

2m11.2733.1

Université de Montréal

Impact de la voie *GSP1/PRP20* sur le "silencing"  
transcriptionnel chez *Saccharomyces cerevisiae*

par

Francis Deshaies

**Programme de microbiologie et immunologie**

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.)

en microbiologie et immunologie

Janvier 1999

©Francis Deshaies, 1999



6.25.11.105

W  
4  
U58  
1999  
V.115

1999

1999

1999

1999

1999

1999

1999

1999

1999

1999

1999

1999

1999



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Impact de la voie *GSP1/PRP20* sur le "silencing"  
transcriptionnel chez *Saccharomyces cerevisiae*

présenté par :

Francis Deshaies

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Belhumeur

Dr Jacques Thibodeau

Dr Marc Drolet

Mémoire accepté le : ..... 99. 04. 30 .....

## 1. SOMMAIRE

La protéine Gsp1p est une petite GTPase nucléaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* impliquée dans plusieurs processus nucléaires, incluant entre autres le transport nucléocytoplasmique des protéines et ARNs, l'intégrité du matériel génétique et le contrôle du cycle cellulaire. Selon son état de liaison en GTP ou GDP, assuré respectivement par le produit des gènes *PRP20*, *RNA1* et *YRB1*, Gsp1p agira comme interrupteur moléculaire afin de réguler ces processus. La découverte récente d'une interaction *in vivo* et *in vitro* entre Gsp1p et Sir4p (protéine impliquée activement dans les processus de répression transcriptionnelle de type "silencing"), et la similitude de certains phénotypes observés entre la voie *GSP1/PRP20* et ce phénomène de "silencing" nous a menés à nous interroger sur la façon dont ces deux phénomènes pouvaient être reliés. Le "silencing" est en effet un processus de régulation important chez la levure. Il implique une modification de la chromatine qui rend cette région inaccessible aux diverses enzymes de modification de l'ADN. Il en résulte donc une répression transcriptionnelle des gènes situés à proximité. Cette répression est observée à trois domaines différents, soit au niveau des télomères, aux loci *HM* (*Mating type locus*) et au rDNA.

Afin de déterminer le rôle de la voie *GSP1/PRP20* au niveau de la répression transcriptionnelle de type "silencing", nous avons utilisé des souches de levures qui possèdent un gène rapporteur *URA3* intégré aux différentes régions réprimées transcriptionnellement. Dans ces souches, nous avons surexprimé Gsp1p, Rna1p, Prp20p et Yrb1p et ensuite évalué dans quelle mesure ces changements affectaient l'expression du gène *URA3*. L'expression de ce gène rapporteur indique la capacité des éléments surexprimés à interférer avec les processus de répression transcriptionnelle.

Dans notre étude, nous avons ainsi démontré que *PRP20* et *YRB1* sont deux éléments du système les plus susceptibles de modifier les processus de "silencing". Une haute concentration de Prp20p, qui se doit d'être pleinement fonctionnelle afin d'accomplir cette fonction, démontre une forte dérégulation aux télomères. Ceci suggère donc qu'une augmentation nucléaire de Gsp1p liée en GTP puisse être un élément important au niveau de la régulation de la répression aux télomères. Pour sa part, la surexpression de Yrb1p démontre un effet contraire entre le niveau de répression retrouvé aux télomères et au rDNA. En effet, le gène rapporteur aux télomères est dérégulé alors que celui au rDNA se retrouve plus fortement réprimé. Il est alors possible que ce facteur soit relocalisé des télomères au rDNA suite à sa surexpression dans la cellule, ou que Yrb1p participe à la relocalisation d'une autre protéine entre ces deux loci. Enfin, il semble que la voie *GSP1/PRP20* affecte peu le "silencing" retrouvé aux loci *HM* comparativement aux autres loci. Ces données suggèrent donc que cette voie ne soit pas impliquée globalement dans les phénomènes de "silencing", mais agirait plutôt de façon spécifique au niveau des télomères et au rDNA.

