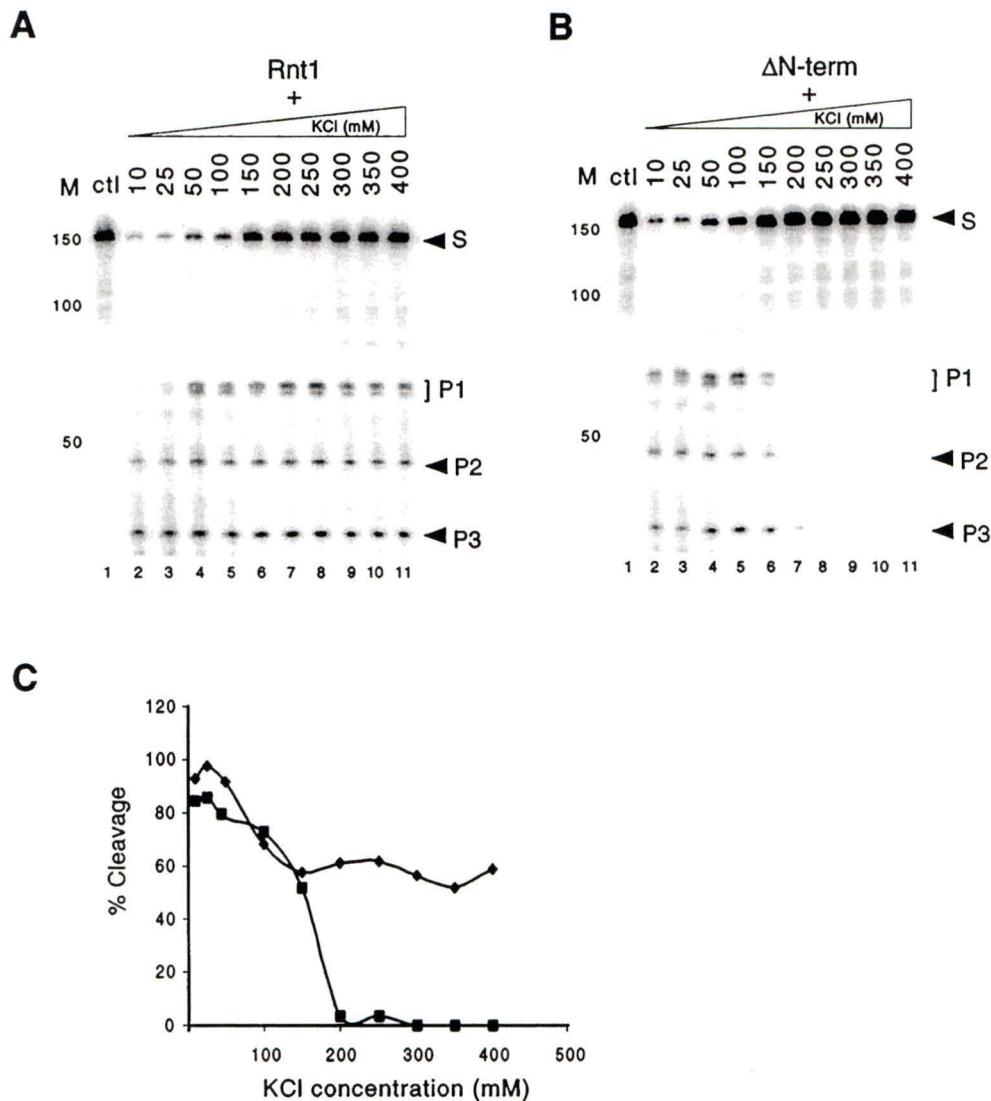


FIG. 3. Deletions of the N-terminal domain of Rnt1 impairs RNA cleavage at physiological KCl concentrations. Cleavage of the U5 snRNA 3' end by Rnt1 (A) or Δ N-term (B) in increasing salt concentrations is shown. In each panel, RNA incubated with GST under the same reaction conditions is included as a control (lane 1). The positions of the RNA substrate (S) and the cleavage products (P1, P2, and P3) are indicated on the right, and the DNA markers are indicated on the left. (C) Percent cleavage rate of Rnt1 (◆) and Δ N-term (■) versus concentration of KCl. Autoradiographs of gels similar to these in panel A and B were scanned and quantified using the Bio-Rad gel analysis system. The data points shown are the average of two different experiments.

described (39). Total proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (MSI, Westborough, Mass.). Western blot analysis was performed as described previously (12). Proteins were visualized using either monoclonal antibody against the Gal4 DNA binding domain or polyclonal antibody against the Gal4 activation domain (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif.). The protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL kit; Amersham, Arlington Heights, Ill.). The expression value of each fusion protein was estimated using the Molecular Analyst programs (Bio-Rad Industries).

RESULTS

The N-terminal domain of yeast RNase III is not essential for RNA binding and cleavage. Analysis of the Rnt1 sequence reveals three distinct domains; a 127-aa C-terminal domain containing a 74-aa dsRBD motif, a 154-aa central domain containing the RNase III nuclease motif, and a 191-aa N-terminal domain lacking significant homology to known proteins (Fig. 1A). To determine the contribution of the various

domains to Rnt1 function, we expressed them individually in bacteria and assayed their activity in vitro. Five different segments of Rnt1 were expressed as N-terminal His₆-tagged proteins. The five proteins are full-length Rnt1 (Rnt1), Rnt1 lacking the C-terminal 150 aa including the 74-aa dsRBD motif (Δ dsRBD), the 191-aa protein representing the N-terminal domain (N-term), a protein lacking the first 171 aa of the N-terminal domain (Δ N-term), and a 127-aa protein containing the full dsRBD motif (dsRBD). Following expression in bacteria, these proteins were purified on two successive nickel affinity columns, with the exception of the N-term protein, which was repurified by hydrophobic interaction chromatography. All proteins were expressed in soluble form and were purified under native conditions to a purity of 85 to 95%, as judged by Coomassie blue-stained gels (Fig. 1C).

To determine the function of each expressed Rnt1 fragment, we have examined each derivative for RNA cleavage and RNA

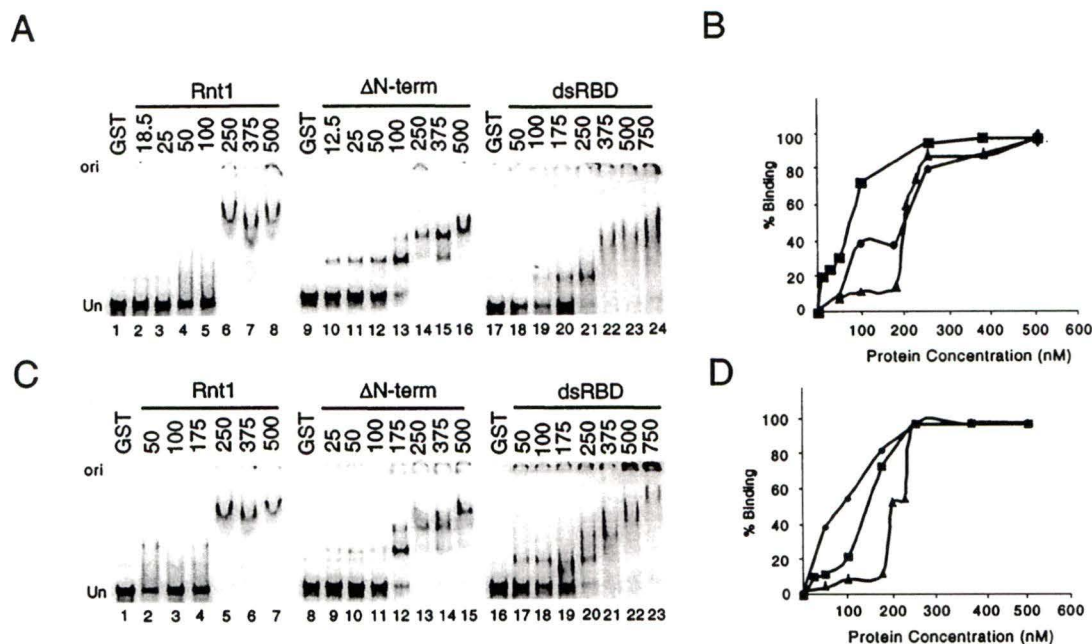


FIG. 4. Deletion of the N-terminal domain influences Rnt1 binding affinity. (A and C) Increasing concentrations of Rnt1, Δ N-term, or dsRBD were incubated with 2 fmol of U5 3'-end model substrate in 5 mM KCl (A) or 100 mM KCl (C). RNA incubated with GST under the same conditions is included as a control. The position of the gel origin (Ori) and unbound RNA (Un) are indicated on the left. (B and D) Quantitative analysis of RNA binding to Rnt1 (\blacktriangle), Δ N-term (\blacksquare), or dsRBD (\bullet) were carried in either 5 mM KCl (B) or 100 mM KCl (D). The binding percentage was plotted versus the protein concentration. Each data point is the average of three experiments.

binding. The 3' end of U5 snRNA (Fig. 1B) was used as a model substrate at low concentrations of monovalent salt to allow maximum cleavage (2, 22, 35). As shown in Fig. 1D, the full-length Rnt1 (lane 3) cleaved U5 at the expected *in vivo* sites (4), while no cleavage was seen when the RNA was incubated alone or with glutathione *S*-transferase (GST) (lanes 1 and 2, respectively). The Δ dsRBD, dsRBD, and N-term proteins did not cleave the RNA substrate (lanes 4, 5, and 8, respectively). Prolonged incubation or addition of different divalent metal ions did not enhance the activity of this set of proteins (data not shown). Mixing the dsRBD with the Δ dsRBD protein did not reconstitute enzyme function (lane 6), suggesting that the dsRBD and the nuclease domain are required *in cis* for RNA cleavage. Surprisingly, the Δ N-term protein, which lacks 36% of Rnt1 primary structure, cleaved U5 with an efficiency similar to that of the full enzyme (lane 7). Addition of the N-terminal domain to the Δ N-term protein had no noticeable effects (lane 9). We conclude that the N-terminal domain is not required for RNA cleavage under these conditions.

The ability of various Rnt1 domains to bind RNA was tested under conditions that allow RNA binding without cleavage (21). Radiolabeled U5 RNA transcripts were incubated with Rnt1 or derivatives in the absence of Mg^{2+} and fractionated on a polyacrylamide gel under native conditions. As expected, proteins containing the dsRBD motif including Rnt1, dsRBD, and Δ N-term bound to the RNA (Fig. 1E, lanes 2, 4, and 6, respectively) while proteins lacking the dsRBD motif did not (lanes 3 and 5). We conclude that the RNA binding activity of Rnt1 is restricted to the dsRBD, that RNA cleavage requires the nuclease domain, and that the N-terminal domain has no apparent effect on either binding or cleavage *in vitro*.

To examine the function of the N-terminal domain *in vivo*, we cloned a set of *RNT1* deletions in yeast expression vectors.

The different deletion mutants were expressed in cells lacking the *RNT1* gene, either directly using a copper-inducible promoter or as an N-terminal fusion with a nuclear localization signal from the *GAL4* DNA binding domain (BD). As shown in Fig. 2A, constructs carrying the full BD-*RNT1* fusion complemented the *RNT1* knockout and enabled yeast cells to grow at both permissive (25°C) and restrictive (37°C) temperatures. In contrast, constructs carrying the *GAL4* BD alone, a variety of deletions in the dsRBD, or the nuclease domain (BD- Δ DS1, BD-NT1, and BD- Δ CT) did not complement the knockout phenotype. Constructs carrying partial or complete deletions of the N-terminal domain (BD- Δ NT1 and BD- Δ NT2) allowed Δ *RNT1* cells to grow at both the permissive and restrictive temperatures. However, cells expressing proteins with an N-terminal deletion grew more slowly than did cells expressing intact Rnt1 at both the permissive and restrictive temperatures (Fig. 2A). In rich liquid media, cells carrying *RNT1* gene grew with a doubling time of 2.03 h while cells carrying partial (Δ NT1) or full (Δ NT2) deletion of the N-terminal domain grew 45 to 35% slower at 3.65 and 3.1 h, respectively; cells lacking the *RNT1* gene grew with a doubling time of 13.16 h. These results show that a truncated version of Rnt1 lacking the N terminus is still active *in vivo*, albeit at a reduced level. Removal of the *GAL4* nuclear localization signal or variations in the expression level of the Δ NT protein did not affect its ability to complement Rnt1 function (Fig. 2 and data not shown). This suggests that the effect of the N-terminal deletion on cell growth is not due to nuclear misslocalization. To ensure that the deletion of the N-terminal domain does not affect Rnt1 stability, we have compared the expression level of Rnt1 to that of its N-terminal deletion *in vivo*. As shown in Fig. 2D, the expression levels of plasmid-borne BD- Δ NT1 and BD- Δ NT2 fusion proteins are similar to that of BD-*RNT1* in cells expressing a chromosomal copy of Rnt1 (lanes 5 to 7). In

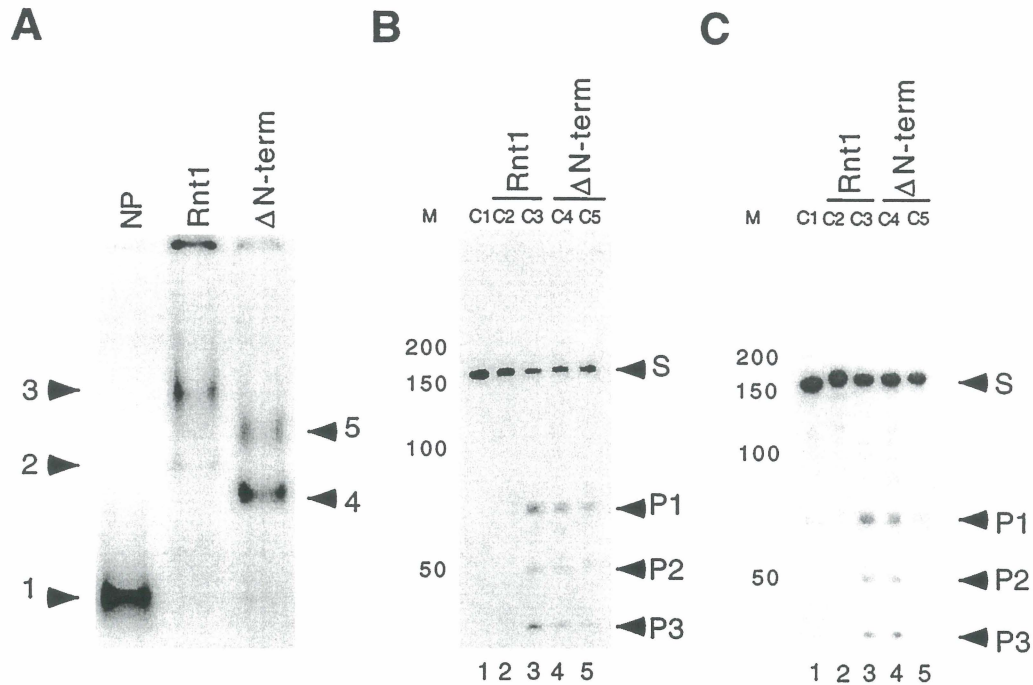


FIG. 5. In-gel cleavage assay of Rnt1 and Δ N-term RNA-protein complexes. (A) A gel shift assay was conducted at 125 mM KCl as described in Materials and Methods. (B and C) The gel bands corresponding to each complex were cut and incubated in either 50 mM KCl (B) or 250 mM KCl (C) in presence of $MgCl_2$ to allow RNA cleavage. At the end of the incubation period, the gel pieces were removed and the RNA was extracted and loaded on an 8% denaturing polyacrylamide gel (B and C). In panel A, the position of each Rnt1 complex is indicated on the left (bands 2 and 3) and the position of each Δ N-term complex is indicated on the right (bands 4 and 5). The band corresponding to the input RNA (band 1) was used as control. In panels B and C, the substrate and cleavage products are indicated on the right. The DNA molecular weight markers are indicated on the left.

contrast, the expression level of the plasmid born Δ N-term fusion is much higher than Rnt1 fusion in cells lacking the chromosomal copy of Rnt1 (lanes 1 to 3). This suggests that the slow growth caused by the N-terminal deletion is not due to reduced expression level of Rnt1. Expression of both Δ N-term and N-term proteins in *trans* did not enhance cellular growth (data not shown). This result suggests that both domains are required in *cis* for optimum activity in vivo.

To test the effect of the N-terminal deletion on the processing activity of Rnt1 in vivo, we monitored the level of mature 25S rRNA in cells expressing either Rnt1 or Δ N-term (Fig. 2C). An RNA protection assay was performed using a probe that spans the 3' end of the 25S rRNA and includes sequences downstream (2). RNA from cells expressing Rnt1 protects the probe at one position corresponding to the mature 3' end of 25S rRNA (Fig. 2C, lane 3). In contrast, RNA extracted from cells lacking Rnt1 protects the probe at multiple positions, corresponding to the 3' end of unprocessed 25S pre-rRNA. RNA extracted from cells expressing Δ N-term protects the probe at both mature and extended positions of the 25S rRNA (lanes 7 to 9). Quantification of the protected probe indicates that about 30% of the 3' end of 25S rRNA is not processed in cells expressing the Δ N-terminal protein. Additional RNA protection assays indicated that the processing of U2 snRNA 3' end is equally affected (data not shown), suggesting a general effect of the N-terminal deletion on Rnt1 processing activity. We conclude that the N-terminal domain is required for efficient RNA processing and normal cellular growth in vivo.

Deletion of the N-terminal domain impairs dsRNA cleavage at physiological salt concentrations in vitro. The apparent difference between the in vitro (Fig. 1) and in vivo (Fig. 2) activities of the Δ N-term protein may reflect differences in the

reaction conditions. Physiological salt concentrations in yeast range between 150 and 200 mM (30), while in vitro cleavage tests were normally conducted at concentrations lower than 50 mM (Fig. 1) to allow maximal activity (1, 2). To examine this possibility, we assayed Rnt1 or Δ N-term cleavage of U5 over a range of KCl concentration from 10 to 400 mM. As shown in Fig. 3A, the Rnt1 cleavage rate diminished at KCl concentrations above 100 mM. From 150 to 400 mM KCl, the cleavage rate of Rnt1 remained more or less constant, with 60% of the substrate being cleaved. In contrast, Δ N-term cleaved the RNA substrate at a rate similar to that of Rnt1 at KCl concentrations below 50 mM and cleavage was suppressed completely at concentrations higher than 200 mM (Fig. 3B). At physiological salt concentrations (150 to 200 mM KCl), Δ N-term was about 30% to 40% less active than Rnt1 (Fig. 3C). This result is consistent with the reduced activity of Δ N-term observed in vivo (Fig. 2C). Thus, although we observed previously that the N-terminal domain did not affect Rnt1 activity at low salt concentration (Fig. 1), we conclude that the N-terminal domain is required for Rnt1 function in vitro at high concentrations of monovalent salt.