## 2. TABLE DES MATIÈRES

<b>1. SOMMAIRE.....</b>	<b>iii</b>
<b>2. TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>v</b>
<b>3. LISTE DES TABLEAUX, FIGURES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>vii</b>
<b>4. REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>XI</b>
<b>4.1. DESCRIPTION DU CYCLE DE LA VOIE <i>GSP1/PRP20</i> .....</b>	<b>12</b>
4.1.1. INTRODUCTION.....	12
4.1.2. DESCRIPTION DE <i>GSP1</i> ET DES COMPOSANTES ASSURANT SON ÉTAT DE LIAISON AU GDP/GTP .....	15
4.1.2.1. <i>GSP1</i> .....	15
4.1.2.2. <i>PRP20</i> .....	16
4.1.2.3. <i>RNA1</i> .....	18
4.1.2.4. <i>YRB1</i> .....	19
4.1.3. EFFECTEURS POTENTIELS DE Gsp1p ET PROTÉINES D'INTERACTION .....	20
4.1.4. FONCTIONS BIOLOGIQUES ATTRIBUÉES À <i>RAN/GSP1</i> .....	22
4.1.4.1 <i>Transport nucléocytoplasmique des protéines</i> .....	23
4.1.4.2 <i>Transport et maturation des ARNs</i> .....	25
4.1.4.3 <i>Progression du cycle cellulaire</i> .....	27
4.1.4.4 <i>Fonctions nucléaires et stabilité chromosomique</i> .....	28
4.1.5. <i>GSP1</i> : UNE OU PLUSIEURS FONCTIONS?.....	29
<b>4.2. RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE TYPE "SILENCING" .....</b>	<b>33</b>
4.2.1. INTRODUCTION.....	33
4.2.2. ÉLÉMENTS MODULANT LA RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE .....	34
4.2.2.1. <i>Rôle des protéines SIR</i> .....	34
4.2.2.2. <i>Rôle de la protéine RAP1 et des protéines RIF</i> .....	36
4.2.2.3. <i>Rôle des Histones H3/H4 et de l'acétylation</i> .....	37
4.2.2.4. <i>Rôle de l'ubiquitination et de la phosphorylation</i> .....	38
4.2.2.5. <i>Rôle de la réplication et de la réparation d'ADN</i> .....	39
4.2.2.6. <i>Autres protéines impliquées</i> .....	40

4.2.3. REPRESSIION AUX TELOMERES.....	42
4.2.3.1. <i>Fonction et structure des télomères</i> .....	42
4.2.3.2. <i>Description du phénomène de TPE</i> .....	43
4.2.3.3. <i>Mécanisme de répression</i> .....	44
4.2.4. RÉPRESSION AUX LOCI <i>HM</i> .....	46
4.2.4.1 <i>Rôle des loci HM dans la détermination du sexe chez la levure</i> .....	46
4.2.4.2. <i>Caractéristiques de la répression aux loci HM</i> .....	46
4.2.4.3. <i>Mécanisme de répression</i> .....	47
4.2.5. RÉPRESSION AU rDNA.....	49
4.2.6. MODELES EXPLIQUANT LES DIVERS NIVEAUX DE RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE TYPE "SILENCING" .....	51
<b>5. ARTICLE .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 ABSTRACT.....</b>	<b>59</b>
<b>5.2. INTRODUCTION .....</b>	<b>60</b>
<b>5.3. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>64</b>
<b>5.4. RESULTS .....</b>	<b>70</b>
<b>5.5. TABLES.....</b>	<b>76</b>
<b>5.6. FIGURES.....</b>	<b>78</b>
<b>5.7. DISCUSSION .....</b>	<b>90</b>
<b>5.8. ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>94</b>
<b>5.9. REFERENCES.....</b>	<b>95</b>
<b>6. DISCUSSION .....</b>	<b>103</b>
6.1. HYPOTHÈSES.....	104
6.2. CONDITIONS AFFECTANT LA RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE.....	106
6.3. IMPLICATIONS DE LA PHOSPHORYLATION SUR LA RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE .....	107
6.4. VALIDITÉ DU SYSTÈME ET EXPÉRIENCES FUTURES .....	109
<b>7. REMERCIEMENTS.....</b>	<b>112</b>
<b>8. RÉFÉRENCES.....</b>	<b>114</b>