To determine the effect of monovalent salts on RNA binding, we carried out gel mobility shift assays of Rnt1, Δ N-term, and dsRBD under different salt concentrations. As shown in Fig. 4, Rnt1 formed one major complex with the RNA (Fig. 4A, lanes 6 to 8, and Fig. 4C, lanes 5 to 7) with a k_d value of 195 nM. Surprisingly, Δ N-term bound the RNA more efficiently than Rnt1 did with a k_d value of 73 nM in 5 mM KCl and 143 nM in 100 mM KCl (Fig. 4). Δ N-term formed two complexes with the RNA, an intermediate complex that formed at low protein concentration (Fig. 4A, lanes 9 to 13, and Fig. 4C, lanes 9 to 12) and a second complex that formed as the protein

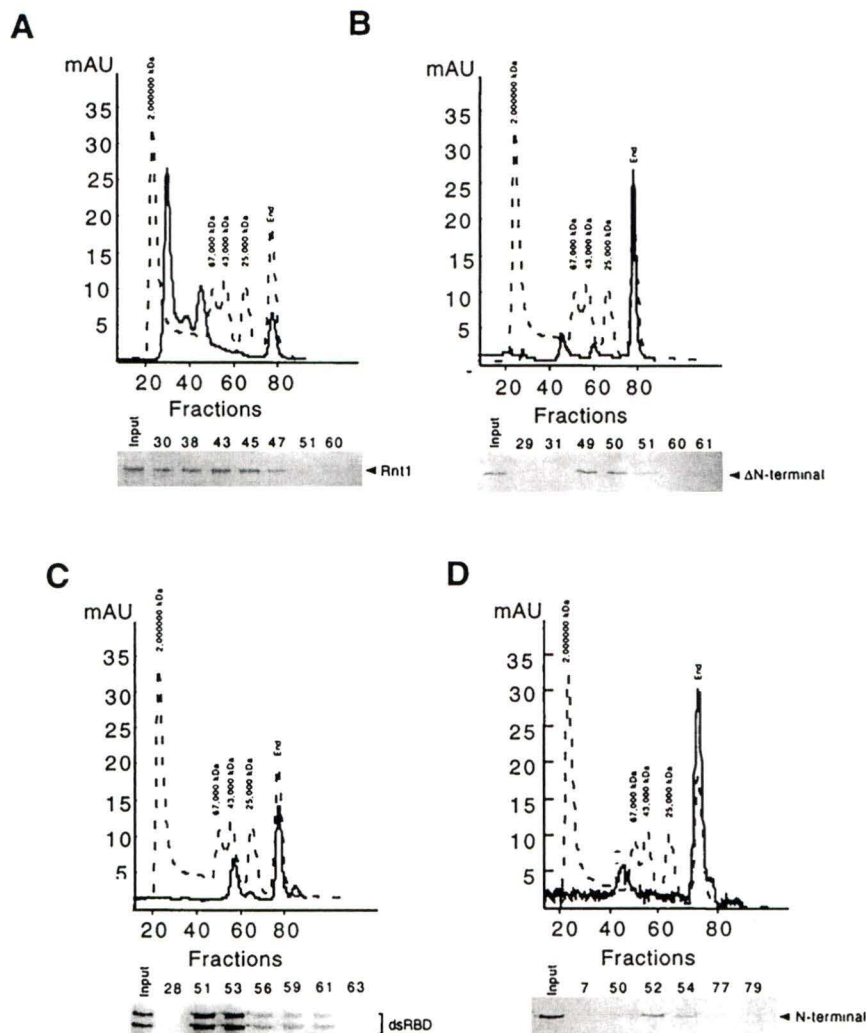


FIG. 6. Rnt1 dimerization is mediated by N-terminal and C-terminal signals. Size exclusion chromatography was carried out with Rnt1 (A), Δ N-term (B), dsRBD (C), and N-term (D) using a Superdex 200 HR 10/30 column. Each protein was loaded on columns precalibrated with 500 mM KCl. The protein content of each peak was verified by loading the corresponding fractions on SDS-polyacrylamide gels (shown below each chart). The size of each peak reflects the light absorbancy and not the amount of each protein. Peaks corresponding to the column end (end) are identified on top of each chart. The molecular weight marker is shown as a dotted line, and the size corresponding to each peak is indicated on top.

concentration was increased (Fig. 4A, lanes 13 to 16, and Fig. 4C, lanes 12 to 15). The intermediate Δ N-term complex and the Rnt1 complex appeared to have similar activities as judged by an in-gel cleavage assay (Fig. 5B and C, lanes 3 and 4, respectively). In contrast, the second complex formed by Δ N-term was less active and was sensitive to high concentration of monovalent salts (Fig. 5B and C, lanes 5). These results suggest that the deletion of the N-terminal domain influences the assembly of the RNA-protein complexes, favoring the formation of a less active protein-RNA complex. Further deletions removing the nuclease domain did not prevent the association of dsRBD with the RNA. As shown in Fig. 4, the dsRBD bound the RNA with a k_d value of 145 nM in 5 mM KCl and 85 nM in 100 mM KCl. The dsRBD-RNA complexes showed a gradual and continuing shift as a function of the protein concentration (Fig. 4A and C). The heterogeneous complexes may represent binding of several proteins to a single RNA molecule or may be due to multiple protein-protein interactions. Salt concentrations ranging from 150 to 300 mM KCl, while reduc-

ing RNA cleavage (Fig. 3), did not have significant effects on the kinetic of binding for all three proteins (data not shown). We conclude that Rnt1 binding to RNA is mediated by the dsRBD and that deletion of the N-terminal domain does not decrease the binding efficiency.

Biochemical evidence for N-terminal domain- and dsRBD-mediated dimerization of Rnt1. To examine the role of the N-terminal domain in the formation of active Rnt1 protein, we analyzed the conformation of Rnt1 and its derivatives in solution by size exclusion chromatography. Each protein was expressed in bacteria and purified as described in Fig. 1 before being loaded on a gel filtration column. Each column was calibrated with high- and low-molecular-weight markers prior to the sizing of each protein. Rnt1 eluted in three major peaks, the smallest corresponding to a dimer form and the other two corresponding to a tetrameric and a multimeric form (Fig. 6A). These protein complexes are not aggregates of denatured proteins, since all three forms were equally capable of cleaving the substrate RNA (data not shown). This result suggests that,

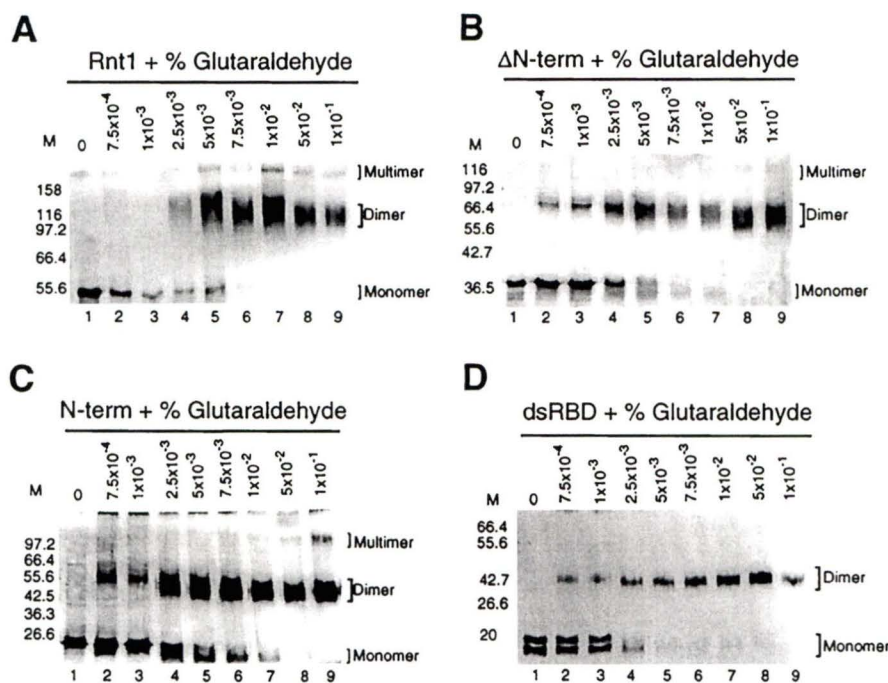


FIG. 7. Glutaraldehyde cross-linking analysis of Rnt1 derivatives. Pure Rnt1 (A), Δ N-term (B), N-term (C), and dsRBD (D) were incubated in increasing concentrations of glutaraldehyde–500 mM KCl. The reaction mixtures were incubated for 10 min and then loaded on SDS-polyacrylamide gels and silver stained. The positions of monomer, dimer, and multimer are shown on the right. The molecular weight markers are indicated on the left in thousands.

similar to the bacterial RNase III (9, 22, 23), Rnt1 self-interacts to form a dimer in solution. Gel filtration of the Δ N-term resulted in only two peaks, one of which corresponded to the monomer form while the other corresponded to the dimer form (Fig. 6B). This result suggests that Δ N-term cannot self-interact as efficiently as Rnt1. For the dsRBD, only one peak corresponding to the dimer size was observed (Fig. 6C). This result suggests that a dimerization domain exists within the dsRBD, as observed with other dsRNA binding proteins (29). Notably, Δ dsRBD that lacks the dsRBD motif migrated as one large peak beyond the range of the column (data not shown). The N-term protein migrated on the column in the same fashion as the Δ dsRBD, forming only one peak of high molecular weight corresponding to a multiple protein complex (Fig. 6D). This result suggests that the N-terminal domain acts as a second dimerization signal for Rnt1.

Protein cross-linking was used to further characterize the multimeric complexes of the purified Rnt1 derivatives. Each purified protein was incubated in 500 mM KCl with increasing glutaraldehyde concentrations (0 to 0.1%). The cross-linked proteins were analyzed by SDS-PAGE and visualized using silver stain. In the absence of glutaraldehyde, all proteins migrated as monomers with the expected molecular weights (Fig. 7). At increasing concentrations of glutaraldehyde, the monomeric bands were converted to bands corresponding to the dimer form for Rnt1 (Fig. 7A), Δ N-term (Fig. 7B), N-term (Fig. 7C), and dsRBD (Fig. 7D). For the Δ dsRBD, no dimerization was observed; instead, a band corresponding to a complex with high molecular weight was observed near the top of the gel (data not shown). The aggregation of Δ dsRBD may result from misfolding or denaturation of the protein. Bands corresponding to multimers can be seen in Rnt1 and N-term (Fig. 6A and C) and to a lesser extent in Δ N-term (Fig. 6B). Glutaraldehyde treatment of chymotrypsin or bovine serum

albumin BSA (data not shown) under the same conditions did not change the migration of the monomeric forms. Addition of RNA or extensive treatments of the different proteins with RNase A, up to 50 mM DTT, or 25% glycerol did not affect the dimerization pattern (data not shown). However, increasing the protein concentration caused different degrees of protein multimerization (data not shown). These results indicate that Rnt1 dimerization is not RNA dependent and does not depend on disulfide bond formation. We conclude that Rnt1 can form a dimer through at least two dimerization signals, one in the N-terminal domain and the other in the dsRBD.

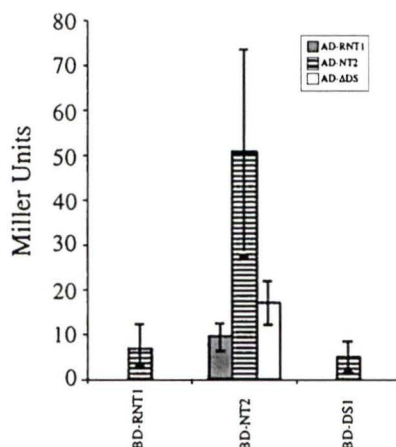
In vivo evidence for N-terminal-mediated self-interactions of Rnt1. To test Rnt1 dimerization in vivo and map its dimerization signals, we used the yeast two-hybrid assay. Two sets of plasmids carrying various segments of Rnt1 either fused to the Gal4 activation domain (AD) expressed from *ADH1* promoter or fused to the Gal4 BD expressed from a truncated *ADH1* promoter were used (Fig. 8A). The different plasmids were transformed in all pairwise combinations into yeast strain PJ69-4A (15) containing three different marker genes (*HIS3*, *ADE2*, and *lacZ*) under the control of three different test promoters (*GAL1*, *GAL2*, and *GAL7*, respectively). Real interactions can be scored using all three markers and may be quantified using a β -galactosidase liquid assay. The results shown in Fig. 8A indicate that the N-terminal domain fused to Gal4 AD (AD-NT2/1–191) can interact with itself (BD-NT2/1–191), the dsRBD (BD-DS1/344–471), and Rnt1 (BD-RNT/1–471). The N-term protein appears to interact directly with the dsRBD because they can be cross-linked in vitro in the absence of any other factors (data not shown). These results suggest that the enzyme may self-interact through interactions between the two N-terminal domains, the two dsRBDs, or the dsRBD and the N-terminal domain.

The strength of the interaction between each protein pair

A

BD-Fusion	AD-Fusion									
	PE	RNT/1-471			NT2/1-191			ΔDS/1-321		
		His	Ade	LZ	His	Ade	LZ	His	Ade	LZ
RNT/1-471	26.08	-	-	-	++	+++	6.92	+	-	-
NT2/1-191	29.36	++	++	9.68	+++	+++	51.2	++	++	17.23
ΔNT2/192-471	36.99	-	-	-	++	+	-	-	-	-
DS1/344-471	3.91	-	-	-	++	++	5.1	+	+	-

B



C

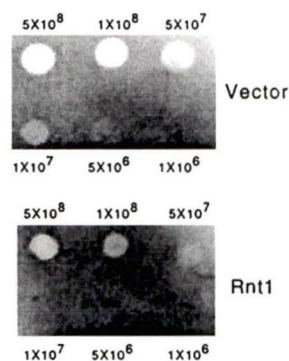


FIG. 8. Yeast two-hybrid analysis of interactions between Rnt1 domains. (A) Summary of Rnt1 inter- and intramolecular interactions determined by two-hybrid analysis. Two sets of plasmids carrying the indicated segments of Rnt1 fused to either *GAL4* BD (BD-fusion) or *GAL4* AD (AD-fusion) were constructed. Different combinations of the two sets were introduced into yeast strain PJ69-4A carrying three reporter genes (*ADE2*, *HIS*, and *lacZ*) under the control of three different promoters. Interaction between any pair of BD and AD fusion proteins will lead to the activation of all three markers with different efficiencies depending on the promoter stringency. The expression level of each fusion protein was assayed by Western blot analysis of whole-cell extract with anti-BD or anti-AD antibodies. The expression level of each fusion is indicated as a percentage of the wild-type BD or AD expression level. The interaction level of each two plasmids is indicated as weak (+), moderate (++), and strong (+++). The strength of the interaction was also measured using the β -galactosidase liquid assay (LZ), and the average Miller units of three experiments are indicated. A schematic representation of the different constructs is shown on top and on the right of the table. White boxes indicate the N-terminal domain, light gray boxes indicate the nuclease domain, and black boxes indicate the dsRBD. (B) Comparison of the interaction strength between the different functional domains of Rnt1 using liquid β -galactosidase assays. An average of three experiments of each pair of plasmids was plotted using Miller points. (C) λ repressor assay of Rnt1 dimerization. Dot plaque assay of Rnt1 dimerization was conducted using *E. coli* AG1688 transformed with either λ N or λ N-Rnt1 fusion. The cells were poured as a lawn and infected with a 5- μ l dilution of λ KH54 lysates. The ability of Rnt1 to dimerize is measured by its ability to suppress λ infection and reduce bacterial lysis. The titer is indicated beside each spot.

was measured using β -galactosidase assays and quantified using Miller units (26). As shown in Fig. 8B, the strongest interaction was detected between the two N-terminal domains (NT2/1–191) followed by the interaction between the N-terminal domain (BD-NT2/1–191) and Δ dsRBD (AD- Δ DS/1–321). The interaction between the N-terminal domain (AD-NT2/1–191) and the dsRBD (BD-DS1/344–471) was 10 times lower than the interaction between the N-terminal domains. Consistently, protein cross-linking assays showed that the N-term/N-term complex was more favored than the N-term/dsRBD complex (data not shown). Together, these results suggest that Rnt1 is capable of forming intermolecular interaction. Our results also suggest that Rnt1 has the ability to form an intramolecular complex. This conclusion is inferred from the ability of the N-term protein and dsRBD to interact.

Fusion of Rnt1 segments containing the nuclease domain to Gal4 AD activated the test promoter only when expressed with the N-terminal domain Gal4 BD fusion (Fig. 8A). Other fragments, including those proven to self-interact either biochemically (Fig. 6 and 7) or through the Gal4 BD fusion (Fig. 8A), failed to activate the test promoters when linked to the nucle-

ase domain. Therefore, we could not directly test the intermolecular interaction of full-length Rnt1 by using the two-hybrid system. To confirm this interaction, we used a dimerization-dependent λ repressor fusion system in bacteria (42). Rnt1 was fused to the N-terminal DNA binding (DB) domain of λ phage (λ N) and tested for dimerization. If dimerization occurs, the λ N-terminal domain will repress the transcription of genes required for the phage lytic growth and prevent λ superinfection. As seen in Fig. 8C, λ induced cell lysis is reduced when Rnt1 was fused to λ N confirming the self-dimerization of Rnt1. We conclude that Rnt1 function as a dimer with a dynamic conformation critically dependent on the protein interaction mediated by the N-terminal domains.

DISCUSSION

Yeast Rnt1 and the bacterial RNase III share the basic features required for dsRNA binding and cleavage (2). In addition to the nuclease domain and dsRBD, the yeast enzyme contains a 191-aa extension at the N terminus unique to the eukaryotic homologues of RNase III. We have found that the

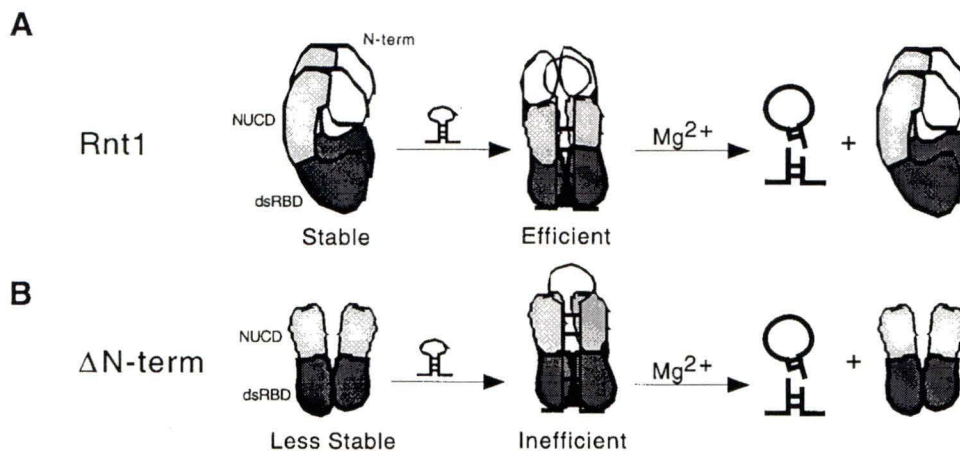


FIG. 9. The N-terminal domain is a modulator of yeast RNase III activity. Hypothetical models of Rnt1 and Δ N-term function. (A) Yeast RNase III. The intramolecular interaction of the dsRBD and N-term stabilizes the inactive protein, while the intermolecular interaction mediated by N-term and dsRBD stabilizes the protein complex on the RNA. (B) Δ N-term. The N-terminal domain deletion from Rnt1 destabilizes the protein and weakens the protein-RNA complex, reducing the cleavage efficiency.

N-terminal domain favors the formation of stable or functional Rnt1 protein complexes. Deletion of the N-terminal domain reduces the processing activity of Rnt1 by 35 to 40% and makes it hypersensitive to monovalent salt (Fig. 2 and 3). Biochemical (Fig. 6 and 7) and genetic (Fig. 8) evidence indicates that the N-terminal domain can interact with itself and with the dsRBD. Together, our results suggest that the eukaryotic N-terminal domain enhances Rnt1 function by mediating the formation of optimum protein conformations.

Yeast RNase III has a novel functional domain. The dsRBD and the nuclease domain of *E. coli* RNase III can be structurally and functionally separated (17; Nicholson, personal communication). The conserved C-terminal dsRBD is sufficient for dsRNA binding, and the N-terminal nuclease domain is sufficient for RNA cleavage. Yeast Rnt1 contains sequences homologous to both dsRBD and nuclease domain in addition to a unique 191-aa N-terminal domain. Here we provide evidence that yeast RNase III dsRBD is sufficient for dsRNA binding and that the nuclease domain is required for RNA cleavage. However, unlike the bacterial enzyme, deletion of the C-terminal dsRBD abolishes all RNA binding activity (Fig. 1) and the nuclease domain cannot cleave the substrate without the dsRBD, even with different divalent metal ions (Fig. 1 and data not shown). Deletion of the N-terminal domain did not affect the basic functions of Rnt1, suggesting that the protein structural and sequence elements required for RNA binding and cleavage are conserved among prokaryotes and eukaryotes. However, the efficiency of the RNA cleavage is diminished by the deletion of the N-terminal domain without significantly affecting the RNA binding efficiency (Fig. 3 and 4). Thus, deleting the N-terminal domain results in the formation of RNA-protein complexes in vitro that are either less productive or unstable under RNA cleavage conditions. These results suggest that the N-terminal domain is a functionally and structurally separate domain required for normal cell growth and efficient RNA cleavage. Database searches reveal the presence of two types of N-terminal domains among the eukaryotic homologues of RNase III (35). The first has homologies to the DEAD box ATPase-dependent helicase family and may be found in *S. pombe* (Pac 8), *Caenorhabditis elegans*, and *Homo sapiens* but not in the *S. cerevisiae* genome. The second type has no significant homology to known proteins and can be found in *S. cerevisiae* (Rnt1), *S. pombe* (Pac1), *C. elegans*, and *H. sapiens*

genomes. Deletion of the Pac1 N-terminal domain appears to inhibit RNA cleavage, but the mechanism and extent of inhibition are not clear (14). The activity of the Pac1 N-terminal deletion was tested in crude bacterial extracts, preventing accurate measurements, and its ability to bind RNA was not examined. More tests with Pac1 and other eukaryotic homologues of Rnt1 are required to identify possible conserved functions of the N-terminal domain. Meanwhile, the results presented here suggest that in yeast the N-terminal domain of the eukaryotic RNase III is a distinct functional domain required for efficient RNA cleavage under physiological conditions.

Yeast RNase III self-interaction is mediated by N-terminal and C-terminal signals. RNase III forms a dimer in solution and appears to function as a dimer (9, 20). Here we show that Rnt1 also forms an intermolecular complex mediated by signals located at the N-terminal and C-terminal domains. However, the mechanism of Rnt1 self-interaction and binding to dsRNA appears different from that of RNase III. Unlike RNase III, Rnt1 forms multiple protein complexes at high salt concentrations (Fig. 6 and 7). Multiple interactions may also occur after binding to RNA at high protein concentrations, suggesting that these protein interactions do not interfere with RNA association. In addition, the nature of Rnt1-RNA complexes appears to be different from those of RNase III, since their stability is not dependent upon divalent metal ions (19). These differences between RNase III and Rnt1 may be caused at least in part by the N-terminal domain of Rnt1. Analysis of Rnt1 derivatives suggests that the multiple protein complexes formed in solution are mediated in part by the N-terminal domain (Fig. 6 and 7). N-terminally deleted Rnt1 or a protein containing only the dsRBD multimerize less readily and form mainly dimers or remain as monomer in solution, similar to the bacterial RNase III (21). In contrast, proteins containing the N-terminal domain or lacking the dsRBD tend to form higher-molecular-weight complexes. These observations suggest that Rnt1 possesses two dimerization signals that may provide a dynamic switch between different complexes (see below).

Using yeast two-hybrid and λ repressor assays, we have confirmed that Rnt1 dimerizes and that the isolated dsRBD and N-terminal domain can self-interact. In addition, we have demonstrated an interaction between the dsRBD and the N-terminal domain. The interaction between these two Rnt1 domains

suggests that Rnt1 can also form an intramolecular complex. Because the self-interaction of the N-terminal domain is much stronger in vivo (Fig. 8) and in vitro (Fig. 6 and 7) than the N-terminal domain/dsRBD interaction (Fig. 8 and data not shown), the kinetically most stable assembly should be a dimer involving self-interactions between the two N-terminal domains (Fig. 9A). Based on the observations that fragments lacking the N-terminal domain or containing the dsRBD by itself can form a dimer (Fig. 6 to 8), it is likely that the functional Rnt1 complex also includes an interaction between the two dsRBDs. Thus, the Rnt1 homodimer appears to be formed in parallel through an interaction between the two N-terminal domains and another between the two C-terminal domains. The formation of an Rnt1 dimer in a parallel configuration raises new questions about the mechanism of dsRNA cleavage. To explain the staggered cut introduced by RNase III at each side of the RNA helix, it was suggested that the bacterial enzyme dimerizes in an antiparallel configuration (head to tail) (27). Based on the evidence presented here, we propose that Rnt1 introduces the asymmetrical cuts by an alternative mechanism that allow asymmetrical positioning of the RNA helix with respect to the nuclease domains.

Is the N-terminal domain a regulator of Rnt1 function? In addition to its role in Rnt1 dimerization, the N-terminal domain appears to influence RNA binding and cleavage. Accordingly, the physical interaction that we detected between the N-terminal domain and dsRBD could be related to a regulatory function. One interesting possibility illustrated in Fig. 9 is that the N-terminus-mediated protein interactions modulate Rnt1 function. The N-terminal domain may interact intramolecularly with the dsRBD. This interaction would be disrupted upon binding of the RNA substrate to trigger conformational changes leading to intermolecular interaction between the two N-terminal domains and RNA cleavage. This model would explain why the deletion of the N-terminal domain promotes dsRNA binding without increasing the cleavage rate (Fig. 3 and 4). We therefore suggest that the N-terminal domain has dual functions, as depicted in Fig. 9. The first function is to interact with the dsRBD to form a compact protein structure that would be stable in the absence of the RNA, and the second function is to self-interact upon RNA binding to stabilize the ribonucleoprotein complex leading to efficient RNA cleavage. However, other in vivo functions of the N-terminal domain such as the regulation of Rnt1 interaction with other cellular proteins remains a possibility.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guillaume Chanfreau for the Δ RNT1 yeast strain and for suggesting the in-gel cleavage experiment, James Hu for the λ repressor kit, Dennis Thiele and Simon Labbé for the copper expression vectors, and Philip James for the two-hybrid plasmids and strains. We also thank Allen Nicholson for communicating unpublished results. We are indebted to Benoit Chabot, April Colosimo, Skip Fournier, Christine Gagnon, Michael Katze, Allen Nicholson, and Raymond Weller for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grant MT-14305 from the Medical Research Council of Canada to S.A. The fast protein liquid chromatography apparatus used for protein purification was purchased by a grant from Canada Foundation for Innovation. S.A. is a Chercheur-Boursier Junior I of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Abou Elela, S., and M. Ares, Jr. 1998. Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *EMBO J.* 17:3738–3746.
- Abou Elela, S., H. Igel, and M. Ares, Jr. 1996. RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 85:115–124.
- Bycroft, M., S. Grunert, A. G. Murzin, M. Proctor, and D. St Johnston. 1995. NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *EMBO J.* 14:3563–3571. (Erratum, 14:4385.)
- Chanfreau, G., S. A. Elela, M. Ares, Jr., and C. Guthrie. 1997. Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes Dev.* 11:2741–2751.
- Chanfreau, G., P. Legrain, and A. Jacquier. 1998. Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J. Mol. Biol.* 284:975–988.
- Chanfreau, G., G. Rotondo, P. Legrain, and A. Jacquier. 1998. Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1. *EMBO J.* 17:3726–3737.
- Court, D. 1993. RNA processing and degradation by RNase III. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Dasgupta, S., L. Fernandez, L. Kameyama, T. Inada, Y. Nakamura, A. Pappas, and D. L. Court. 1998. Genetic uncoupling of the dsRNA-binding and RNA cleavage activities of the *Escherichia coli* endoribonuclease RNase III—the effect of dsRNA binding on gene expression. *Mol. Microbiol.* 28:629–640. (Erratum, 30:679, 1998.)
- Dunn, J. J. 1976. RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage. *J. Biol. Chem.* 251:3807–3814.
- Gitelman, D. R., and D. Apirion. 1980. The synthesis of some proteins is affected in RNA processing mutants of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1063–1070.
- Guthrie, C., and G. R. Fink. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Higgins, D. G., J. D. Thompson, and T. J. Gibson. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* 266:383–402.
- Iino, Y., A. Sugimoto, and M. Yamamoto. 1991. *S. pombe* *pac1+*, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III-like RNase. *EMBO J.* 10:221–226.
- James, P., J. Halladay, and E. A. Craig. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425–1436.
- Janknecht, R., G. de Martynoff, J. Lou, R. A. Hipskind, A. Nordheim, and H. G. Stunnenberg. 1991. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972–8976.
- Kharrat, A., M. J. Macias, T. J. Gibson, M. Nilges, and A. Pastore. 1995. Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III. *EMBO J.* 14:3572–3584.
- Kufel, J., B. Dichtl, and D. Tollervy. 1999. Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA* 5:909–917.
- Labbé, S., and D. J. Thiele. 1999. Copper ion inducible and repressible promoter systems in yeast. *Methods Enzymol.* 306:145–153.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Li, H., and A. W. Nicholson. 1996. Defining the enzyme binding domain of a ribonuclease III processing signal. Ethylation interference and hydroxyl radical footprinting using catalytically inactive RNase III mutants. *EMBO J.* 15:1421–1433.
- Li, H. L., B. S. Chelladurai, K. Zhang, and A. W. Nicholson. 1993. Ribonuclease III cleavage of a bacteriophage T7 processing signal. Divalent cation specificity, and specific anion effects. *Nucleic Acids Res.* 21:1919–1925.
- March, P. E., and M. A. Gonzalez. 1990. Characterization of the biochemical properties of recombinant ribonuclease III. *Nucleic Acids Res.* 18:3293–3298.
- Martin, M. E., and A. J. Berk. 1998. Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.* 72:3146–3154.
- Melton, D. A., P. A. Krieg, M. R. Rebagliati, T. Maniatis, K. Zinn, and M. R. Green. 1984. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 12:7035–7056.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Nanduri, S., B. W. Carpick, Y. Yang, B. R. Williams, and J. Qin. 1998. Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *EMBO J.* 17:5458–5465.
- Nicholson, A. W. 1996. Structure, reactivity, and biology of double-stranded RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 52:1–65.
- Patel, R. C., and G. C. Sen. 1998. Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 18:7009–7019.
- Prista, C., A. Almagro, M. C. Loureiro-Dias, and J. Ramos. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hanseii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4005–4009.
- Qu, L. H., A. Henras, Y. J. Lu, H. Zhou, W. X. Zhou, Y. Q. Zhu, J. Zhao, Y. Henry, M. Caizergues-Ferrer, and J. P. Bachevalerie. 1999. Seven novel methylation guide small nucleolar RNAs are processed from a common polycis-

- tronic transcript by Rat1p and RNase III in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**:1144–1158.
32. Reynolds, A., and V. Lundblad. 1998. Yeast vectors and assays for expression of cloned genes, vol. 2. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
 33. Robertson, H. D. 1982. *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites. *Cell* **30**:669–672.
 34. Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor, New York, N.Y.
 35. Rotondo, G., and D. Frendewey. 1996. Purification and characterization of the Pac1 ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **24**:2377–2386.
 36. Rotondo, G., M. Gillespie, and D. Frendewey. 1995. Rescue of the fission yeast snRNA synthesis mutant *snm1* by overexpression of the double-strand-specific Pac1 ribonuclease. *Mol. Gen. Genet.* **247**:698–708.
 37. Rotondo, G., J. Y. Huang, and D. Frendewey. 1997. Substrate structure requirements of the Pac1 ribonuclease from *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA* **3**:1182–1193.
 38. Ryter, J. M., and S. C. Schultz. 1998. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J* **17**:7505–7513.
 39. Sambrook, J., E. F. Fritsh, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.
 40. Seipelt, R. L., B. Zheng, A. Asuru, and B. C. Rymond. 1999. U1 snRNA is cleaved by RNase III and processed through an Sm site-dependent pathway. *Nucleic Acids Res.* **27**:587–595.
 41. Xu, H. P., M. Riggs, L. Rodgers, and M. Wigler. 1990. A gene from *S. pombe* with homology to *E. coli* RNase III blocks conjugation and sporulation when overexpressed in wild type cells. *Nucleic Acids Res.* **18**:5304.
 42. Zeng, X., H. Zhu, H. A. Lashuel, and J. C. Hu. 1997. Oligomerization properties of GCN4 leucine zipper e and g position mutants. *Protein Sci.* **6**:2218–2226.
 43. Zhou, D., D. Frendewey, and S. M. Lobo Ruppert. 1999. Pac1p, an RNase III homolog, is required for formation of the 3' end of U2 snRNA in *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA* **5**:1083–1098.

Annexe II

Class	Protein Name	Clone Code	Repeats Number	Protein Position	Function
Transcription factors					
1	Adr1p	4125	1	M	Zinc-finger transcription factor. Positive transcriptional regulator of ADH2 and peroxisomal protein genes. Adr1p is essential for fatty acid degradation and peroxisome proliferation.
2	Aro80p	4208	1	C-Term	Positive transcription regulator of Aro9p and Aro10p involved in aromatic amino acid catabolism when the yeast is under nitrogen starvation. Member of the Zn2Cys6 transcription factor family.
3	Ccr4p	4034	1	Complete	Carbon catabolite repression; transcriptional regulator for some glucose-repressed genes including ADH2. Component of the CCR4-NOT transcriptional complex; has positive and negative effects on transcription. This protein may also be involved in cell cycle and mating.
4	Gcr2p	4193-4065	2	M	Transcriptional activator involved in regulation of glycolytic gene expression. Homologous to GCR1 and may interact with Gcr1p. Forms a homodimer.
5	Mac1p	172-374-4000-4196	4	C-term	Metal-binding transcriptional activator involved in induction of genes required for the reduction and utilization of iron and copper. Phosphorylation is required for Mac1p to become DNA-binding active.
6	Mga2p	8	1	M	Membrane-bound transcription factor regulated by proteolytic activation which direct transcription of the Delta9-fatty acid desaturase gene OLE1. Transcription factors that influence chromatin structure. Mga2p and Spt23p can be antagonists of silencing and can positively affect silencing in other contexts.
7	Msn1p	4019	1	Almost complete	Transcriptional activator for genes regulated through Snf1p, involved in response to nutrient limitation (Asparagin and Glutamin rich). Msn1p and Mss11p are involved in the co-regulation of starch degradation and invasive growth and in pseudohyphal differentiation. Regulates the transcription of both STA2 and MUC1.
8	Oaf1p	4129-4068-4069	3	C-term	Transcription factor that plays a role in peroxisome proliferation. Forms a heterodimer with Zn2Cys6 transcription factors Pip2p and controls induction of genes encoding peroxisomal proteins. Lipid, fatty acid and sterol metabolism.
9	Pdr1p	4062-4102-4101	3	C-term	Zinc-finger transcription factor of the Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain type that regulates the expression of several ATP binding cassette transporter-encoding genes involved in multiple drug resistance (Asparagin rich). General positive regulator of permeability genes. Lipid, fatty acid and sterol metabolism.
10	Ppr1p	4199	1	C-term	Transcription factor regulating pyrimidine pathway, contains a Zn[2]-Cys[6] fungal-type binuclear cluster domain in the N-terminal region. Positive regulator of Ura1p, Ura3p et Ura4p.
11	Sas3p	4105	1	M	Protein with histone acetyltransferase activity, influences silencing at HMR locus, has a single C2H2-type zinc finger.
12	Skn7p	35	1	M	Transcription factor involved in oxidative stress response and G1 cell cycle control, has similarity to response regulator proteins of bacterial two-component systems. Has similarity to DNA-binding region of heat shock transcription factors. May be involved in regulation of pseudohyphal differentiation upon nutrient starvation.
13	Snf6p	18	1	C-term	Component of SWI-SNF global transcription activator complex, acts to assist gene-specific activators through chromatin remodeling.

14	Snf7p	4067	1	Almost complete	Protein involved in glucose derepression. Involved in protein sorting in pre-vacuolar endosome. Essential for multivesicular body sorting. Member of a small family of coiled-coil-forming proteins involved in a cargo-specific event.
15	Spo13p	4212	1	M	Meiosis-specific protein required for meiosis I chromosome division. Null mutant is viable, defective for sporulation; loss of function results in a single division during meiosis. SPO13p negatively regulates the progression of mitotic and meiotic nuclear division. Inhibitor or repressor.
16	YCR087c-A	9-149	2	C-term	Protein with a putative zinc finger domain, has similarity to mouse LYAR cell growth regulating nucleolar protein. Nucleic acid binding protein (maybe involved in transcription)
17	YJL206C	4195-4120	2	C-term	Protein with weak similarity to Put3p and other transcription factors, has a Zn[2]-Cys[6] fungal-type binuclear cluster domain in the N-terminal region.
18	YMR030W	1789	1	C-term	Overproduction allows the expression of a calcineurin-dependent response element reporter gene in the absence of calcineurin.
Stress proteins					
1	Flo1p	371	1	M	Flocculin, cell wall protein involved in flocculation.
2	Hsp104p	370-367-4153-4128	4	C-term	Heat shock protein required for induced thermotolerance and for resolubilizing aggregates of denatured proteins; involved in thermal and ethanol tolerance, and reactivation of mRNA splicing after heat shock.
3	Hsp26p	4151-4181-4126	3	c-term	Heat shock protein of 26kD, expressed during entry to stationary phase and induced by osmotic stress.
4	Hsp42p	1784	1	C-term	Heat shock protein with similarity to Hsp26p, involved in restoration of the cytoskeleton during mild stress.
5	Skn7p	35	1	M	Transcription factor involved in oxidative stress response and G1 cell cycle control, has similarity to response regulator proteins of bacterial two-component systems. Has similarity to DNA-binding region of heat shock transcription factors. May be involved in regulation of pseudohyphal differentiation upon nutrient starvation.
Cell cycle and Meiosis proteins					
1	Bbp1p	208	1	C-term	Protein of the spindle pole body that binds to Bfr1p. Structural protein of cytoskeleton. Involved in microtubule nucleation and localize at spindle pole body. Involved in mitotic cell cycle and meiosis. Null mutant is inviable; cells depleted of Bbp1p are defective in nuclear segregation, bud formation, cytokinesis and nuclear spindle formation; overexpression gives ascus that contains asci instead of spores.
2	Bik1p	117-4028-4148	3	Almost complete	Microtubule-associated protein required for microtubule function during mitosis and mating. Molecular Function: karyogamy, mitotic anaphase B, mitotic spindle assembly. Cellular component: spindle microtubule, spindle pole body.
3	Bim1p	4103	1	C-term	Protein associated with microtubules, required for a cell cycle check point. Structural protein of cytoskeleton. Involved in microtubule depolymerization, nucleation and stabilization and in nuclear migration.
4	Boi2p	1786	1	N-term only	Protein involved in bud formation that binds to Bem1p, has an SH3 domain. Involved in RHO protein signal transduction and establishment of cell polarity.

5	Cbf2p	4010	1	C-term	110 kd component (Cbf3a) of the multisubunit 'Cbf3' kinetochore protein complex, which binds to the CDE III element of centromeres. Mitosis. Null mutant is inviable.
6	Ccr4p	4034	1	Complete	Carbon catabolite repression; transcriptional regulator for some glucose-repressed genes including ADH2. Component of the CCR4-NOT transcriptional complex; has positive and negative effects on transcription. This protein may also be involved in cell cycle and mating.
7	Chs1p	1797	1	C-term	Chitin synthase I, has a repair function during cell separation. Involved in cytokinesis. Disrupts mating and sporulation efficiently.
8	Don1p/ YDR273W	1086	1		Protein specific for the prospore membrane. Expressed exclusively during meiosis. Localize to the cytoplasm at the microtubule ends. Interacts with Rpn12p in a two-hybrid assay.
9	Dig1p	4136-3980	2	C-term	MAP kinase-associated protein involved in negative regulation of invasive growth. Regulator of Sterile Twelve, binds Fus3 and Ste12. Null mutant is viable, shows abnormal bud morphology.
10	Dsk2p	207	1	M	Protein required with Rad23p for duplication of the spindle pole body. Ubiquitin-like protein involved in protein degradation tagging.
11	Fin1p	4235-4219	2		Reserved name. Cell cycle-dependent filament between nuclei. Null mutant is viable; overproduction is lethal in haploids and strongly inhibits growth in diploids. Intermediate filament protein, has possible coiled-coil region (structural protein). Interacts with Glc7p in a two-hybrid assay.
12	Mum2p	25	1	C-term	Muddled Meiosis. Mutant is sporulation defective and fails to perform premeiotic DNA synthesis; overexpression suppresses a TOR2 allele. Recombination.
13	Pat1p	4112-4142- 4144	3	N-term	Topoisomerase II-associated protein, necessary for accurate chromosome transmission. Involved in mRNA turnover. Recombination. Null mutant is viable; slow growth rate, reduced fidelity of chromosome segregation during both mitosis and meiosis; slower rate of deadenylation-dependent decapping of mRNAs and transcript-specific effects on mRNA decay rates.
14	Red1p	368	1	C-term	Recombination. Meiosis-specific protein involved in similar chromosome synapsis and chiasmata formation; localizes to chromosome cores independently of Mei4p and Spo11p; mRNA is induced in meiosis. Associated with lateral elements of the synaptonemal complex.
15	Sla2p	4044	1		Transmembrane protein involved in membrane cytoskeleton assembly, actin filament organization, cell polarization and cell wall organization and biogenesis; also required for the internalization phase of endocytosis and exocytosis. structural protein of cytoskeleton
16	Spc72p	4171	1	C-term	Component of spindle pole body that interacts with Stu2p. Structural protein of cytoskeleton involved in microtubule nucleation, mitotic spindle elongation and nuclear migration.
17	Spo13p	4212	1	M	Meiosis-specific protein required for meiosis I chromosome division. Null mutant is viable, defective for sporulation; loss of function results in a single division during meiosis. SPO13p negatively regulates the progression of mitotic and meiotic nuclear division.
18	Tub4p	1795	1	C-term	Gamma tubulin-like protein, spindle pole body component that organizes both cytoplasmic and nuclear microtubule arrays. Structural protein of cytoskeleton involved in microtubule nucleation and mitotic spindle assembly.