### 3. LISTE DES TABLEAUX

#### Revue de littérature

Tableau I : Composantes de la voie <i>GSP1/PRP20</i> retrouvées chez divers organismes eucaryotes.....	14
Tableau II : Processus influencés par le système de la GTPase <i>GSP1</i> .....	23
Tableau III: Facteurs impliqués dans la répression transcriptionnelle ainsi que leurs implications au niveau des différents loci.....	41

#### Article

Table I : Comparision between dsDNA binding activity, complementation abilities and telomere/mating type silencing capabilities of different <i>prp20p</i> mutants .....	77
--	----

## LISTE DES FIGURES

### Revue de littérature

Figure 1 : Cycle général décrivant la voie <i>GSP1/PRP20</i> et localisation des éléments composant le système.....	13
Figure 2 : Hypothèses expliquant les effets pléiotropiques observés lorsque le cycle <i>GSP1</i> est altéré.....	30
Figure 3 : Modèle expliquant la répression transcriptionnelle aux télomères .....	45
Figure 4 : Représentation des loci <i>HMR</i> et <i>HML</i> et phénomène de répression transcriptionnelle retrouvée à cet endroit.....	48
Figure 5 : Modèle spéculatif de la répression transcriptionnelle au rDNA.....	50

### Article

Figure 1 : Effect of <i>GSP1</i> , <i>PRP20</i> , <i>RNAI</i> and <i>YRBI</i> increased concentration in silencing strength at telomeres, mating type and rDNA loci.....	79, 80, 81
--	------------

Figure 2 : Effect of *GSP1* and *PRP20* co-overexpression on telomere silencing.....83

Figure 3 : Effect of different *prp20* mutants overexpression on temoleric silencing  
.....85, 86, 87

Figure 4 : Immunoprecipitation of wild type Prp20p and triple mutant prp20p  
S55A/S182A/T373A (3M).....89

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-FOA : *5-Fluoroorotic acid*

SD : *Synthetic Define*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNt : ARN de transfert