Respiratory and nutritional proteins

1	Ade2p	5 -6	2	C-term	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (AIR decarboxylase), sixth step in de novo purine biosynthesis pathway. Nucleotide metabolism.
2	Adr1p	4125	1	M	Zinc-finger transcription factor. Positive transcriptional regulator of ADH2 and peroxisomal protein genes. Adr1p is essential for fatty acid degradation and peroxisome proliferation.
3	Aro80p	4208	1	C-Term	Positive transcription regulator of Aro9p and Aro10p involved in aromatic amino acid catabolism when the yeast is under nitrogen starvation. Member of the Zn2Cys6 transcription factor family.
4	Ccr4p	4034	1	Complete	Carbon catabolite repression; transcriptional regulator for some glucose-repressed genes including ADH2. Component of the CCR4-NOT transcriptional complex; has positive and negative effects on transcription. This protein may also be involved in cell cycle and mating.
5	Fol2 p	4066-4023	2		GTP cyclohydrolase I, catalyzes synthesis of D-erythro-7,8-dihydroneopterintriphosphate from GTP. First enzyme in biosynthetic pathway for folic acid and tetrahydrobiopterin.
6	Gcr2p	4193-4065	2	M	Transcriptional activator involved in regulation of glycolytic gene expression. Homologous to GCR1 and may interact with Gcr1p. Forms a homodimer.
7	Gip2p	349-1788-4017	3	C-term	Glc7p-interacting protein, involved in the biosynthesis of glycogen, possible regulatory subunit for the PP1 family protein phosphatase Glc7p.
8	Grx5p	4119	1		Glutaredoxin, involved in protection against protein oxidative damage. Cell stress. Null mutant is viable and shows high sensitivity to oxidative stress and increased sensitivity to osmotic stress.
9	Hex3p	4124-4040-4061	3		Protein involved in hexose metabolism. Carbohydrate metabolism.
10	Ilv6p	4210-4071	2		Acetolactate synthase regulatory subunit. Amino-acid metabolism, targeted to the mitochondria.
11	Inh1p	4206	1		Inhibitor of mitochondrial ATPase involved in ATP synthesis coupled proton transport. Part of the proton-transporting ATP synthase complex. Energy generation.
12	Kgd2p	4-12	2	C-term	Dihydrolipoyl transsuccinylase component of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in mitochondria involved in 2-oxo-glutarate metabolism and tricarboxylic acid cycle.
13	Lat1p	4176-4016	2		Dihydrolipoamide S-acetyltransferase component (E2) of pyruvate dehydrogenase complex that catalyze the oxidative decarboxylation of alpha-keto acids. Energy generation.
14	Mac1p	172-374-4000-4196	4	C-term	Metal-binding transcriptional activator involved in induction of genes required for the reduction and utilization of iron and copper. Phosphorylation is required for Mac1p to become DNA-binding active.
15	Mga2p	8	1	M	Membrane-bound transcription factor regulated by proteolytic activation which direct transcription of the Delta9-fatty acid desaturase gene OLE1. Transcription factors that influence chromatin structure. Mga2p and Spt23p can be antagonists of silencing and can positively affect silencing in other contexts.
16	Msn1p	4019	1	Almost complete	Transcriptional activator for genes regulated through Snf1p, involved in response to nutrient limitation (Asparagin and Glutamin rich). Msn1p and Mss11p are involved in the co-regulation of starch degradation and invasive growth and in pseudohyphal differentiation. Regulates the transcription of both STA2 and MUC1.

17	Oaf1p	4129-4068-4069	3	C-term	Transcription factor that plays a role in peroxisome proliferation. Forms a heterodimer with Zn2Cys6 transcription factors Pip2p and controls induction of genes encoding peroxisomal proteins. Lipid, fatty acid and sterol metabolism.
18	Osh3p/ YHR073W	4027	1		Protein with similarity to human oxysterol-binding protein (OSBP) involved in lipid trafficking and sterol homeostasis, probably involved in cholesterol synthesis and mevalonate pathway. Probably cytoplasmic. May affect membrane integrity. Interacts with Spo12p in a two-hybrid assay.
19	Pdb1p	128-152-1793	3	C-term	Beta subunit of pyruvate dehydrogenase (E1 beta) that catalyze the oxidative decarboxylation of alpha-keto acids.
20	Pdr1p	4062-4102-4101	3	C-term	Zinc-finger transcription factor of the Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain type that regulates the expression of several ATP binding cassette transporter-encoding genes involved in multiple drug resistance (Asparagin rich). General positive regulator of permeability genes. Lipid, fatty acid and sterol metabolism.
21	Ppr1p	4199	1	C-term	Transcription factor regulating pyrimidine pathway, contains a Zn[2]-Cys[6] fungal-type binuclear cluster domain in the N-terminal region. Positive regulator of Ura1p, Ura3p et Ura4p.
22	Ser33p	4045	1		3-phosphoglycerate dehydrogenase that catalyzes the first step in serine biosynthesis; isozyme of SER3
23	Sho1p	4098-4096	2		Transmembrane osmosensor in the HOG1 MAP kinase, high-osmolarity signal transduction pathway, has an SH3 domain. Involved in osmosensory signaling pathway via Sho1 osmosensor and pseudohyphal growth Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity.
24	Snf7p	4067	1	Almost complete	Protein involved in glucose derepression. Involved in protein sorting in pre-vacuolar endosome. Essential for multivesicular body sorting. Member of a small family of coiled-coil-forming proteins involved in a cargo-specific event.
25	Skn7p	35	1	M	Transcription factor involved in oxidative stress response and G1 cell cycle control, has similarity to response regulator proteins of bacterial two-component systems. Has similarity to DNA-binding region of heat shock transcription factors. May be involved in regulation of pseudohyphal differentiation upon nutrient starvation.
26	YLR328W	10	1	C-term	Nicotinamide mononucleotide (NMN) adenylyltransferase, nucleotide metabolism.
27	Leu9p/ YOR108W	159	1	C-term	Leu9p, structural gene for alpha-IPMS II (isopropylmalate syntase II), responsible for the residual alpha-IPMS activity found in a leu4Delta strain. Protein with similarity to Leu4p. Amino-acid metabolism.
Protein transport and endocytosis					
1	Did2p	3984	1	Complete	Class E vacuolar-protein sorting and endocytosis factor involved in Doa4-independent degradation and RAD52 Inhibition. Overproduction causes growth inhibition and G2 arrest in rad52 and cdc9 mutants.
2	Did4p YKL002W	4117	1		Class E vacuolar-protein sorting and endocytosis factor, which function in the maturation of a late endosome/prevacuolar compartment into multivesicular bodies that then fuse with the vacuole, has similarity to human BC-2 breast adenocarcinoma marker protein, interacts with Spc24p in a two-hybrid assay.
3	Mvp1p	1791	1	M	Protein required for sorting proteins to the vacuole, interacts genetically with Vps1p.

4	Pdr1p	4062-4102-4101	3	C-term	Zinc-finger transcription factor of the Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain type that regulates the expression of several ATP binding cassette transporter-encoding genes involved in multiple drug resistance (Asparagin rich). General positive regulator of permeability genes. Lipid, fatty acid and sterol metabolism. Small molecules transport.
5	Sec18p	264-3868	2	Complete+C-Term	ATPase. Cytoplasmic protein involved in protein transport between ER and Golgi. Protein required for fusion of vesicles to target membranes as well as for vacuolar fusion,. Extrinsic plasma membrane protein.
6	Sla2p	4044	1		Transmembrane protein involved in membrane cytoskeleton assembly, actin filament organization, cell polarization and cell wall organization and biogenesis; also required for the internalization phase of endocytosis and exocytosis. structural protein of cytoskeleton
7	Snf7p	4067	1		Protein involved in glucose derepression. Involved in protein sorting in pre-vacuolar endosome. Essential for multivesicular body sorting. Member of a small family of coiled-coil-forming proteins involved in a cargo-specific event.
8	Yip3p	4012	1		Vesicle coat protein involved in vesicular transport and membrane fusion. Found in golgi, overexpressed GalBD-Yip3p hybrid restores silencing to HMR-E silencer that has had several of its regulatory elements replaced with UAS-Gal regulatory elements. Interacts with YPT proteins.
rRNA and snoRNA maturation					
1	Gar1p	4170	1	M	Protein involved in 35S rRNA processing and pseudouridylation; associated with the H/ACA class small nucleolar RNAs.
ORFs					
1	YDL189W	4013-4074-4166	1		There is a mouse homologue with 28% ID. Contains an intron.
2	YDR229W	4229	1		Protein of unknown function, possible coiled-coil protein.
3	YGR268C	7-14-15	3		Has 27% proline residues in N-terminal region (DNA J protein family signature).
4	YIL077C	4064	1		
5	YJR115W	4140	1		A deletion mutant has been made. Has 39% similarity to Ecm13p which is a protein possibly involved in cell wall structure or biosynthesis.
6	YKL183W/Lot5p	4042	1		<u>Low temperature responsive 5</u> . Among five <i>Saccharomyces cerevisiae</i> genes whose expressions is up-regulated when culture temperature was down-shifted from 30 to 10°C. Interacts with Leu4p in a two-hybrid assay.
7	YKR021W	4097-4111	2		Has 46% identity to YJL084p over 675 amino acids, not essential.
8	YLR338W/Kre21p	3983	1	Complete	Reserved name for <u>Killer toxin Resistant</u> . Null mutant is resistant to K1 killer.

9	YNL058C	4087	1		Has 2 potential transmembrane segments, has a putative PEST motif.
10	YNL091W	4143	1		Protein with similarity to Uso1p and human NF2 neurofibromatosis type 2 gene product,(has possible relation to mating response gene).
11	YNL124W	3990	1	C-term	Essential.
12	YOL070C	3999-4201	2	C-term	Cell cycle regulated expression, no known function, interacts with Sxm1p in a two-hybrid assay.
13	YPR118W	4072	1		Has similarity to translation initiation factor eIF2B subunits Gcn3p and Gcd2p. Interacts with Spo12p in a two-hybrid assay.
Variety					
1	Ecm39p	4008	1		Protein involved in cell wall structure or biosynthesis, has multiple predicted transmembrane segments.
2	Nog1p	366	1	C-term	"Nucleolar G-protein 1" Nucleolar GTPase, has similarity to Halobacterium cutirubrum GTP-binding protein. Essential. Purifies with the nuclear pore complex proteins.
3	Rsp5p	4095-4030-1790	3	M	Essential ubiquitin-protein ligase (E3 enzyme), a member of HECT domain family of ligases.
4	Ty2	1785-4094	2		Gag protein.

Annexe III

A Physical Interaction between Gar1p and Rnt1p Is Required for the Nuclear Import of H/ACA Small Nucleolar RNA-Associated Proteins

Annie Tremblay,¹ Bruno Lamontagne,¹ Mathieu Catala,¹ Yeung Yam,¹ Stephanie Larose,¹ Liam Good,² and Sherif Abou Elela^{1*}

Groupe ARN, Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4,¹ and Center for Genomics and Bioinformatics, Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm, Sweden²

Received 6 February 2002/Returned for modification 8 March 2002/Accepted 21 March 2002

During rRNA biogenesis, multiple RNA and protein substrates are modified and assembled through the coordinated activity of many factors. In *Saccharomyces cerevisiae*, the double-stranded RNA nuclease Rnt1p and the H/ACA snoRNA pseudouridylation complex participate in the transformation of the nascent pre-rRNA transcript into 35S pre-rRNA. Here we demonstrate the binding of a component of the H/ACA complex (Gar1p) to Rnt1p in vivo and in vitro in the absence of other factors. In vitro, Rnt1p binding to Gar1p is mutually exclusive of its RNA binding and cleavage activities. Mutations in Rnt1p that disrupt Gar1p binding do not inhibit RNA cleavage in vitro but slow RNA processing, prevent nucleolar localization of H/ACA snoRNA-associated proteins, and reduce pre-rRNA pseudouridylation in vivo. These results demonstrate colocalization of various components of the rRNA maturation complex and suggest a mechanism that links rRNA pseudouridylation and cleavage factors.

In eukaryotes, the 25S/28S, 18S, and 5.8S rRNAs are produced by RNA polymerase I as single RNA transcripts that are processed, modified, and assembled into ribosomes within the nucleolus (41). In *Saccharomyces cerevisiae*, trimming of the nascent pre-rRNA 3' end and RNA modifications produce the first stable rRNA precursor (50). The 35S pre-rRNA is subjected to a series of further cleavages that remove external transcribed spacers 1 and 2 and internal transcribed spacers 1 and 2 to produce mature rRNA. Changes in the sequence of cleavage or modification sites within the pre-rRNA transcript usually alter the cleavage pattern at distal sites, indicating an interdependent processing pathway (3, 5, 36). However, the mechanistic basis for this coordination remains undefined.

At least six endonucleolytic cleavages are required for the production of mature rRNA in yeast cells, and two endonucleases are known to be involved in rRNA maturation (50). The first is RNase MRP, a ribonucleoprotein endonuclease related to the tRNA processing enzyme RNase P (43). MRP cleaves at site A3, one of two redundant sites that lead to the formation of mature 18S rRNA (46). The second endonuclease is the double-stranded RNA (dsRNA)-specific RNase (Rnt1p), which is the orthologue of the bacterial pre-rRNA processing enzyme RNase III (2, 40). Rnt1p performs the earliest cleavage event at the 3' end of the pre-rRNA transcript immediately after transcription (2). Rnt1p is also required for the processing of several snRNAs (1, 11, 47, 49) and snoRNAs, including members of both C/D and H/ACA snoRNA families (12). Rnt1p accurately cleaves most of the snoRNA substrates in

vitro in the absence of other factors, with the exception of U18, which requires the presence of the C/D small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) Nop1p (17). Rnt1p is required for normal growth at 30°C and is essential for growth at 37°C (31). Deletion of the enzyme inhibits the cleavage of the 25S pre-rRNA and delays cleavage at site A0 upstream of the 18S rRNA (2, 26). Like MRP, Rnt1p cleaves model substrates at sites identical to those observed in vivo, indicating that no other factors are required for this cleavage reaction (2, 35, 38). Less is known about the other endonucleolytic events; however, many of those require the presence of snoRNPs. For example, cleavage at sites A1 and A2 requires the U3, U14, snR30, and snR10 snoRNPs (32, 37, 48). After endonucleolytic cleavage of the pre-rRNA, the immature termini are trimmed with 5'-3' exonucleases (e.g., Rat1p and Xrn1p) and 3'-5' exonucleases (the exosome) to produce mature rRNA (4, 16).

The rRNA undergoes extensive base modifications, including 2' O-ribose methylation and pseudouridylation (50). Methylation is achieved by an RNP complex that contains most of the C/D box snoRNAs and their associated proteins, with the exception of U3 (25). This complex recognizes the methylation sites by pairing the snoRNAs with a complementary rRNA sequence to allow base methylation, possibly by Nop1p/fibrillar (6). rRNA pseudouridylation is performed by a snoRNP complex that contains H/ACA snoRNAs and at least four proteins, Gar1p, Nhp2p, Nop10p, and Cbf5p, which is likely a pseudouridylation complex (39, 51). All four proteins are required for both pseudouridylation and normal cleavage of the 18S pre-rRNA. Depletion of Nhp2p, Cbf5p, or Nop10p results in rapid degradation of Gar1p and the H/ACA snoRNAs, including snR30 and snR10, which are needed for 18S pre-rRNA cleavage (22, 29). Gar1p appears to participate in rRNA cleavage and pseudouridylation through a different mechanism (9, 19).

* Corresponding author. Mailing address: Groupe ARN, Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4. Phone: (819) 564-5275. Fax: (819) 564-5392. E-mail: sabou@courrier.usherb.ca.

Depletion of Gar1p blocks rRNA pseudouridylation without affecting the accumulation of the snoRNAs or the protein components of the H/ACA snoRNP complex (9).

In vivo labeling experiments have revealed a temporal order for rRNA maturation, where rRNA modifications occur predominantly on the 35S pre-rRNA immediately after cleavage of the nascent 3' end (50). To maintain this order, one would expect the presence of a coordinating signal recognized by the machinery for both rRNA cleavage and modification. It was thought that this signal is provided by a conserved sequence motif, but an extensive search within the pre-rRNA sequence has failed to identify such a signal in *cis* (5). This result suggests that the coordination of ribosome biogenesis may be activated instead by protein signals that function in *trans*. To understand how rRNA modification is regulated and to find potential signals that coordinate ribosome biogenesis, we have searched for proteins that connect pre-rRNA cleavage and modification. The endoribonuclease Rnt1p, which performs the first pre-rRNA cleavage, was used to screen yeast genomic libraries for interacting proteins by using a two-hybrid assay. The screen identified an interaction between Rnt1p and Gar1p, a component of the pseudouridylation snoRNP complex. This interaction was verified in vitro and shown to be required for the nucleolar localization of Gar1p and its associated proteins. This work reveals a mechanism that ensures the colocalization and hence the coordinated functions of components of the pre-rRNA cleavage and modification machinery.

MATERIALS AND METHODS

Strains and plasmids. Yeast cells were grown and manipulated according to standard procedures (20, 44). The Δ RNT1 strain was described previously (13). Yeast strain PJ69-4A was described previously (24). Gar1p, Rnt1p, and Cbf5p were expressed by using pGBDU (24) and pACT2 (Clontech Labs, Inc., Palo Alto, Calif.). pGBDU plasmids that contain fragments of RNT1 were described previously (31). BD-dsRBD3 was constructed by removing an *AvrII*-*BglII* fragment from BD-dsRBD (DS1) (31). BD-dsRBD4 was cloned by inserting an Rnt1p C-terminal *PstI* fragment from BD-dsRBD (DS1) into pGBDU-C2. Gar1p was PCR amplified from yeast genomic DNA with primers 5'-TAATGAGTTTCAGAGG-3' and 5'-CTAGCTAGATTATCTTC-3' and cloned into the *SmaI* site of pUNI15 (33), resulting in pUNI-Gar1p. The glutathione *S*-transferase (GST)-Gar1p bacterial expression plasmid was generated by site-specific recombination with the pHB2-GST vector (34). AD-Gar1p/1-205 was cloned by insertion of an *EcoRI*-*XhoI* GARI fragment from pUNI-Gar1p into the *EcoRI*-*XhoI* sites of pACT2. pCu423-Gar1p was made by inserting a PCR fragment of GARI amplified from pUNI-Gar1p into the *EcoRV* site of pCu423 (27) with the 5' end primer 5'-TAATGAGTTTCAGAGG-3' and the 3' end primer 5'-CTAATGGTGGTGATGATGATGTCTTCTACTCCTC-3', which introduced a six-His tag at the 3' end of GARI. The pGBDU-Cbf5p and pGAD-Cbf5p plasmids were made by inserting an *EcoRI*-*XhoI* fragment originating from pCBF5-BFG (52) into the *EcoRI*-*SalI* sites of pGBDU-C3 and pGAD-C3, respectively. Rnt1p-ST was made by amplifying RNT1 by PCR with primers 5'-CAAGCTTTGGATCCAATGGGCTC-3' and 5'-GGCTTAAAAATCTAAC-3'. This amplification removed the native stop codon in Rnt1p, causing translation termination in the vector-encoded stop codon. Rnt1p-M was obtained by random PCR mutagenesis (10). Rnt1p-AA was constructed by using double PCR with an oligonucleotide that introduces a mutation (5'-CAAAAGAATGCGCAAGA AAATT-3') into Rnt1p and a primer complementary to the sequence of the vector pGBDU. Immunofluorescence studies were performed by using the Δ RNT1 strain transformed with pCu423-Gar1p, pCBF5-BFG, AD-Gar1p, BD-C6F5p, and either pGBDU, pGBDU-Rnt1p, or pGBDU-Rnt1p-AA.

Two-hybrid screen and analysis. The two-hybrid screen was conducted by using the Rnt1p gene fused to the Gal4 DNA binding domain (BD) (31). Yeast strain PJ69-4A harboring the pGBDU-Rnt1p plasmid was transformed with three different yeast DNA libraries fused to the Gal4 AD (24). The transformants were selected by using synthetic complete defined (SCD) medium without

uracil, leucine, and lysine. Cells with interacting proteins were selected by replica plating on SCD medium lacking either adenine or histidine and supplemented with 20 mM 3-aminotriazole (24). The dependence of cell growth on the protein interaction was examined by testing bait and prey plasmid cosegregation. Cells were grown on a medium that selects only for the interaction (SCD without adenine) and then tested for growth on a medium that selects for the interacting plasmids (SCD without leucine and uracil). Colonies that kept both plasmids after growth on the interaction selection medium were tested for the Rnt1p-dependent interaction. Plasmids harboring Rnt1p were eliminated by growth on medium containing 5-fluoroorotic acid, and colonies were retested. Cells that did not grow without BD-Rnt1p were retransformed with pGBDU-C3 and retested for the interaction. Cells needing BD-Rnt1p and not BD to activate the test promoters were stored. The prey plasmids from 122 colonies were sequenced (24) and identified by using a yeast genome database (14). Two-hybrid assays with Gar1p or Cbf5p and with the various versions of Rnt1p were conducted as described previously (31).

Northern blot analysis. Northern blot analysis was performed as described earlier (1) with oligonucleotides against snR43 (12) or snR10 (5' CATGGGTC AAGAACGCCCGGAGGGG-3'). Analysis of pre-rRNA processing was performed by using probes B and C, which were described earlier (2).

Cleavage and gel shift assays. The radiolabeled RNAs used in the enzymatic assays were generated with T7 RNA polymerase in the presence of [α -³²P]UTP. The RNA substrates were produced from a T7 promoter of the plasmid pRS316 rRNA 3' end (30). For in vitro cleavage, 24 pmol of RNA was incubated with 0.1 pmol of Rnt1p for 20 min at 30°C in 20 μ l of reaction buffer. Stop buffer was added, and the samples were loaded onto an 8% polyacrylamide gel (31). RNA binding reactions were performed as described previously (30).

Protein purification. Recombinant six-His-Rnt1p was purified as described previously (30). GST-Gar1p was produced in *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pLysS (Promega Corporation, Madison, Wis.) and purified on a 5-ml glutathione-Sepharose column (APB, Baie d'Urfé, Québec, Canada). The column was washed with 15 column volumes of phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.3) and then eluted with 5 column volumes of elution buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 10 mM reduced glutathione). The protein fractions were dialyzed (50% glycerol, 0.5 M KCl, 30 mM Tris [pH 8.0], 0.1 mM dithiothreitol [DTT], 0.1 mM EDTA) and stored at -20°C.