CPC : Condensation Prématurée des Chromosomes

GAP : *GTPase Activating Protein*

GDP : Guanine Di-Phosphate

GEF : *Guanine Exchange Factor*

GTP : Guanine Tri-Phosphate

kb : kilobases

kDa : kilodaltons

LEU : Leucine

MPF : *Mitosis Promoting Factor*

NES : *Nuclear Export Signal*

rDNA : ADN ribosomal

TPE : *Telomere Position Effect*

TRP : Tryptophane

SIR : *Silent Information Regulator*

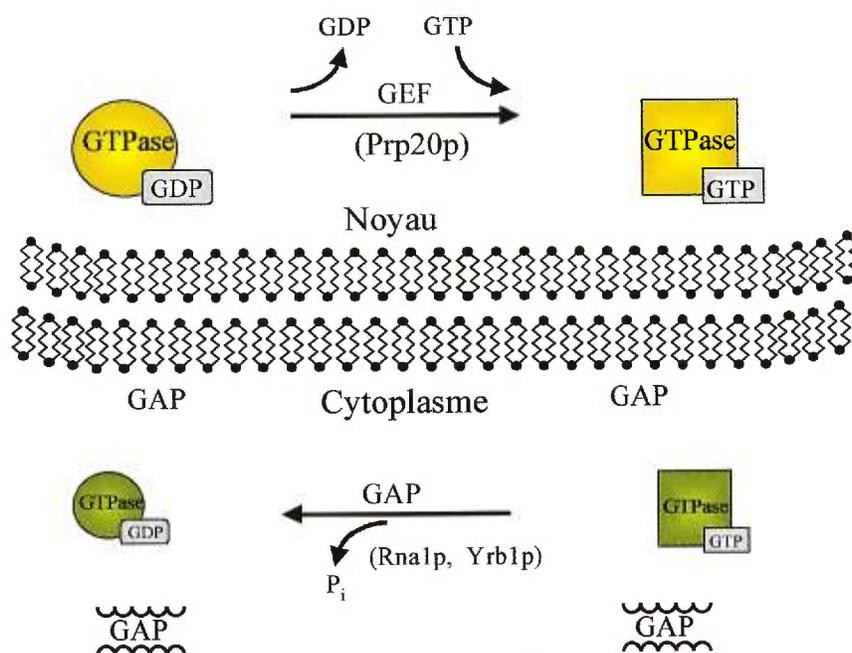
**REVUE DE LITTÉRATURE**

## 4. REVUE DE LITTÉRATURE

### 4.1. DESCRIPTION DU CYCLE DE LA VOIE *GSP1/PRP20*

#### 4.1.1. INTRODUCTION

La GTPase Gsp1p est une petite protéine G nucléaire essentielle faisant partie de la super famille des protéines de type RAS chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle est au centre d'une voie de régulation impliquant plusieurs composantes, dont certains auront le rôle de modifier l'état de liaison de cette protéine (voir Figure 1). En effet, Gsp1p peut se présenter dans un état lié au nucléotide GDP ou GTP. Selon cet état de liaison, la protéine interagira spécifiquement avec certaines protéines pour accomplir diverses fonctions. D'une part, l'abondance de liaison de Gsp1p avec le nucléotide GDP est assurée par un facteur d'échange nucléaire (GEF pour *Guanine Exchange Factor*) nommé Prp20p qui permet l'échange du GDP pour un GTP. Quant à elle, la protéine Rna1p, localisée au cytoplasme, se chargera de stimuler l'hydrolyse intrinsèque de la GTPase Gsp1p (activité GAP pour *GTPase Activating Protein*). Par conséquent, quoique principalement située au noyau, Gsp1p devra effectuer un cycle entre ce dernier compartiment et le cytoplasme afin de permettre les deux états de liaison (Rush *et al.*, 1996; Sazer, 1996). Enfin, une troisième composante considérée comme protéine effectrice, Yrb1p (*Yeast Ran Binding protein*), agit en stimulant l'activité GAP de Rna1p tout en inhibant l'activité d'échange de Prp20p. Elle aura aussi comme rôle de stabiliser la formation du complexe Gsp1p-GTP/Prp20p dans la cellule (Schlenstedt *et al.*, 1995b).



**Figure 1.** Cycle général décrivant la voie *GSP1/PRP20* et localisation des éléments composant le système. La GTPase Gsp1p est localisée de façon prédominante au noyau et peut se retrouver sous deux conformations différentes, soit lié en GTP ou en GDP. Cette liaison est régulée par un facteur d'échange (GEF) retrouvé au noyau, Prp20p, qui catalyse le relâchement du GDP tout en favorisant la liaison avec le GTP. Pour sa part, l'hydrolyse intrinsèque du GTP est effectuée dans le cytoplasme et stimulée par Rna1p (GAP). Yrb1p est un troisième élément qui stimule l'activité GAP. Concernant la GTPase, la grosseur des symboles reflète l'abondance relative de cet élément au noyau et au cytoplasme (inspiré de Sazer, 1996).

D'autre part, il est important de noter le caractère essentiel ainsi que la grande conservation de *GSP1* et de ses composantes tout au long de l'évolution. On retrouve en effet des homologues de chaque représentant autant chez les mammifères, grenouilles, drosophiles que chez l'humain (voir Tableau I). Il existe ainsi un haut degré de similarité au niveau de la séquence en acides aminés entre ces différents homologues (Dasso *et al.*,

1995). De plus, il est possible d'interchanger certains de ces homologues d'une espèce à l'autre tout en conservant leur fonction propre (Dasso, 1993; Ohtsubo *et al.*, 1991). Enfin, ces éléments sont situés dans les mêmes compartiments cellulaires et affectent les mêmes processus biologiques (Clark *et al.*, 1991). Toutes ces caractéristiques suggèrent donc qu'une ou plusieurs fonctions soient conservées entre les divers organismes eucaryotes pour ce qui a trait à cette voie de régulation.

<b>Tableau I. Composantes de la voie <i>GSP1/PRP20</i> retrouvées chez divers organismes eucaryotes</b>			
<b>Organisme</b>	<b>GEF</b>	<b>GTPase</b>	<b>GAP</b>
<b>Humain</b>	<i>RCC1</i>	<i>RAN/TC4</i>	<i>RanGAP</i>
<b>Levure à fission (<i>S. pombe</i>)</b>	<i>DCD1</i>   <i>PIM1</i>	<i>FYT1</i>   <i>SPI1</i>	<i>RNAI</i>
<b>Levure à bourgeonnement (<i>S. cerevisiae</i>)</b>	<i>SRM1</i>   <i>PRP20</i>   <i>MTR1</i>	<i>GSP1</i>   <i>CNR1</i>   <i>GSP2</i>   <i>CNR2</i>	<i>RNAI</i>
<b>Souris</b>	<i>RCC1</i>		<i>FUG1</i>
<b>Hamster</b>	<i>RCC1</i>		
<b>Grenouille (<i>Xenopus</i>)</b>	<i>RCC1</i>		
<b>Drosophile</b>	<i>BJ1</i>		

(Inspiré de Sazer, 1996)

## 4.1.2. DESCRIPTION DE *GSP1* ET DES COMPOSANTES ASSURANT SON ÉTAT DE LIAISON AU GDP/GTP

### 4.1.2.1. *GSP1*

Cette protéine de 219 acides aminés a tout d'abord été identifiée par Belhumeur *et al.* (1993) comme étant un suppresseur multicopies d'un mutant *prp20-1*. Elle est hautement exprimée à l'intérieur de la cellule (0,36% des protéines totales), ce qui fait d'elle l'une des protéines les plus abondantes (Kadowaki *et al.*, 1993). Elle possède également un homologue, GSP2, qui n'est toutefois pas essentiel et qui est exprimé seulement sous certaines conditions de croissance. De plus, Gsp1p possède plus de 80% d'identité avec son équivalent humain Ran et conserve également beaucoup d'homologie avec les représentants des autres espèces, ce qui fait d'elle l'une des protéines nucléaires les plus conservées (Trueb *et al.*, 1992). D'autre part, Gsp1p est une protéine qui se distingue des autres GTPase de type RAS par 2 caractéristiques principales. Tout d'abord, alors que les autres membres de type RAS se situent au niveau cytosolique ou membranaire, Gsp1p se localise majoritairement au noyau. Ensuite, Gsp1p ne possède pas de séquence d'isoprénylation (modification lipidique) en région C-terminale, mais plutôt une région c-terminale acide saillante de la structure globuleuse de la protéine (Scheffzek *et al.*, 1995).

Gsp1p est impliquée dans une variété de processus nucléaires, incluant l'importation des protéines au noyau, le maintien des structures nucléaires et le contrôle du cycle cellulaire (revue par Rush *et al.*, 1996). Malgré la petite taille de cette protéine, une série de mutants ont jusqu'à date été caractérisés chez *GSP1* et l'homologue humain *RAN*.