Pull-down assays and Western blotting. The protein quantities used in assays with purified components are described for each experiment. When assays were performed with extracts, 20 μ g of purified Rnt1p was added to bacterial extracts expressing GST-Gar1p or GST alone in PBS (21). The extracts were incubated with 50 μ l of glutathione-Sepharose 4B (APB) for 1 h with rotation at 4°C. The beads were washed four times with PBS, transferred to a new tube, washed twice with PBS, and resuspended in 1 volume of Laemmli buffer dye (28). The proteins were separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and visualized with Coomassie blue R (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) or by Western blot analysis (31). The effect of RNA on the protein interaction was tested by adding total yeast RNA, bacterial tRNA (Sigma-Aldrich Canada), or T7 RNA transcripts of the 25S pre-rRNA 3' end (2) to the binding assay samples. Proteins were visualized with anti-GST antibodies (APB) or anti-Rnt1p antibodies. Western blot analysis of total proteins involved proteins extracted from yeast cells grown to logarithmic phase in the appropriate media as described previously (31). Antibodies against Rnt1p were produced by subcutaneous immunization of a New Zealand White rabbit (Cocalico Biologicals, Inc., Reamstown, Pa.). Crude sera containing anti-Rnt1p antibodies were used at a dilution of 1:15,000.

Pulse-labeling of cellular RNA and determination of pseudouridine content of rRNA. Cells were grown in SCD medium to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6 at 26°C. The RNA was labeled in vivo by incubation with 1 mCi of [³²P]orthophosphate for 15 or 90 min at 26°C. The RNA was extracted, run on a 1.0% agarose-formaldehyde gel, and visualized by autoradiography to observe rRNA processing. The ψ content in the 25S rRNA was determined as described previously (52) with modifications. The 25S rRNA was separated by agarose gel electrophoresis and eluted from total RNA that had been labeled by incubating the cells for 90 min in the presence of [³²P]orthophosphate. The RNA was digested with RNase T₂ (CLT, Burlington, Ontario, Canada), and 50,000 cpm of digested RNA was used for two-dimensional thin-layer chromatography (TLC) as described earlier (52). The ribonucleotides were visualized by autoradiography and quantified with InstantImager (Packard, Meriden, Conn.).

Glycerol gradient sedimentation analysis. Glycerol gradient sedimentation analysis was performed as described earlier (8) with several modifications. Yeast cells (OD₆₀₀ 100) were grown at 26°C in SCD medium lacking histidine, leucine, and uracil. Total proteins were extracted by using glass beads in lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8], 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 1 mM

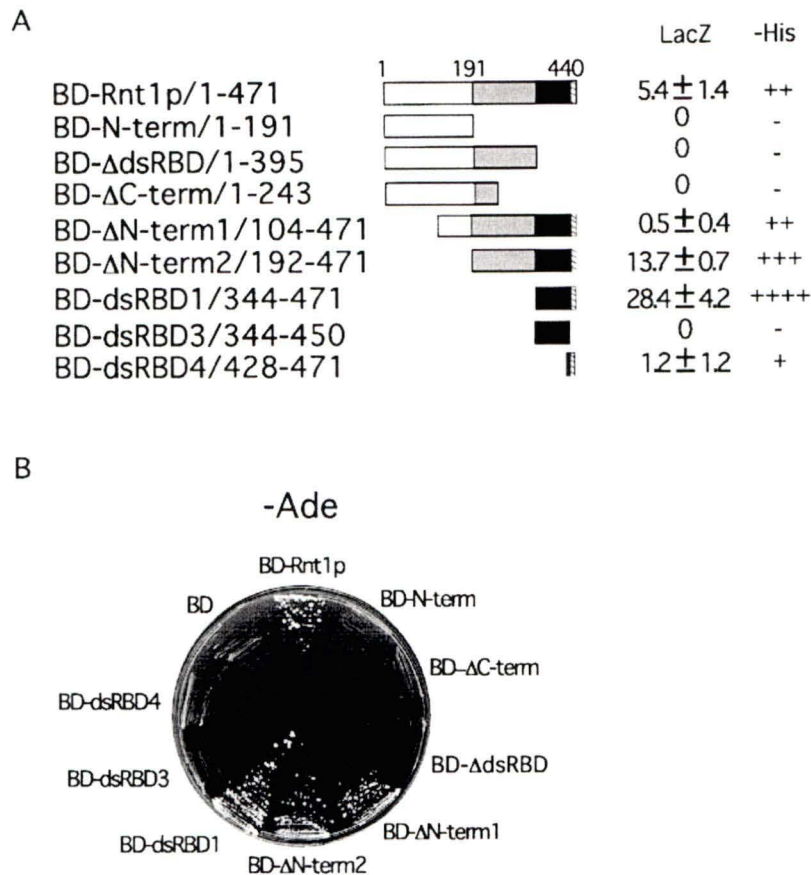


FIG. 1. Gar1p interacts with the C-terminal domain of Rnt1p *in vivo*. (A) Schematic representation of the BD-Rnt1p fragments tested for interactions with AD-Gar1p. Rnt1p has three domains; the N-terminal domain (white box), the nuclease domain (gray box), and the dsRBD (black box). The hatched box at the end of the dsRBD represents the primary Gar1p binding site. Interaction was assessed by the ability of the plasmid to support cell growth on medium without histidine (-His) (interactions: + + + +, very strong; + + +, strong; + +, moderate; +, weak; -, none) (A) or adenine (-Ade) (B). The strength of the interaction was determined by using a liquid LacZ assay (A), and the expression level averaged from three experiments is shown in Miller units (mean and standard deviation) (36).

DTT supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitors [156 μ g of benzamidin/ml, 1 μ g of aprotinin/ml, 1 μ g of leupeptin/ml, 1 μ g of pepstatin A/ml, and 1 μ g of antipain/ml]. The proteins were clarified by two centrifugation steps at $10,000 \times g$ and loaded onto 5 to 35% glycerol gradients prepared in lysis buffer (with the concentration of Triton X-100 reduced to 0.1% and that of DTT reduced to 0.5 mM). The gradients were centrifuged for 5 h at $150,000 \times g$. Fractions of 1 ml were collected and subjected to SDS-PAGE. The protein bands were visualized by Western blotting and the RNA bands were visualized by Northern blotting as described above.

Immunolocalization. Yeast cells were grown to an OD_{600} of 0.5 at 26°C in liquid medium, fixed by the addition of 37% formaldehyde (Sigma-Aldrich Canada) to 5%, and resuspended in pH 6.5 potassium phosphate-buffered 5% formaldehyde. The fixation time varied from 30 to 60 min (42). The primary antibodies used were polyclonal anti-His (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.) at a dilution of 1:1,000 to visualize six-His-Gar1p, monoclonal anti-hemagglutinin (HA) (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) at a dilution of 1:2,000 to detect HA-Cbf5p, and polyclonal anti-Nhp2p (22) at a 1:1,000 dilution. Anti-Nop1p antibody was used at a dilution of 1:10,000 (gift from J. P. Aris, University of Florida). All antibodies were revealed by Oregon green 488-conjugated goat secondary antibodies specific for either mouse or rabbit immunoglobulin G (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) and used at a 1:1,000 dilution. Antibodies were incubated at 25°C for 2 h in PBS containing 1 mg of bovine serum albumin/ml. Yeast DNA was stained with 1 μ g of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich Canada)/ml. The cells were observed with an epifluorescence Olympus IX70 microscope at a magnification of $\times 100$ (Carsen Group Inc., Markham, Ontario, Canada).

RESULTS

Yeast two-hybrid screen for protein partners of Rnt1p.

Three libraries representing yeast genomic DNAs fused in three reading frames to the Gal4 activation domain (AD) (24) were screened by using the Rnt1p sequence fused to the DNA BD of Gal4 (BD-Rnt1p). Plasmids carrying yeast genomic DNAs were transformed with BD-Rnt1p into a yeast strain harboring three marker genes (24). Interactions were scored by monitoring yeast growth on medium lacking adenine. From 3×10^6 transformants screened, 5,820 colonies grew under selection. About half of these colonies were eliminated because they grew in the absence of BD-Rnt1p, and the remaining 2,979 colonies were stored. From this stock, 122 different plasmids were retrieved and sequenced, revealing 55 known proteins and 23 unknown open reading frames. One of these plasmids, which showed a strong interaction with Rnt1p, contained a DNA fragment encoding the C-terminal 184 amino acids (aa) of the snoRNA binding protein Gar1p. This fragment of Gar1p includes the amino acid sequence required for the viability and nuclear localization of Gar1p (18). As we are

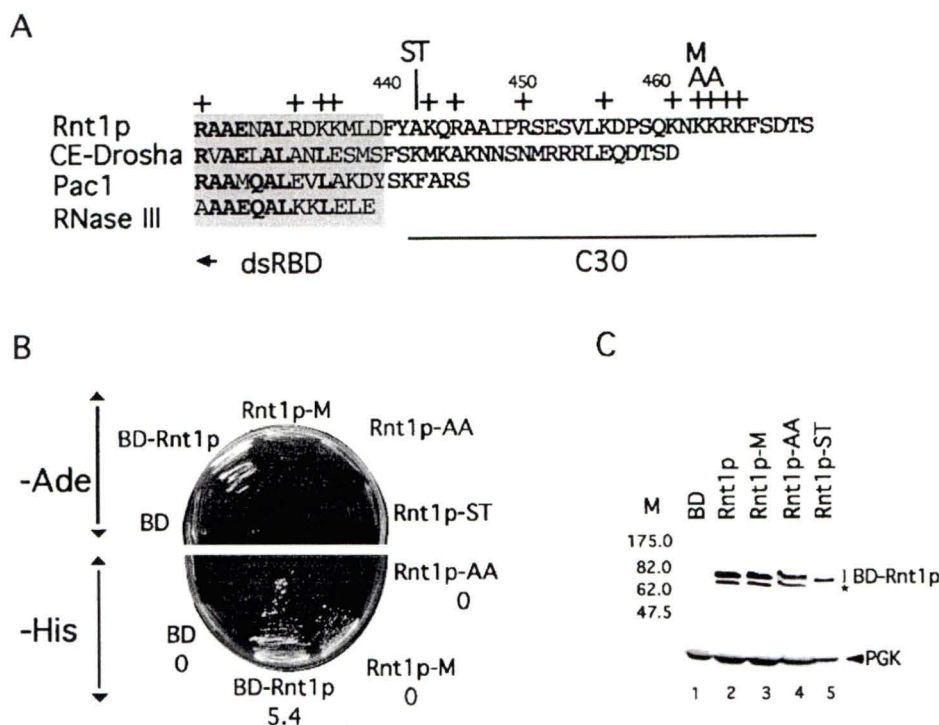


FIG. 2. Point mutations at the end of the Rnt1p C-terminal domain disrupt its interaction with Gar1p. (A) Comparison of the C termini of different RNase III (40), fission yeast Pac1 (45), worm CE-Drosha (15), and budding yeast Rnt1p (2). The shaded area represents the terminal part of the canonical dsRBD. Conserved residues are shown in boldface. The C30 region of Rnt1p that interacts with Gar1p is underlined. The plus signs indicate positively charged amino acids. The Rnt1p-ST, Rnt1p-M, and Rnt1p-AA mutants, which disrupt the Gar1p interaction, are indicated at the top. Throughout this study, all proteins were tested as fusions with the Gal4 BD. (B) Interaction assay for Gar1p and Rnt1p proteins that carry mutations in the C30 region. Yeast cells carrying Gar1p fused to the Gal4 AD and different Rnt1p mutants fused to the Gal4 BD were tested on medium without adenine (upper panel) or without histidine (lower panel). The interaction strength (average of three experiments) in Miller units (36) is indicated below the name of each plasmid in the lower panel. (C) Western blot analysis of Rnt1p mutations. Proteins were extracted from Δ RNT1 cells expressing different mutations in Rnt1p or expressing the Gal4 BD. Proteins were separated by SDS-PAGE and examined with polyclonal antibodies against Rnt1p. Anti-3-phosphoglycerate kinase (anti-Pak) antibodies were used as an internal control. The molecular mass markers (M) are indicated on the left in kilodaltons. The asterisk indicates proteins that were formed due to a stop codon that was removed during the construction of Rnt1p-ST (see Material and Methods).

interested in pre-rRNA processing, we decided to first analyze the Rnt1p/Gar1p interaction.

Gar1p specifically interacts with the C-terminal domain of Rnt1p in vivo. A full-length genomic copy of Gar1p was fused to the Gal4 AD (AD-Gar1p) and tested for an interaction with BD-Rnt1p. As shown in Fig. 1, AD-Gar1p interacted with BD-Rnt1p, confirming the interaction identified by the two-hybrid screen. Rnt1p has an N-terminal domain required for correct protein conformation, a nuclease domain essential for RNA cleavage, and a dsRNA BD (dsRBD) needed for RNA binding (31). To map the Gar1p BD of Rnt1p, a series of Rnt1p deletion mutants were tested for interactions with Gar1p. Deletions of the dsRBD (BD-N-term/1–191, BD- Δ dsRBD/1–395, and BD- Δ C-term/1–243) disrupted the interaction with Gar1p, while deletions of the N-terminal domain (BD- Δ N-term/1/104–471 and BD- Δ N-term/2/192–471) or the nuclease domain (BD-dsRBD1/344–471) did not (Fig. 1). Deletion of 21 aa downstream of the dsRNA binding motif (BD-dsRBD3/344–450) abolished the interaction. The mutant with the last 44 aa (BD-dsRBD4/428–471), including 10 aa of the dsRBD, interacted weakly with Gar1p (Fig. 1). This result suggests that the amino acid residues downstream of the canonical dsRBD (Fig. 2A) form a primary Gar1p binding site. As shown in Fig. 2B, the

introduction of a stop codon at position 441 of Rnt1p, which deletes the last 30 aa, blocked the interaction with Gar1p. Therefore, the C-terminal 30 aa of Rnt1p constitute the principal Gar1p binding site, but other elements in the dsRBD strengthen the interaction.

The region containing the C-terminal 30 aa (C30 region) has no apparent binding motif but has a number of positively charged amino acids that could support an ionic interaction with Gar1p (Fig. 2A). We systematically changed these residues into uncharged amino acids and retested them for interactions with Gar1p. As shown in Fig. 2B, substitution of methionine in place of lysine 463 (Rnt1p-M) weakened the interaction between Rnt1p and Gar1p, while substitution of alanine in place of lysines 463 and 464 (Rnt1p-AA) completely blocked the interaction. These results show that the Gar1p/Rnt1p interaction is mediated by selected amino acid residues downstream of the canonical dsRBD.

Rnt1p interacts with Gar1p in vitro in the absence of any other factor. To determine whether Rnt1p interacts directly with Gar1p, we expressed both proteins in bacteria and assessed their interaction in vitro (Fig. 3). Pure six-His-Rnt1p was added to extracts of bacterial cells expressing either Gar1p fused to GST or GST alone, and the complexes were precipi-

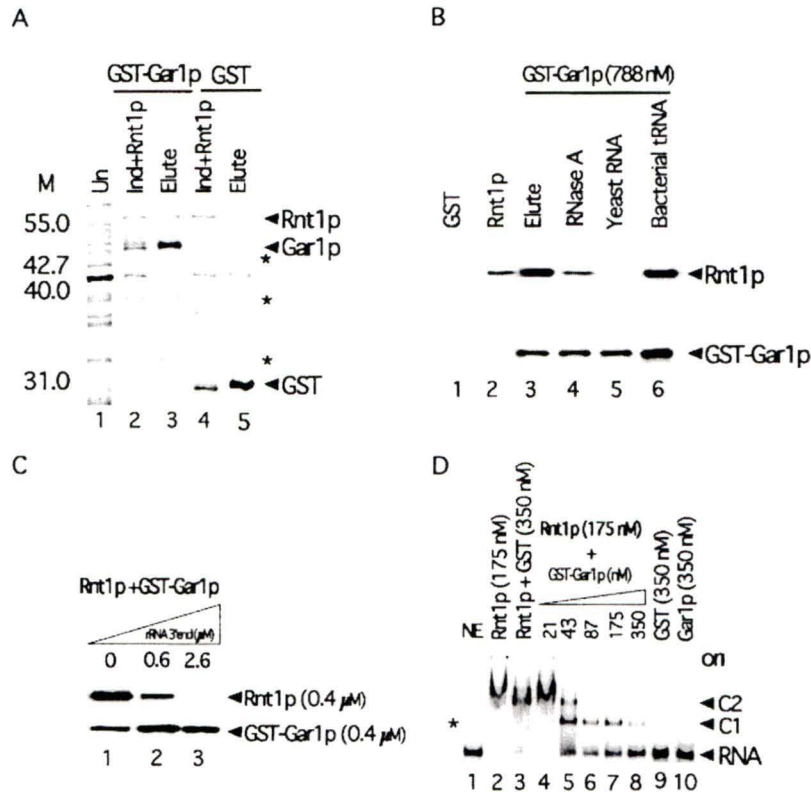


FIG. 3. Rnt1p specifically interacts with Gar1p in vitro in the absence of other factors. (A) Coprecipitation of the GST-Gar1p fusion with six-His-Rnt1p in bacterial cell extracts. Shown is a stained gel of total proteins from uninduced cells (lane 1), total proteins from cells expressing GST-Gar1p supplemented with six-His-Rnt1p (lane 2), proteins eluted from glutathione-agarose beads incubated with an extract containing GST-Gar1p and six-His-Rnt1p (lane 3), total proteins from cells expressing GST and six-His-Rnt1p (lane 4), and proteins eluted from beads incubated with an extract containing GST and six-His-Rnt1p (lane 5). The protein positions are indicated on the right. The asterisks indicate degradation products of GST-Gar1p. The molecular weight markers (M) are indicated on the left. (B) Gar1p interacts with Rnt1p in the absence but not in the presence of yeast RNA. Rnt1p was incubated with GST (lane 1), GST-Gar1p (lane 3), GST-Gar1p pretreated with 10 μ g of RNase A (lane 4), GST-Gar1p and 10 μ g of yeast total RNA (lane 5), or GST-Gar1p and 10 μ g of bacterial tRNA (lane 6). The proteins were visualized by using antibodies against Rnt1p (top panel) or GST (bottom panel). The input Rnt1p was loaded directly onto the gel as a control (lane 2). (C) An Rnt1p substrate disrupts its interaction with Gar1p. Coprecipitation of GST-Gar1p and six-His-Rnt1p was tested in the presence of increasing amounts of in vitro transcribed 25S pre-rRNA 3' end (2). (D) Gar1p competes with RNA for binding to Rnt1p in a gel shift assay. RNA was incubated with no protein (lane 1), six-His-Rnt1p (lane 2), six-His-Rnt1p and GST (lane 3), or six-His-Rnt1p and increasing amounts of GST-Gar1p (lanes 4 to 8). GST (lane 9) or Gar1p (lane 10) alone was incubated with RNA as a negative control. The positions of shifted RNAs are indicated on the right. C1 and C2 represent the complexes that Rnt1p forms when binding with the 25S pre-rRNA 3' end (30). The asterisk indicates a minor form of naked RNA that runs faster than the protein-RNA complex. ori, origin.

tated with glutathione-agarose beads. As shown in Fig. 3A, both GST-Gar1p and six-His-Rnt1p were present in the lysate (lane 2) and were coprecipitated together (lane 3). In contrast, Rnt1p was not precipitated when incubated with an extract expressing GST (Fig. 3A, lane 5). Therefore, Rnt1p specifically interacts with Gar1p in vitro in the absence of any other yeast protein or RNA.

Purified recombinant Rnt1p and Gar1p were treated with RNases and tested for an interaction in a GST pull-down assay. As shown in Fig. 3B, the two proteins were coprecipitated in the absence of bacterial proteins (lane 3). Treatment with 10 μ g of RNase A (Fig. 3B, lane 4) slightly decreased the coprecipitation of the Rnt1p/Gar1p complex. Higher concentrations of RNase A did not further affect the coprecipitation of the complex (data not shown), suggesting that Rnt1p can interact with Gar1p in the absence of RNA.

The Rnt1p dsRBD appears to overlap the Gar1p binding

site (Fig. 1), and we wished to test whether the presence of RNA could alter the Rnt1p interaction with Gar1p. As shown in Fig. 3B, the addition of bacterial tRNA to a Gar1p binding reaction mixture did not affect complex formation (lane 6), whereas an equal amount of yeast total RNA abolished the Rnt1p interaction with Gar1p (lane 5). These results indicate that components of yeast RNA, possibly Rnt1p substrates, block the Rnt1p interaction with Gar1p.

To more specifically determine whether Rnt1p substrates can disrupt the interaction with Gar1p, we incubated the two proteins with increasing amounts of a model rRNA 3' end (2) and observed the effects on complex formation. In the absence of RNA, both proteins were coprecipitated (Fig. 3C, lane 1), while the addition of substrate concentrations equal to or greater than that of Rnt1p inhibited complex precipitation (lanes 2 and 3). These results show that Rnt1p substrates disrupt the interaction with Gar1p. In addition, we tested the

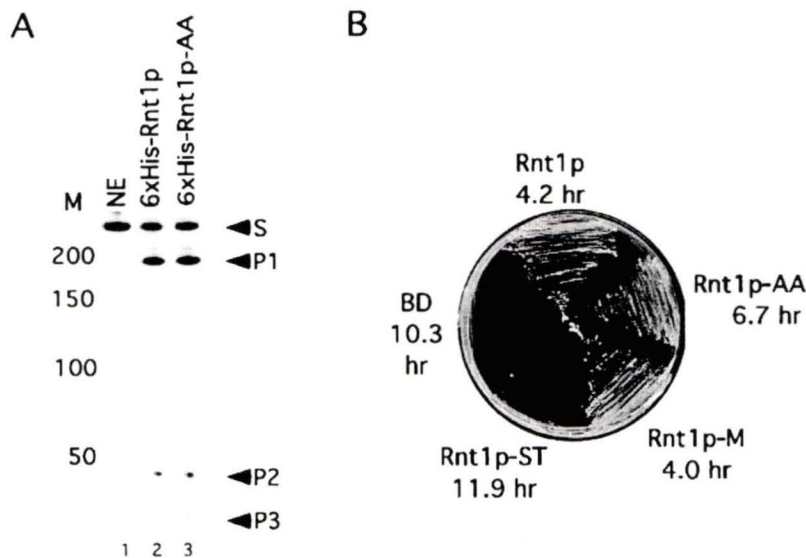


FIG. 4. Mutations that disrupt the Rnt1p interaction with Gar1p slow yeast growth without affecting RNA cleavage in vitro. (A) Six-His-Rnt1p-AA efficiently cleaves RNA in vitro. A model 25S pre-rRNA 3' end substrate was incubated alone (lane 1) or with equal amounts of either six-His-Rnt1p (lane 2) or six-His-Rnt1p-AA (lane 3). The positions of the substrate (S) and the cleavage products (P1, P2, and P3) are indicated on the right. The DNA markers (M) are indicated on the left. (B) Mutations within the C30 region reduce cell growth. Cells lacking *RNT1* were transformed with plasmids carrying different *RNT1* alleles and tested for growth at 37°C on plates. The doubling time at 26°C in liquid medium was also measured, and the average of three experiments is indicated below the name of each plasmid.

effect of Gar1p on the capacity of Rnt1p to bind to RNA. As shown in Fig. 3D, lanes 6 to 8, the addition of increasing amounts of Gar1p reduces RNA binding to Rnt1p. Rnt1p alone or together with GST completely bound to and shifted the substrate (Fig. 3D, lanes 2 and 3). Gar1p did not interact with the 25S rRNA 3' end alone (Fig. 3D, lane 10), and no new complexes that could correspond to an Rnt1p/Gar1p/RNA tertiary complex were observed (Fig. 3D). We conclude that Rnt1p cannot simultaneously bind to Gar1p and its RNA substrate.

Mutations that disrupt the Gar1p/Rnt1p complex slow rRNA processing in vivo without affecting Rnt1p catalytic activity in vitro. The Rnt1p-ST and Rnt1p-AA mutants, which disrupted the interaction with Gar1p, were expressed in bacteria, and their catalytic activities were tested in vitro. Rnt1p-ST was inactive (data not shown), while Rnt1p-AA efficiently bound to and cleaved its RNA substrate (Fig. 4A). We conclude that Rnt1p interaction and catalytic activities are distinct.

Mutations that disrupted the Rnt1p/Gar1p interaction were transformed into $\Delta RNT1$ cells, and their effects on cell growth and RNA cleavage were observed. Because the fusion of Rnt1p to the Gal4 BD does not affect Rnt1p function (31), the mutants were maintained as BD fusions to allow direct comparisons of Gar1p binding efficiency and Rnt1p activity in vivo. Rnt1p complemented the *RNT1* deletion and enabled yeast cells to grow at both permissive (26°C) and restrictive (37°C) temperatures (Fig. 4B). Cells expressing the BD or Rnt1p-ST with the BD failed to grow at 37°C and grew slowly at 26°C. These results are consistent with the inability of Rnt1p-ST to cleave RNA in vitro (data not shown) and suggest an essential role for the C30 region in Rnt1p folding or activity. The Rnt1p-M mutant, which weakened the interaction with Gar1p

(Fig. 2B), grew efficiently at both 26 and 37°C, while the Rnt1p-AA mutant, which disrupted the Rnt1p/Gar1p interaction (Fig. 2B), showed partial growth at both 26 and 37°C (Fig. 4B). We conclude that the Rnt1p interaction with Gar1p is not essential but is required for optimum cell growth.

The effect of Rnt1p-AA on rRNA processing in vivo was examined by Northern blot analysis. A probe specific for sequences downstream of the Rnt1p cleavage site (Fig. 5A) or a probe specific for the 5.8S rRNA (Fig. 5B) hybridized to RNA extracted from cells lacking Rnt1p (lane 2) and revealed an accumulation of 3'-extended 25S rRNA, 35S pre-rRNA, and 27S pre-rRNA, as described previously (2, 26). However, RNA extracted from cells expressing Rnt1p-AA (Fig. 5A and B, lane 3) was similar to that extracted from wild-type cells (lane 1), revealing no accumulation of unprocessed rRNA. Similarly, the processing of other known Rnt1p snRNA and snoRNA substrates continued in cells expressing Rnt1p-AA, as judged by Northern blot analysis (data not shown). These results suggest that mutations disrupting the Rnt1p/Gar1p complex do not affect the accumulation of mature rRNA.

To determine whether the mutations K463/A and K464/A affect the rate of rRNA processing, we observed the kinetics of rRNA processing in vivo in cells that lack Rnt1p, express Rnt1p, or express Rnt1p-AA. The RNA was pulse-labeled in vivo for 15 or 90 min, and the resulting labeled RNA species were separated on an agarose gel. As shown in Fig. 5C, RNA extracted from cells expressing Rnt1p after 15 min of labeling contained pre-rRNA precursors and mature rRNA (lane 1), while RNA extracted from cells labeled for 90 min contained mainly mature rRNA (lane 4). As expected, BD-expressing cells that lacked Rnt1p showed a long delay in rRNA processing. For $\Delta RNT1$ cells, 15 min of labeling resulted in the appearance of the 35S rRNA precursor as the most visible band,

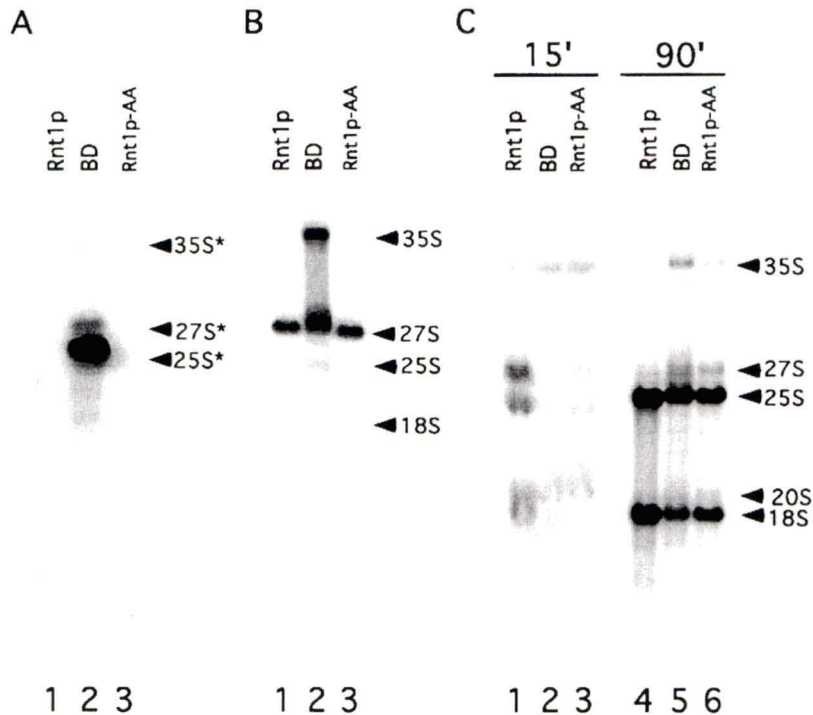


FIG. 5. Mutations that disrupt the Rnt1p/Gar1p interaction delay pre-rRNA processing. Total RNA was extracted from cells expressing Rnt1p, BD, or Rnt1p-AA, separated on a denaturing agarose gel, and subjected to Northern blot analysis with a probe against the precursor mature 3' end of the 25S (A) or 5.8S (B) rRNA to reveal rRNA precursors. (C) Pulse-labeling of rRNA. Cells expressing BD-Rnt1p, BD, or Rnt1p-AA were grown at 26°C on minimal medium lacking inorganic phosphate to mid-log phase and labeled by the addition of [³²P]orthophosphate for 15 or 90 min before the RNA was extracted and separated on a 1.2% agarose-formaldehyde gel. The position of each RNA species is indicated on the right. The asterisks indicate rRNA precursors that extended beyond the Rnt1p processing site.

and very small amounts of processing intermediates or mature RNA were detected (lane 2). After 90 min of labeling, the 35S and 27S rRNA precursors remained visible (lane 5), while mature rRNA started to accumulate. These results suggest that deletion of Rnt1p not only blocks the processing of the 25S rRNA 3' end, as previously described, but also delays all rRNA processing steps. Surprisingly, mutations that disrupted the Rnt1p/Gar1p complex but did not affect the steady-state accumulation of rRNA showed very long delays in rRNA processing, similar to that seen with a full *RNT1* deletion. Furthermore, after 15 min, the pre-rRNA remained mainly in the form of the 35S rRNA precursor (Fig. 5C, lane 3), and significant amounts of this pre-rRNA could be seen after 90 min of labeling (lane 6). Interestingly, all pre-rRNAs in these mutants appeared to eventually mature, as revealed by analysis of the steady-state RNA population (Fig. 5A and B). We conclude that mutations disrupting the Rnt1p/Gar1p complex significantly slow the processing of rRNA primary transcripts, possibly due to a delay in both Rnt1p and Gar1p processing steps.

Disruption of the Rnt1p/Gar1p interaction destabilizes the H/ACA snoRNP complex and reduces rRNA pseudouridylation in vivo. Gar1p is an integral component of the pseudouridylation complex, and its depletion blocks rRNA pseudouridylation (9). To determine the effects of disrupting the Rnt1p/Gar1p interaction on the stability of the Gar1p-associated pseudouridylation snoRNP complex, we examined the sedimentation patterns of Rnt1p and components of the Gar1p-

associated snoRNP complex in cells expressing Rnt1p or Rnt1p-AA. Extracts of cells expressing Rnt1p or Rnt1p-AA were overlaid on a glycerol gradient, and the fractions were analyzed by Western blotting with antibodies against Rnt1p or tagged versions of Cbf5p and Gar1p. The pattern of the Gar1p-associated H/ACA snoRNA snR10 was detected by Northern blotting. As shown in the left panel of Fig. 6A, in cell extracts expressing Rnt1p, fractions 6 to 8 contained Gar1p, Cbf5p, Nhp2p, Rnt1p, and snR10. The putative snoRNP complex migrated between the 40S and 60S ribosomal subunits. The migration pattern of Rnt1p closely followed that of Gar1p. All the fractions with detectable Gar1p also contained Rnt1p, Cbf5p, Nhp2p, and snR10, suggesting that Rnt1p interacts with snoRNP-bound Gar1p and not a distinct form of Gar1p. In cell extracts expressing Rnt1p-AA, which does not interact with Gar1p, Rnt1p was no longer fractionated with the other proteins and was detected closer to the top of the gradient (Fig. 6A, right panel). Nhp2p appeared to be spread randomly across the gradient, while Cbf5p was again found close to the top of the gradient. Peculiarly, both Gar1p and snR10 migrated closer to the bottom of the gradient, probably due to aggregation or abnormal interaction with a larger complex. These results confirm that mutations K463/A and K464/A (Fig. 2A) disrupt the interaction with Gar1p in vivo and reveal a relationship between Rnt1p and the sedimentation pattern of members of the pseudouridylation snoRNA complex. We con-

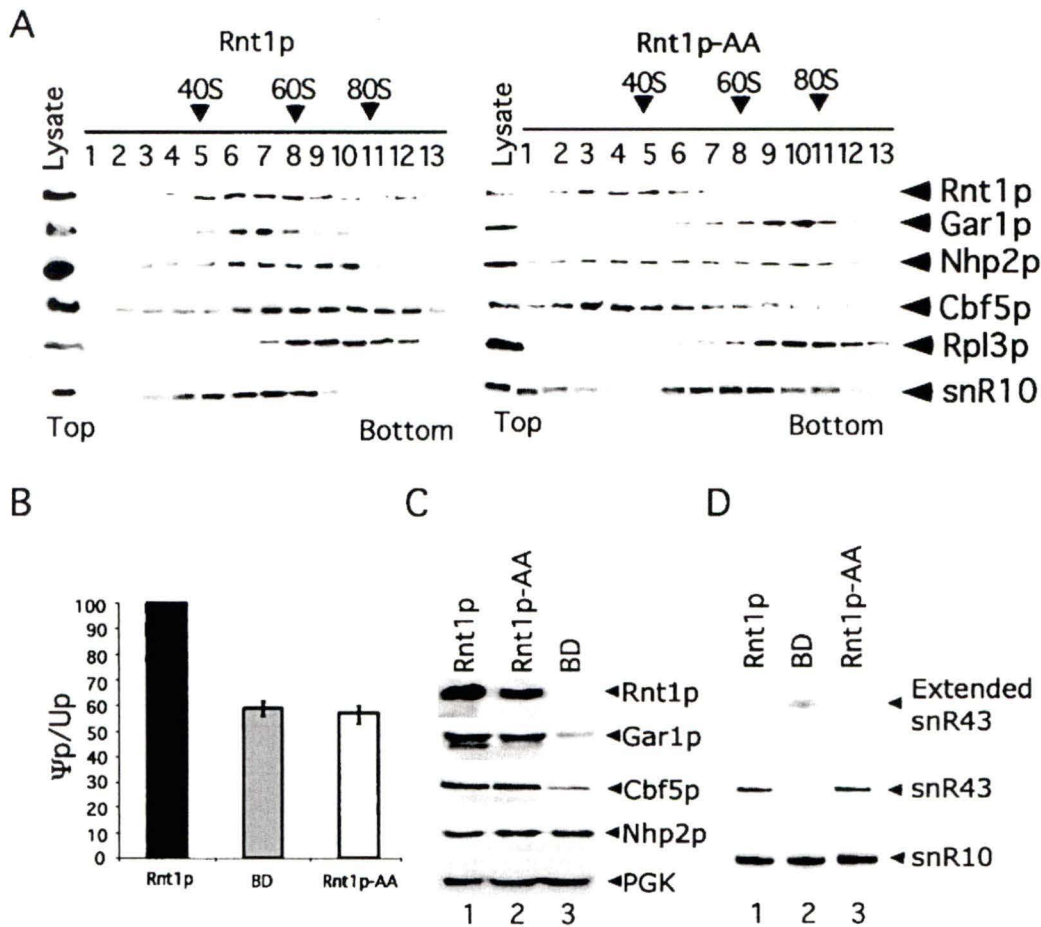


FIG. 6. Inhibition of the Rnt1p/Gar1p interaction disrupts the H/ACA snoRNP complex and reduces rRNA pseudouridylation. (A) Sedimentation analysis of the Rnt1p/Gar1p complex. Cell extracts were separated on a 5 to 35% glycerol gradient, the fractions were loaded onto an SDS-polyacrylamide gel, and the bands corresponding to the different proteins were visualized by Western blot analysis. Antibodies against the large-subunit ribosomal protein Rpl3p were used as a marker. The position of the small subunit was determined by using rRNA as a marker (data not shown). The sedimentation pattern of H/ACA snoRNA was analyzed by Northern blotting with a probe against snR10. The positions of the different proteins and RNA are indicated on the right, while the fraction numbers are indicated at the top. (B) Quantitative analysis of 25S rRNA pseudouridylation. In vivo labeled 25S rRNA was digested with RNase T₂ and subjected to two-dimensional TLC. The spots were quantified, and Ψ_p/U_p ratios were determined and indicated as a percentage of the wild-type ratio. The results are averages of three different experiments, and error bars are indicated. (C) Effect of Rnt1p on the levels of expression of Gar1p, Cbf5p, and Nhp2p. Proteins from $\Delta RNT1$ cells expressing tagged Gar1p and Cbf5p along with Rnt1p, Rnt1p-AA, or BD were analyzed by Western blotting. PGK was included as a loading control. (D) Northern blot analysis of H/ACA box snoRNA in cells expressing Rnt1p, Rnt1p-AA, or BD. RNA was extracted from different strains and detected by Northern blot analysis with radiolabeled probes against snR10 and snR43. The positions of the mature and extended RNA forms are indicated on the right.

clude that the Rnt1p association with Gar1p is required for the stability of the pseudouridylation snoRNP complex.

To determine the effects of disrupting the Rnt1p/Gar1p interaction on Gar1p-dependent pseudouridylation, we examined the effects of mutations in Rnt1p on the level of 25S rRNA pseudouridylation. In vivo labeled 25S rRNA was gel purified and digested with RNase T₂, and the ratio of Ψ_p to U_p nucleotides was examined by using TLC. Spot quantification showed that Rnt1p deletion or expression of Rnt1p-AA reduced 25S rRNA pseudouridylation by about 40% compared to the wild-type level (Fig. 6B). The levels of expression of Gar1p, Rnt1p, Nhp2p, and Cbf5p were normal in cells expressing Rnt1p-AA (Fig. 6C). The levels of expression of H/ACA snoRNAs snR10 and snR43 were also normal in cells express-

ing Rnt1p-AA (Fig. 6D) (data not shown). These results indicate that disruption of the Rnt1p/Gar1p complex reduces rRNA pseudouridylation without depleting the protein or RNA components of the pseudouridylation snoRNP complex. In contrast, deletion of Rnt1p reduces Gar1p and Cbf5p expression, possibly due to a general inhibition of snoRNA and rRNA processing (Fig. 6C) (data not shown). In $\Delta RNT1$ cells, the depletion of Cbf5p was not associated with the depletion of snR10, as previously reported (29), because the remaining fraction of Cbf5p was sufficient to stabilize the reduced amount of mature H/ACA snoRNA in $\Delta RNT1$ cells.