Entre autre, les mutants classiques ranT24N et ranQ69L empêchent respectivement l'échange du GTP par Prp20p et la stimulation de l'hydrolyse par Rna1p (Kornbluth, 1994; Coutavas, 1993). Ces mutations démontrent également un arrêt de croissance et un défaut dans le transport nucléocytoplasmique. Plus récemment, une série de mutants simples et multiples de Gsp1p ont été isolés par Oki *et al.* (1998). Tous les mutants possèdent eux aussi des défauts dans le transport nucléocytoplasmique. Toutefois, sur 25 mutants thermosensibles, 11 présentent un arrêt en phase G1, ce qui laisse suggérer un rôle possible de *GSP1* au niveau de la phase de réplication de l'ADN (Oki *et al.*, 1998). Dans une même ligne d'idées, Lee *et al.* (1994) ont montré que le complexe Prp20p/Gsp1p pouvait se retrouver au niveau de la chromatine durant toutes les phases du cycle cellulaire, sauf lors de la phase S.

#### 4.1.2.2. *PRP20*

Prp20p est une protéine nucléaire de 54kDa qui a comme principale fonction l'échange du GDP pour un GTP au niveau de la protéine Gsp1p, en stimulant cette activité par un facteur  $10^5$  (Klebe *et al.*, 1995). Il fut possible d'isoler le gène codant pour cette protéine lors de trois criblages différents et c'est pourquoi on le retrouve sous diverses appellations: *SRM1*, *MTR1* et *PRP20*. Prp20p a d'abord été identifiée comme étant une protéine impliquée dans la conjugaison, puisque le mutant *srm1-1* semblait restaurer la capacité de conjugaison d'une levure qui ne possédait plus de récepteur nécessaire à cette fin (Clark *et al.*, 1989). D'autre part, le mutant *prp20-1* a permis de mettre en évidence l'implication de cette protéine dans différentes étapes du métabolisme d'ARNm, incluant l'épissage (Aebi *et al.* 1990). Enfin, trois allèles récessives de *mtr1* (*mRNA transport*)

présentent des défauts dans l'export des ARNm ainsi que dans la maturation des ARNt et ARNr (Kadowaki *et al.*, 1993).

Prp20p est l'homologue fonctionnel de la protéine RCC1 retrouvée chez l'humain, cette dernière ayant d'abord été identifiée comme régulant négativement l'initiation de la condensation des chromosomes (Bischoff *et al.*, 1991). En effet, les premières observations ont révélé que la perte de fonction de RCC1 provoquait une condensation prématurée des chromosomes (CPC) (Nishimoto *et al.*, 1978). Plusieurs études ont par la suite démontré son rôle à différents niveaux du cycle cellulaire. Ainsi, lorsque des cellules sont soumises à des températures non permissives, les mutants *RCC1* résultent en une interruption de la réplication d'ADN, une CPC, ainsi qu'une entrée prématurée en mitose (Nishimoto *et al.*, 1978; Nishitani *et al.*, 1991). Ces cellules sont également incapables de passer la phase G1-S avec succès (Nishimoto *et al.*, 1978). D'autre part, une multitude de phénotypes relatifs aux ARNs ont également été caractérisés. En plus de provoquer l'accumulation d'ARNm incomplets dans le noyau (épissage réduit, défauts dans la terminaison et l'initiation de transcription) ainsi qu'un niveau réduit de ces derniers, les mutants *prp20* mènent à la fragmentation du nucléole tout en montrant des défauts au niveau de la maturation des pré-ARNr et pré-ARNt (Aebi *et al.*, 1990; Forrester *et al.*, 1992; Kadowaki *et al.*, 1994). Enfin, certains mutants *prp20* démontrent des défauts au niveau du transport de protéines au noyau, ce qui implique la participation de cette protéine dans ces processus (Tachibana *et al.*, 1994; Koepp *et al.*, 1996).