The interaction between Rnt1p and Gar1p is required for the nuclear localization of the pseudouridylation complex. The localization patterns for Cbf5p, Nhp2p, and Gar1p were exam-

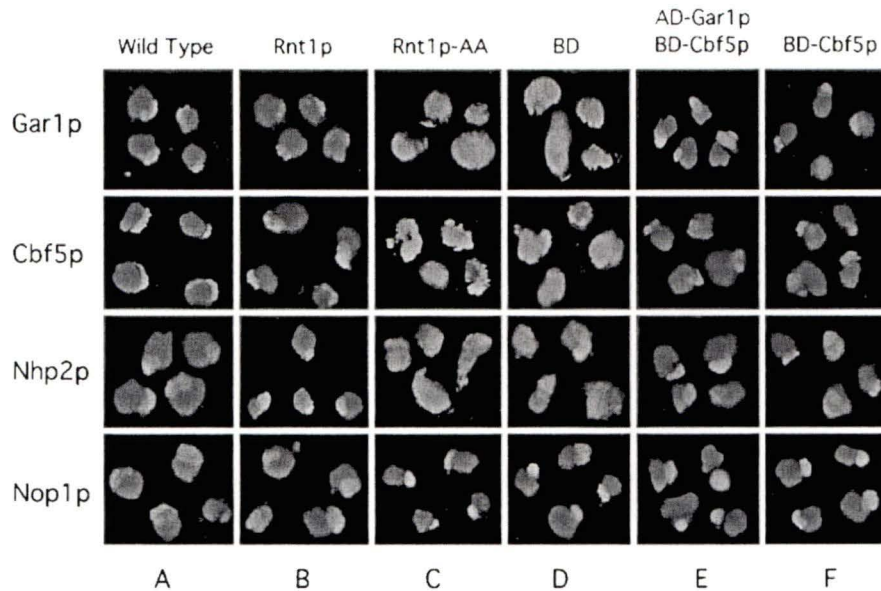


FIG. 7. Disruption of the Gar1p/Rnt1p interaction impairs the nucleolar localization of Gar1p, Cbf5p, and Nhp2p. In situ immunofluorescence analysis was conducted with wild-type cells (A) or $\Delta RNT1$ cells expressing Rnt1p (B), Rnt1p-AA (C), BD (D), AD-Gar1p and BD-Cbf5p (E), or BD-Cbf5p alone (F). Blue represents DAPI staining of the nucleoplasm, while green represents antibodies against Gar1p, Cbf5p, Nhp2p, or Nop1p visualized by Oregon green-conjugated goat secondary antibodies. Costaining appears in blue-green.

ined in the absence of Rnt1p or in the presence of Rnt1p-AA. The proteins were visualized in situ by using antibodies against Rnt1p, Nhp2p, HA-Cbf5p, and six-His-Gar1p. Wild-type and Rnt1p cells (Fig. 7A and B) showed a similar crescent-shaped staining of Cbf5p, Nhp2p, and Gar1p, corresponding to the nucleolus. Rnt1p-AA cells showed a staining pattern ranging from cytoplasmic staining to nearly normal nucleolar staining for all three proteins (Fig. 7C). Examination of 300 Rnt1p-AA cells revealed that 40% exhibited normal nucleolar staining for Nhp2p and 30% exhibited normal staining for either Gar1p or Cbf5p. In BD-expressing cells that lacked Rnt1p, most of the staining, including that for Nhp2p, was either cytoplasmic or cytoplasmic with overlapping nuclear staining (Fig. 7D). Patterns of immunostaining with antibodies against the C/D snoRNA-associated protein Nop1p were similar in wild-type, BD, and Rnt1p-AA cells (Fig. 7). These results indicate that the mislocalization of Gar1p, Nhp2p, and Cbf5p is not due to a general disruption of the nucleolus. We also examined the localization pattern of Rnt1p-AA and found it similar to that of wild-type Rnt1p (data not shown). This result suggests that Gar1p, Cbf5p, and Nhp2p nuclear localization requires an interaction between Rnt1p and Gar1p. To directly test this possibility, we expressed Gar1p and Cbf5p in fusions with the Gal4 BD or AD linked to the simian virus 40 (SV40) nuclear localization signal (NLS) in $\Delta RNT1$ cells and observed their localization patterns. The SV40 NLS is a strong NLS that is routinely used in two-hybrid assays to import proteins into the nucleus (24). As shown in Fig. 7E, both AD-Gar1p and BD-Cbf5p correctly localized in the nucleolus, suggesting that Gar1p and Cbf5p need Rnt1p to enter the nucleus and not associate with the nucleolus. Interestingly, Gar1p- and Cbf5p-NLS fusions also restored the localization pattern of Nhp2p, suggesting that all three proteins interact and enter the nucleus together with a single NLS provided by Rnt1p. As shown in

Fig. 7F, the expression of BD-Cbf5p alone in $\Delta RNT1$ cells restored the nucleolar localization of Cbf5p, Nhp2p, and Gar1p. We conclude that the Rnt1p/Gar1p interaction is required for the efficient localization of Gar1p and its associated proteins.

To determine whether Gar1p nucleolar localization is sufficient for rRNA pseudouridylation, we examined rRNA pseudouridylation in $\Delta RNT1$ and Rnt1p-AA cells expressing AD-Gar1p or both AD-Gar1p and BD-Cbf5p carrying the SV40 NLS. As shown in Fig. 8, the expression of both AD-Gar1p and BD-Cbf5p restored rRNA pseudouridylation to about 75% the wild-type level, indicating that Gar1p is partially responsible for the pseudouridylation defect caused by the deletion of Rnt1p. This result is not surprising, since the deletion of Rnt1p blocks the processing of many H/ACA snoRNAs needed for rRNA pseudouridylation. The expression of both AD-Gar1p and Rnt1p-AA in $\Delta RNT1$ cells did not completely restore 25S rRNA pseudouridylation. This result suggests that AD-Gar1p nucleolar localization remains less efficient than Rnt1p-dependent localization or that the Gar1p/Rnt1p interaction is also required for efficient rRNA processing.

DISCUSSION

In this study, we showed binding between the rRNA cleavage enzyme Rnt1p and Gar1p, a component of the pseudouridylation snoRNP complex. Mutations that disrupted the Rnt1p/Gar1p interaction did not inhibit the expression of Gar1p or its associated snoRNPs but slowed rRNA maturation and reduced pseudouridylation of 25S rRNA (Fig. 5 and 6). In situ immunofluorescence analysis showed that disrupting the Rnt1p/Gar1p interaction impairs the nucleolar localization of Gar1p, Nhp2p, and Cbf5p (Fig. 7). Fusion of an NLS to Gar1p or Cbf5p restored the nucleolar localization of Gar1p, Cbf5p,

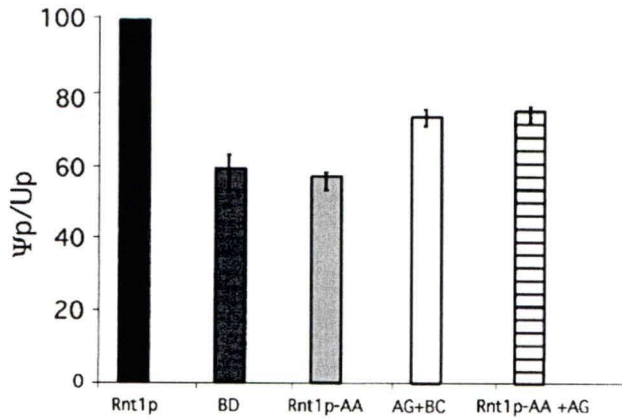


FIG. 8. Rnt1p-independent nucleolar localization of Gar1p partially restores rRNA pseudouridylation. RNA was extracted from $\Delta RNT1$ cells expressing BD, Rnt1p, and Rnt1p-AA as described in the legend to Fig. 6. In addition, RNA was extracted from cells transformed with three different plasmids expressing BD, AD-Gar1p plus BD-Cbf5p (AG+BC), and Rnt1p-AA plus Gar1p (Rnt1p-AA+AG). Total RNA was separated on a denaturing gel, and 25S rRNA was extracted. The purified 25S rRNA was digested with RNase T₂ and subjected to two-dimensional TLC. The spots were quantified, and $\Psi p/U p$ ratios were determined and indicated as a percentage of the wild-type ratio. The results are averages of three different experiments, and error bars are indicated.

and Nhp2p independently of Rnt1p (Fig. 7). These results demonstrate a link between Rnt1p and the H/ACA snoRNP complex and suggest coordinated transport and function of the rRNA cleavage and pseudouridylation machineries.

Physical link between Rnt1p and the 35S pre-rRNA maturation complex. In yeast cells, pre-rRNA processing starts immediately after transcription with Rnt1p cleavage downstream of the 25S rRNA to form 35S pre-rRNA (2, 26). This cleavage event was thought to be physically and functionally distinct from 35S pre-rRNA maturation. Here, we provide evidence that Rnt1p physically interacts with Gar1p, a factor required for the pseudouridylation and cleavage of 35S pre-rRNA (Fig. 1 and 2). This interaction links factors required for cleavage at the 3' end of the 25S pre-rRNA with those needed for cleavage at the pre-rRNA 5' end and rRNA pseudouridylation (9). The connection between processing of the nascent pre-rRNA transcript and the 35S pre-rRNA would ensure ordered pre-rRNA processing and prevent processing of incomplete or erroneous transcripts. Indeed, the disruption of the Gar1p/Rnt1p interaction slows cleavage at both the 5' and the 3' ends of the pre-rRNA (Fig. 5C) and reduces 25S rRNA pseudouridylation (Fig. 6B). The fact that rRNA cleavage and pseudouridylation are not completely blocked upon loss of the Rnt1p/Gar1p interaction suggests that the interaction plays a coordinating rather than a housekeeping role in rRNA processing. The observed delay in rRNA processing and reduced pseudouridylation are unlikely to be caused by a defect in snoRNA maturation, as the maturation of H/ACA and C/D snoRNAs was not significantly affected by disruption of the Rnt1p/Gar1p interaction (data not shown). Furthermore, rRNA pseudouridylation was reduced to similar levels both when the Rnt1p/Gar1p complex was disrupted and when Rnt1p was deleted,

despite the tremendous difference in the amounts of mature snoRNA observed.

It is not clear if the Gar1p/Rnt1p complex is the only direct connection between Rnt1p and the 35S rRNA processing machinery or whether other interactions reinforce this link. Recently, an interaction between Rnt1p and the C/D snoRNA-associated protein Nop1p was shown to play a role in the processing of U18 snoRNA, but the effect of this interaction on rRNA processing was not tested (17). In our screen, Gar1p was the only known factor related to pre-rRNA maturation. However, we have sequenced only 4% of the plasmids recovered, and more pre-rRNA maturation factors may exist in the pool. In any case, the connection between Rnt1p and the pseudouridylation complex appears to be mediated primarily by Gar1p. Disruption of the Gar1p interaction with Rnt1p alters the localization pattern not only for Gar1p but also for Nhp2p and Cbf5p (Fig. 7). In addition, Rnt1p does not interact directly with Cbf5p in a two-hybrid system, nor does Rnt1p interact with H/ACA snoRNAs *in vivo* or *in vitro* (Y. Yam, B. Lamontagne, S. Larose, and S. Abou Elela, unpublished observations).

Gar1p is required for coupled transport of Rnt1p and protein components of the pseudouridylation snoRNP complex.

The contribution of Gar1p to the pseudouridylation reaction is not known. Gar1p is not required for the production or stability of the pseudouridylation snoRNP complex, nor does it possess homology with pseudouridylases (7, 9). However, depletion of Cbf5p or Nhp2p results in the rapid degradation of Gar1p, while depletion of Gar1p does not affect the stability of any of the H/ACA snoRNP components but appears to affect the association of the snoRNP complex with rRNA (9, 23, 51). These findings suggest that Gar1p is not a core component of the pseudouridylation machinery and suggest a possible role for Gar1p as a regulator or coordinator of rRNA pseudouridylation. The role of Gar1p as a coordinator is further supported by the results shown in this study. Disruption of the Rnt1p/Gar1p interaction blocks not only the nuclear import of Gar1p but also the import of Cbf5p and Nhp2p. Therefore, the three proteins appear to enter the nucleus by a single NLS provided by Rnt1p, with Gar1p providing a structural bridge. This coordinated transport would ensure the simultaneous and equimolar import of the H/ACA snoRNP components and link it to the import of the rRNA cleavage enzyme Rnt1p.

In addition to its role in ensuring the coimport of the H/ACA snoRNP components, Gar1p may also help coordinate rRNA cleavage and pseudouridylation. The fact that Gar1p needs to interact with Rnt1p to reach the nucleus (Fig. 7) suggests that the two proteins enter the nucleus as a complex. However, since Rnt1p cannot simultaneously bind Gar1p and its RNA substrate (Fig. 3C), it is likely that the complex is disrupted upon encountering Rnt1p substrates in the nucleolus. This means that Rnt1p and Gar1p reach their site of activity and probably function in a coordinated manner. On the other hand, we cannot rule out the possibility that the binding of Rnt1p to Gar1p is required for the initiation of rRNA pseudouridylation. In this scenario, Rnt1p binding to Gar1p is blocked by Rnt1p substrates until processing is complete and RNA pseudouridylation is needed. It is clear that the interaction of Rnt1p and Gar1p physically links components of the rRNA processing and pseudouridylation machineries, and this

observation underscores the possibilities for coordinated rRNA processing.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Carbon, S. Fournier, J. Warner, J. Aris, J. P. Gélugne, P. James, S. Labbé, D. Thiele, and S. J. Elledge for sending plasmids, strains, and antibodies. We are indebted to B. Chabot, R. Wellinger, and all the members of the laboratory of Sherif Abou Elela for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grant 216854 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and grant MOP-14305 from the Canadian Institute for Health Research (CIHR). Support for the RNA group core was provided by CIHR. S.A.E. is Chercheur-Boursier Junior II of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Abou Elela, S., and M. Ares, Jr. 1998. Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *EMBO J.* 17:3738-3746.
- Abou Elela, S., H. Igel, and M. Ares, Jr. 1996. RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 85:115-124.
- Allmang, C., Y. Henry, J. P. Morrissey, H. Wood, E. Petfalski, and D. Tollervey. 1996. Processing of the yeast pre-rRNA at sites A(2) and A(3) is linked. *RNA* 2:63-73.
- Allmang, C., J. Kufel, G. Chanfreau, P. Mitchell, E. Petfalski, and D. Tollervey. 1999. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* 18:5399-5410.
- Allmang, C., and D. Tollervey. 1998. The role of the 3' external transcribed spacer in yeast pre-rRNA processing. *J. Mol. Biol.* 278:67-78.
- Bachelier, J. P., and J. Cavaille. 1997. Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem. Sci.* 22:257-261.
- Bagni, C., and B. Lapeyre. 1998. Gar1p binds to the small nucleolar RNAs snR10 and snR30 in vitro through a nontypical RNA binding element. *J. Biol. Chem.* 273:10868-10873.
- Billy, E., T. Wegierski, F. Nasr, and W. Filipowicz. 2000. Rcl1p, the yeast protein similar to the RNA 3'-phosphate cyclase, associates with U3 snoRNP and is required for 18S rRNA biogenesis. *EMBO J.* 19:2115-2126.
- Bousquet-Antonelli, C., Y. Henry, P. G'Elugne, J., M. Calzergues-Ferrer, and T. Kiss. 1997. A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs. *EMBO J.* 16:4770-4776.
- Cadwell, R. C., and G. F. Joyce. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 2:28-33.
- Chanfreau, G., S. A. Elela, M. Ares, Jr., and C. Guthrie. 1997. Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes Dev.* 11:2741-2751.
- Chanfreau, G., P. Legrain, and A. Jacquier. 1998. Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J. Mol. Biol.* 284:975-988.
- Chanfreau, G., G. Rotondo, P. Legrain, and A. Jacquier. 1998. Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1. *EMBO J.* 17:3726-3737.
- Cherry, J. M., C. Ball, S. Weng, G. Juvik, R. Schmidt, C. Adler, B. Dunn, S. Dwight, L. Riles, R. K. Mortimer, and D. Botstein. 1997. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 387:67-73.
- Filippov, V., V. Solovyev, M. Filippova, and S. S. Gill. 2000. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245:213-221.
- Geerlings, T. H., J. C. Vos, and H. A. Raue. 2000. The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA* 6:1698-1703.
- Giorgi, C., A. Fatica, R. Nagel, and I. Bozzoni. 2001. Release of U18 snoRNA from its host intron requires interaction of Nop1p with the Rnt1p endonuclease. *EMBO J.* 20:6856-6865.
- Girard, J. P., C. Bagni, M. Calzergues-Ferrer, F. Amalric, and B. Lapeyre. 1994. Identification of a segment of the small nucleolar ribonucleoprotein-associated protein GAR1 that is sufficient for nucleolar accumulation. *J. Biol. Chem.* 269:18499-18506.
- Girard, J. P., H. Lehtonen, M. Calzergues-Ferrer, F. Amalric, D. Tollervey, and B. Lapeyre. 1992. GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J.* 11:673-682.
- Guthrie, C., and G. R. Fink. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Henras, A., Y. Henry, C. Bousquet-Antonelli, J. Noailles-Depeyre, J. P. Gélugne, and M. Calzergues-Ferrer. 1998. Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.* 17:7078-7090.
- Henry, Y., H. Wood, J. P. Morrissey, E. Petfalski, S. Kearsey, and D. Tollervey. 1994. The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* 13:2452-2463.
- James, P., J. Halladay, and E. A. Craig. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436.
- Kiss, L., Z. Y. Henry, J. P. Bachelier, M. Calzergues-Ferrer, and T. Kiss. 1996. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85:1077-1088.
- Kufel, J., B. Dichtl, and D. Tollervey. 1999. Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA* 5:909-917.
- Labbé, S., and D. J. Thiele. 1999. Copper ion inducible and repressible promoter systems in yeast. *Methods Enzymol.* 306:145-153.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lafontaine, D. L. J., C. Bousquet-Antonelli, Y. Henry, M. Calzergues-Ferrer, and D. Tollervey. 1998. The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev.* 12:527-537.
- Lamontagne, B., and S. Abou Elela. 2001. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Rnt1p nuclease. *Methods Enzymol.* 342:159-167.
- Lamontagne, B., A. Tremblay, and S. Abou Elela. 2000. The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol. Cell. Biol.* 20:1104-1115.
- Li, H. D., J. Zagorski, and M. J. Fournier. 1990. Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:1145-1152.
- Liu, Q., M. Z. Li, D. Leibham, D. Cortez, and S. J. Elledge. 1998. The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr. Biol.* 8:1300-1309.
- Liu, Q., M. Z. Li, D. Liu, and S. J. Elledge. 2000. Rapid construction of recombinant DNA by the univector plasmid-fusion system. *Methods Enzymol.* 328:530-549.
- Lygerou, Z., C. Allmang, D. Tollervey, and B. Seraphin. 1996. Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science* 272:268-270.
- Melekhovets, Y. F., L. Good, S. A. Elela, and R. N. Nazar. 1994. Intragenic processing in yeast rRNA is dependent on the 3' external transcribed spacer. *J. Mol. Biol.* 239:170-180.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Morrissey, J. P., and D. Tollervey. 1993. Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 13:2469-2477.
- Nagel, R., and M. Ares, Jr. 2000. Substrate recognition by a eukaryotic RNase III: the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p selectively binds RNA containing a 5'-AGNN-3' tetraloop. *RNA* 6:1142-1156.
- Ni, J., A. L. Tien, and M. J. Fournier. 1997. Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* 89:565-573.
- Nicholson, A. W. 1999. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:371-390.
- Olson, M. O., M. Dundr, and A. Szebeni. 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* 10:189-196.
- Pringle, J. R., R. A. Preston, A. E. Adams, T. Stearns, D. G. Drubin, B. K. Haarer, and E. W. Jones. 1989. Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.* 31:357-435.
- Reddy, R., and S. Shimba. 1995. Structural and functional similarities between MRP and RNase P. *Mol. Biol. Rep.* 22:81-85.
- Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Rotondo, G., and D. Frendewey. 1996. Purification and characterization of the Pac1 ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 24:2377-2386.
- Schmitt, M. E., and D. A. Clayton. 1993. Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13:7935-7941.
- Seipelt, R. L., B. Zheng, A. Asuru, and B. C. Rymond. 1999. U1 snRNA is cleaved by RNase III and processed through an Sm site-dependent pathway. *Nucleic Acids Res.* 27:587-595.
- Tollervey, D. 1987. A yeast small nuclear RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. *EMBO J.* 6:4169-4175.
- van Hoof, A., P. Lennertz, and R. Parker. 2000. Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol. Cell. Biol.* 20:441-452.
- Venema, J., and D. Tollervey. 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33:261-311.
- Watkins, N. J., A. Gottschalk, G. Neubauer, B. Kastner, P. Fabrizio, M. Mann, and R. Luhrmann. 1998. Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure. *RNA* 4:1549-1568.
- Zabarjadian, Y., T. King, M. J. Fournier, L. Clarke, and J. Carbon. 1999. Point mutations in yeast *CBF5* can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19:7461-7472.

Annexe IV

Méthode de transformation des levures à l'acétate de lithium induite au DMSO.

Adaptée de: Hill *et al.*, 1991

Solution LiOAc: 100 mM acétate de lithium pH 7.5, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 et 1 mM EDTA pH 8.0. Stériliser par filtration.

Solution PEG 4000: 50% w/v PEG 4000 dans solution LiOAc.

Ce protocole est bon pour 10 transformations avec des ADN plasmidiques différents.

- 1- Inoculer une CFU de levures dans 5 mL de YPD et Incuber 18 heures à 30°C avec agitation jusqu'à saturation.
- 2- Transférer 1 mL de la pré-culture dans 100 mL de YPD (erlen de 250 mL) et incubé à 30°C avec agitation jusqu'à une densité de $1 \text{ à } 4 \times 10^7$ cellules/mL ($\text{DO}_{600} \approx 0.300$).
- 3- Transférer les cellules dans 4 tubes à centrifugation de 40 mL stériles et centrifuger à température de la pièce à 4000 rpm, 2 minutes.
- 4- Retirer le surnageant par décantation et resuspendre les culots dans 40 mL ddH₂O stérile et transférer les suspensions dans un seul tube pour deuxième centrifugation.
- 5- Décanter le surnageant, resuspendre le culot dans 40 mL ddH₂O stérile et re-centrifuger.
- 6- Répéter étape 5 avec 10 mL de solution LiOAc.
- 7- Retirer le surnageant et resuspendre gentiment le culot dans 1 mL de solution LiOAc.
- 8- Ajouter 100 µL de la suspension cellulaire à 10 µL de l'ADN (de 1 à 10 µg) à transformer dans un tube eppendorf. Mélanger doucement et laisser à la température de la pièce pour 10 minutes.
- 9- Ajouter 280 µL de solution PEG 4000 et mélanger par inversion 4 à 6 fois. Placer ensuite le tube à 30°C pour 45 minutes.
- 10- Ajouter 43 µL de 100% DMSO au tube eppendorf. Mélanger par inversion ou par pipettage. Incuber à 42°C pour 5 minutes.
- 11- Immédiatement après, centrifuger à 12000 rpm approximativement 10 secondes (juste assez pour faire un culot) et enlever le surnageant par décantation.
- 12- Laver le culot en le resuspendant dans 1 mL de ddH₂O stérile, centrifuger encore et décanter le surnageant. Resuspendre les cellules dans 1 mL ddH₂O stérile.
- 13- Étaler différentes quantités sur pétris contenant du milieu minimal sélectif pour le nouveau vecteur inséré. Incubation à 30°C environ 3 jours.

Transformation par électroporation des bactéries *E. coli* HB101 électro compétentes.

(BioRad, Cat. No. 170-3113)

Selon le protocole de BioRad pour ces cellules:

- 1- Refroidir les cuvettes pour électroporation avec espace d'électrode de 0,1 cm (BioRad, Cat. No. 165-2089) sur la glace au moins 5 minutes.
- 2- Sélectionner la capacité de l'appareil Gene Pulser (BioRad, Cat. No. 165-2098) à 25 µF et 1,80 kV et l'unité de contrôle à une résistance de 200 Ω.
- 3- Décongeler doucement les cellules à température de la pièce et placer les sur la glace dès qu'elles sont dégelées.
- 4- Dans un tube eppendorf de 1.5 mL froid, ajouter 40 µL de la suspension cellulaire de HB101 et 1 µL d'ADN. Mélanger doucement et laisser sur la glace 1 minute.
- 5- Transférer le mélange de cellules et ADN dans une cuvette d'électroporation de 0,1 cm froide et frapper un peu sur la cuvette pour que la suspension glisse dans la poche en forme de V sans former de bulles d'air.

- 6- Placer la cuvette dans le support de cuvette de l'appareil et appliquer la pulsion aux paramètres sélectionnés au point 2. Cela devrait donner une pulsion de 1,8 kV/cm avec une constante de temps entre 4,5 et 5,5 millisecondes. Noter la constante.
- 7- Immédiatement, ajouter 1 mL de milieu SOC (2% bactotryptone, 0.5% yeast extract, 20 mM glucose, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) à température de la pièce dans la cuvette et resuspendre gentiment mais rapidement les cellules avec une pipette Pasteur stérile.
- 8- Transférer la suspension cellulaire dans un tube de 13 mL stérile et incubé une heure à 37°C avec agitation.
- 9- Étaler différentes concentrations sur pétris de LB (1% bactotryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.6% agar, pH 6.0) avec 50 mg/L ampicillin et incubé 18 heures à 37°C.

Méga-préparation d'ADN plasmidique pour les banques d'ADN.

Selon la méthode de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989) modifiée:

- 1- Diviser le 1 litre de culture bactérienne dans 2 godets de 500 mL. Centrifuger les cellules à 4500 rpm pendant 15 min à 4°C. Resuspendre les culots dans 18 mL total de solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0).
- 2- Ajouter 1 mL de lysozymes (25 mg/mL dans solution I) et laisser sur la glace 10 minutes.
- 3- Ajouter 40 mL de solution II fraîchement préparée (0.02 N NaOH, 1% SDS), mélanger en inversant doucement plusieurs fois et laisser à la température de la pièce 10 minutes.
- 4- Ajouter 20 mL de solution III glacée (5 M acétate de potassium, acide acétique glacial jusqu'à pH 7 (environ 11.5%)) et mélanger en inversant doucement plusieurs fois. Placer sur la glace 10 minutes.
- 5- Centrifuger le lysat bactérien à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- 6- Filtrer le surnageant à travers 4 couches de coton-fromage dans un godet de 150 mL stérile. Ajouter 0.6 volumes (48 mL) d'isopropanol 100%, bien mélanger (utiliser vortex) et placer 10 minutes sur la glace.
- 7- Centrifuger à 5000 rpm, pendant 15 minutes à 4°C pour récupérer l'ADN.
- 8- Laver le culot avec 10 mL d'éthanol 95% puis laisser égoutter sur du papier absorbant jusqu'à sec.
- 9- Resuspendre le culot dans 3 mL ddH₂O stérile sur la glace, puis transférer dans un tube de 13 mL à fond rond stérile. Ajouter 100 µL de RNase A pancréatique 10 mg/mL et incubé à 37°C, 15 minutes.
- 10- Ajouter 1.5 mL de phénol saturé avec Tris et 1.5 mL de chloroforme puis mélanger vigoureusement. Centrifuger à 7000 rpm, 10 minutes à 4°C.
- 11- Transférer la phase aqueuse (environ 3 mL) dans un autre tube et répéter étapes 10 et 11 jusqu'à ce qu'il n'y ait rien à l'interphase. La dernière fois extraire avec chloroforme seulement.
- 12- Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube puis ajouter 10 mL d'éthanol salé. Laisser sur la glace 10 minutes puis centrifuger à 7000 rpm, 10 minutes à 4°C.
- 13- Retirer le surnageant et laver le culot avec 3 mL éthanol 95%. Laisser sécher, tube renversé sur du papier absorbant. Resuspendre l'ADN dans 3 mL de ddH₂O.

Test de β -gal en liquide (avec ONPG).

Un contrôle positif et un contrôle négatif sont nécessaires (utiliser des levures dont on sait qu'elles expriment la β -gal, dans mon cas, les meilleurs contrôles sont les PJ69-4a exprimant BD/NT2 et AD/NT2 pour le positif et les PJ69-4a exprimant BD et AD comme négatif)

Tampon Z: 60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ajuster le pH à 7.0 et ne pas autoclaver. 50mM β -mercaptoethanol est ajouté dans un aliquot de tampon juste avant utilisation.

Selon le protocole présenté dans Current Protocols in Molecular Biology:

(Reynolds *et al.*, 1997)

- 1- Les levures à tester et contrôles sont cultivées en tubes dans 5 mL de milieu minimal sélectif pour les vecteurs, à 30°C jusqu'en phase logarithmique (environ 24 heures).
- 2- Transférer chaque 5 mL de culture dans un tube de 13 mL et centrifuger à 3000 rpm pendant 4 minutes.
- 3- Jeter le surnageant, resuspendre le culot dans 5 mL de tampon Z avec β -mercaptoethanol et mesurer la densité optique à 600 nm pour 1 mL (utiliser tampon Z comme blanc).
- 4- Préparer les réactions dans des tubes de 13 mL: transférer 50 μL de la suspension cellulaire dans 950 μL tampon Z et aussi 100 μL dans 900 μL (cela constitue un duplicata).
- 5- Ajouter 1 goutte de SDS 0.1% (avec pipette pasteur de verre) et 2 gouttes de chloroforme dans chaque tube. Mélanger avec le vortex durant 10-15 secondes.
- 6- Pré-incuber les tubes dans un bain à 30°C pendant 15 minutes.
- 7- Ajouter 200 μL de substrat ONPG (4 mg/mL tampon potassium phosphate 0.1M, pH 7.0) réchauffé à 30°C dans chaque tube en commençant à chronométrer à partir du premier tube et incuber le tout à 30°C de 30 minutes à 4 heures.
- 8- Après le développement d'une couleur jaune intense dans le contrôle positif, arrêter la réaction avec 0.5 mL d'une solution fraîche de NaCO_3 1M. Noter le temps d'incubation.
- 9- Centrifuger les tubes à 4000 rpm pour 5 minutes et lire la densité optique à 420 nm et 550 nm avec le surnageant de chaque échantillon (blanc= 1 mL tampon Z + 2 gouttes de chloroforme + 1 goutte de SDS 0,1% + 0.5 mL NaCO_3 1M + 200 μL ONPG).
- 10- Calculer les Unités de Miller en utilisant la formule suivante:

$$= \frac{[A_{420} - (A_{550} \times 1.75)] \times 1000}{A_{600} \times t \times v}$$

Où v = volume de culture utilisé en mL (i.e. 0.05 ou 0.10)

t = temps de réaction en minutes

A_{600} = densité cellulaire avant le début du test

A_{420} = absorbance par le ONPG et la lumière dispersée par les débris cellulaires

A_{550} = lumière dispersée par les débris cellulaires

Les unités calculées pour les échantillons à tester doivent être soustraites par les unités calculées pour le contrôle négatif si > 0 (PJ69-4a +BD +AD).

Suivant le protocole utilisé dans le laboratoire du Dr. Herskowitz:

(<http://www.sacs.ucsf.edu/home/HerskowitzLab/protocols/bgal2.html>)

Ce protocole est mon préféré parce qu'il utilise des cellules qui sont concentrées et par conséquent le développement de la couleur jaune se fait plus rapidement et/ou devient

plus foncé. Il est donc plus facile avec ce protocole de détecter l'expression de la β -gal même si plus faible.

- 1- Les levures à tester et contrôles sont cultivées en tubes dans 5 mL de milieu minimal sélectif pour les vecteurs, à 30°C jusqu'en phase logarithmique (environ 24 heures).
- 2- 1 mL de culture est transférée dans un eppendorf (en triplicata) et centrifugée à 2500 rpm 5 minutes. Retirer le surnageant par pipetage et resuspendre dans 1.6 mL de tampon Z sans β -mercaptoethanol.
- 3- Mesurer la densité optique à 600 nm avec 0,6 mL de la suspension (le blanc étant le tampon z) et recentrifuger le reste de la suspension (1 mL) à 2500 rpm, 5 minutes.
- 4- Resuspendre dans 150 μ L de tampon Z avec β -mercaptoethanol.
- 5- Ajouter successivement: 50 μ L de chloroforme et 20 μ L de SDS 0.1% et mélanger avec le vortex 15 secondes.
- 6- Pré-incuber les tubes contenant les échantillons dans un bain à 30°C, 15 minutes.
- 7- Ajouter 700 μ L de substrat ONPG (1 mg/mL tampon Z + β -mercaptoethanol) réchauffé à 30°C dans chaque tube en commençant à chronométrer à partir du premier tube et incubé le tout à 30°C de 20 minutes à 3 heures.
- 8- Après le développement d'une couleur jaune intense dans le contrôle positif, arrêter la réaction avec 0.5 mL d'une solution fraîche de NaCO₃ 1M. Noter le temps d'incubation.
- 9- Centrifuger les tubes à 12000 rpm pour 10 minutes et lire la densité optique à 420 nm avec le surnageant de chaque échantillon (blanc= 150 μ L tampon Z + 50 μ L chloroforme + 20 μ L SDS 0,1% + 0.5 mL NaCO₃ 1M + 700 μ L ONPG).
- 10- Calculer les Unités de Miller en utilisant la formule suivante:

$$= \frac{A_{420} \times 1000}{A_{600} \times \text{temps}_{(\text{min.})} \times \text{volume}_{(\text{mL})}}$$

Par exemple pour une A₆₀₀ de 0.900, avec un volume de 1 mL (c.à.d. le volume de la suspension utilisée à partir de laquelle la A₆₀₀ avait été obtenue: 1 mL total concentré à 150 μ L), incubé pendant 60 minutes et donnant une A₄₂₀ de 0.500: on obtiendrait 9.26 Unités.

Les unités calculées pour les échantillons à tester doivent être soustraites par les unités calculées pour le contrôle négatif si > 0 (PJ69-4a +BD +AD).

Protocole d'extraction des protéines de levures – méthode TCA.

Selon le Yeast Protocols Handbook de la compagnie CLONTECH Laboratories, Inc.:

PMSF 100X: 0.1742 g de phenylmethyl-sulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich, Cat. No. P7627) dans 10 mL isopropanol (envelopper de papier d'aluminium et conserver à 4°C).

Solution d'inhibiteurs de protéases 1000X: 1 mg/mL pepstatin A (Sigma-Aldrich, Cat. No. P4265), 0.5 mg/mL leupeptin (Sigma-Aldrich, Cat. No. L2884), 100 mM benzamidine (Sigma-Aldrich, Cat. No. B6506), 2 mg/mL aprotinin (Sigma-Aldrich, Cat. No. A4529). Conserver à -20°C.

TCA: 20% w/v acide trichloroacétique dans ddH₂O (conserver à 4°C).

Tampon TCA: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM acétate d'ammonium, 2 mM EDTA, (ajouter 1X solution d'inhibiteurs de protéases et 1X PMSF juste avant l'utilisation).

Solution stock SDS/glycérol: 7.3% w/v SDS, 29.1% w/v glycérol, 83.3 mM Tris-base et un peu de bleu de bromophénol.

Solution Tris/EDTA: 200 mM Tris-base et 20 mM EDTA.

TCA/Laemmli «loading buffer» (1 mL): (préparer juste avant l'utilisation) 480 μ L solution stock SDS/glycérol, 400 μ L solution Tris/EDTA, 50 μ L β -mercaptoethanol, 20 μ L PMSF 100X, 1 μ L solution d'inhibiteurs de protéases 1000X et 49 μ L ddH₂O.

Billes de verre 425-600 microns (Sigma-Aldrich, Cat. No. G9268) lavées à l'acide.

- 1- Inoculer une CFU de levures dans 5 mL de milieu minimal sélectif pour le ou les vecteurs dans les levures. Incuber toute la nuit (18-20 heures) à 30°C avec agitation.
- 2- Transférer la pré-culture dans 50 mL de milieu minimal sélectif et incubé à 30°C avec agitation jusqu'à ce que la DO₆₀₀ soit 0.400-0.600 (environ 4 à 5 heures).
- 3- Mesurer la DO₆₀₀, transférer 40 mL de la culture dans un tube de 40 mL et centrifuger à 1000 \times g pendant 5 minutes à 4°C. Calculer les unités de DO en multipliant la DO₆₀₀ par le nombre de mL (par exemple, avec une DO₆₀₀ de 0.600, on obtient 24 unités de DO).
- 4- Jeter le surnageant et laver les cellules du culot avec 40 mL ddH₂O stérile, centrifuger, et jeter le surnageant (ici, les culots peuvent être congelés à -80°C pour poursuivre le lendemain).
- 5- Resuspendre les cellules dans 100 μ L de tampon TCA (+ inhibiteurs de protéases + PMSF) par 7.5 unités de DO (par exemple 320 μ L). Garder le tube sur la glace.
- 6- Transférer la suspension cellulaire dans un tube de 13 mL contenant un volume égal (320 μ L) de TCA 20% froid et de billes de verre.
- 7- «Vortexer» le contenu du tube 5 fois 1 minute en alternant avec des périodes de 30 secondes sur la glace.
- 8- Transférer le surnageant dans un tube eppendorf froid et placer sur la glace.
- 9- Rincer les billes de verre avec 250 μ L TCA 20% et 250 μ L tampon TCA. «Vortexer» 2 fois 1 minute en plaçant le tube sur la glace entre chaque. Transférer le liquide dans le même tube eppendorf.
- 10- Laisser les billes de verre se déposer dans le fond du tube eppendorf et transférer le liquide au-dessus des billes dans un autre tube eppendorf froid.
- 11- Centrifuger à 12000 rpm, 15 minutes à 4°C.
- 12- Retirer le surnageant par décantation et re-centrifuger rapidement < 1 minute pour enlever le reste du surnageant par pipetage.
- 13- Resuspendre le culot de protéines et débris cellulaires dans 10 μ L TCA-Laemmli «loading buffer» par unité de DO (par exemple ici 32 μ L).
- 14- Placer le tube à 100°C, 10 minutes puis centrifuger à 12000 rpm, 10 minutes à température de la pièce.
- 15- Transférer le surnageant contenant les protéines dans un nouveau tube eppendorf et charger immédiatement sur un gel de SDS-PAGE ou conserver à -80°C en attendant de pouvoir le faire.

Protocole pour l'extraction d'ADN plasmidique des levures.

Tampon LETS: 0.1 M LiCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2% SDS.

Billes de verre 425-600 microns (Sigma-Aldrich, Cat. No. G9268) lavées à l'acide.

- 1- Inoculer une CFU des levures dont on veut extraire le vecteur dans 50 mL de milieu minimal sélectif pour le vecteur (pour extraction du vecteur de la banque Y2HL: milieu minimal sans leucine). Incuber à 30°C avec agitation jusqu'à DO₆₀₀ de 0.8-1.
- 2- Transférer 40 mL de culture dans un tube à centrifugation de 40 mL et centrifuger à 5000 rpm, 5 minutes.

- 3- Laver 2 fois le culot avec ddH₂O stérile (après cette étape-ci le culot peut être congelé à -20°C jusqu'au lendemain).
- 4- Laver une fois le culot avec du tampon LETS.
- 5- Resuspendre le culot dans 300 µL de tampon LETS et transférer la suspension dans un tube de 13 mL.
- 6- Ajouter 300 µL de phénol équilibré dans tampon LETS, puis ajouter des billes de verre jusqu'à la surface du liquide (environ 1 eppendorf de billes).
- 7- «Vortexer» le contenu du tube 6 fois 30 secondes à vitesse maximale en alternant avec des périodes de 30 secondes sur la glace.
- 8- Retirer le surnageant du tube (environ 300 µL) et transférer dans un tube eppendorf.
- 9- Laver deux fois les billes de verre: la première fois ajouter 150 µL de tampon LETS et «vortexer» 30 secondes, transférer le liquide dans l'eppendorf, la deuxième fois avec 150 µL de chloroforme.
- 10- Ajouter un volume de phénol/chloroforme dans l'eppendorf, «vortexer» 30 secondes puis centrifuger à 12000 rpm, 5 minutes à la température de la pièce.
- 11- Transférer la phase aqueuse (celle du haut) dans un nouveau tube eppendorf.
- 12- Précipiter l'ADN avec 1 mL d'éthanol 95% (+5% acétate de potassium) et placer à -20°C pendant au moins 10 minutes.
- 13- Centrifuger à 12000 rpm, 8 minutes, rincer le culot d'ADN à l'éthanol 95% puis sécher l'ADN à l'air ou en utilisant le «speed vac».
- 14- Resuspendre l'ADN dans 300 µL ddH₂O, ajouter 5 µL de RNase A pancréatique 10 mg/mL et incubé à 37°C pendant 10 minutes.
- 15- Ajouter 300 µL de phénol/chloroforme, , «vortexer» 30 secondes puis centrifuger à 12000 rpm, 5 minutes à la température de la pièce.
- 16- Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube eppendorf.
- 17- Répéter étapes 15 et 16 jusqu'à ce qu'il n'y ait plus rien à l'interphase.
- 18- Précipiter l'ADN avec 1 mL d'éthanol 95% (+5% acétate de potassium) et placer à -20°C pendant au moins 10 minutes. Centrifuger, laver et sécher.
- 19- Resuspendre l'ADN dans environ 20 µL ddH₂O. Vérifier la présence d'ADN sur gel, on devrait y voir de l'ADN génomique. L'ADN extrait de cette façon peut être utilisé pour transformer des bactéries par électroporation (les autres méthodes de transformation ne fonctionnent pas parce que l'ADN est de trop mauvaise qualité). Procéder à l'électroporation.

Protocole de préparation de bactéries DH5α électrocompétentes et transformation.

Toutes les manipulations doivent être faites sur la glace ou à 4°C. Tous les instruments et solutions utilisés doivent être stériles et être froids avant d'entrer en contact avec les bactéries.

- 1- Inoculer une colonie de bactéries DH5α à partir d'un pétri frais dans 5 mL de LB (1% bactotryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.6% agar, pH 6.0) dans un tube. Incuber toute la nuit à 37°C avec agitation.
- 2- Transférer la pré-culture dans 500 mL de LB (prendre la DO₆₀₀) et incubé à 37°C avec agitation jusqu'à DO₆₀₀ de 0.6 (environ 3-4 heures).
- 3- Placer la culture sur la glace pendant 20 minutes puis transférer dans 2 godets de 250 mL froids pour centrifuger à 5000 rpm, 10 minutes à 4°C.

- 4- Jeter les surnageants, resuspendre les culot dans 40 mL total ddH₂O stérile glacée et transférer dans un tube à centrifugation de 40 mL. Centrifuger à 4500 rpm, 10 minutes à 4°C.
- 5- Répéter deux fois le lavage de l'étape 4.
- 6- Resuspendre le culot de cellules dans 10 mL de glycérol 10% stérile glacé, et centrifuger à 4500 rpm, 10 minutes à 4°C.
- 7- Jeter le surnageant et resuspendre les cellules dans environ 1 mL glycérol 10% stérile glacé, la densité cellulaire doit être sensiblement la même d'une préparation à l'autre. Avec une DO₆₀₀ de 1µL de la suspension cellulaire diluée dans 1 mL ddH₂O près de 0.3 de très bons résultats sont obtenus.
- 8- Tester 40 µL de bactéries dans une cuvette en électroporant à 1.8 kV, 25 µF et 200 Ω, (voir protocole ci-haut) pour vérifier que la constante est bonne (entre 4.5 et 5.0) et qu'il n'y a pas d'éclair.
- 9- Aliquoter toutes les cellules dans des tubes eppendorfs glacés (40 µL/tube) et conserver à -80°C.
- 10- Électroporer les *E. coli* DH5α en suivant le protocole de transformation par électroporation des bactéries électro compétentes *E. coli* HB101 ci-haut. À partir d'une colonie de ces bactéries, l'ADN plasmidique pourra être préparé de la façon usuelle et sera de qualité bonne pour digestions et séquençages.