Au niveau structural, Prp20p possède sept motifs répétés d'une quarantaine d'acides aminés qui s'avèrent essentiels à son activité et qui sont, par le fait même, conservés chez tous les homologues eucaryotes. En effet, tous les mutants *prp20* découverts jusqu'à maintenant se situent au niveau de ces séquences répétées (Lee *et al.* 1994). Ces dernières contiennent entre autre des résidus glycines importants se traduisant en deux sous-motifs distincts : G-X-X-H (glycine-2 acides aminés quelconques-histidine) et  $\phi$ -x- $\phi$ -G (aromatique-acide aminé à petite chaîne latérale-aromatique-glycine). Les mutants qui ont un effet sur la viabilité se situent au niveau du deuxième et troisième motif (région N-terminale de la protéine) et dans les deux derniers motifs de la protéine (région C-terminale) (Lee *et al.*, 1994). De plus, il est important de noter que Prp20p possède la capacité de lier la chromatine via un complexe protéique. Cette capacité à lier l'ADN double brin est probablement assurée par le dernier motif de la protéine, puisque certaines mutations de ce domaine empêche la protéine d'exercer cette fonction (Lee *et al.*, 1994). D'autre part, Prp20p peut être phosphorylé (Fleischmann *et al.*, 1996), ce qui laisse supposer une nouvelle façon de réguler le processus. La question se pose à savoir si cette phosphorylation régule le transport ou bien si elle modulerait d'autres fonctions encore non caractérisées jusqu'à maintenant.

#### 4.1.2.3. *RNAI*

Comme le niveau intrinsèque d'activité GTPasique de Gsp1p est très faible, une protéine se chargera de stimuler cette activité afin de permettre un état de liaison de la GTPase en GDP. Rna1p est l'élément qui assure cette fonction, en stimulant l'hydrolyse par un facteur de  $10^5$  (Klebe *et al.*, 1995). Cette protéine est localisée principalement au

cytoplasme, probablement à la surface externe du noyau (Hopper *et al.*, 1990), avec une sous-population associée à la membrane nucléaire (Traglia *et al.*, 1996). D'abord identifiée comme une protéine impliquée dans la biosynthèse de macromolécules (Hartwell, 1967), des recherches plus poussées ont ensuite démontré son implication dans la maturation et l'export des ARNm (Forrester *et al.*, 1992) ainsi que le transport nucléocytoplasmique (Corbett *et al.*, 1995).

En effet, certains mutants ont démontré de sévères défauts au niveau de l'exportation des ARNs, se traduisant par une accumulation nucléaire de ces derniers (Amberg *et al.*, 1992). De plus, ces mutants provoquent l'accumulation de précurseurs d'ARNt et ARNr (Hopper *et al.*, 1978; Hutchinson *et al.*, 1969). Enfin, il est bon de souligner que la majorité des phénotypes observés chez les mutants *rna1* concernent principalement la synthèse, le transport et la maturation des ARNs.

#### **4.1.2.4. YRBI**

Cette protéine essentielle est retrouvée de façon ubiquitaire, mais préférentiellement au cytoplasme, et se lie spécifiquement avec la forme GTP de Gsp1p (Lounsbury *et al.*, 1994). En plus d'augmenter l'hydrolyse du GTP par la stimulation de Rna1p (facteur 2 à 3 lorsqu'à saturation), elle stabilise le complexe Gsp1p-GTP/Prp20p avec lequel elle se lie (Schlenstedt *et al.*, 1995b). Sa surproduction permet également de supprimer le mutant thermosensible *rna1-1* (Noguchi *et al.*, 1997). Il a donc été proposé que Yrb1p agisse comme adaptateur entre Gsp1p et Rna1p ou bien qu'il dirige Gsp1p à Rna1p, puisqu'il se lie à la fois aux deux composantes (Ren *et al.*, 1995). Par ailleurs, Ranbp1, qui est l'homologue humain, se lie et stabilise le complexe composé de Ran et de l'importine  $\beta$

(Chi *et al.*, 1996). De plus, lorsque Yrb1p devient inactif, on observe un défaut au niveau du transport nucléaire des protéines ainsi qu'un problème d'exportation des ARN poly(A)<sup>+</sup> (Schlenstedt *et al.*, 1995b). Ces données suggèrent donc un rôle dans le transport au noyau.

D'autre part, Yrb1p semble être impliqué au niveau de la stabilité chromosomique. En effet, sa surexpression cause un taux élevé de perte de chromosomes et de non-disjonction lors de la division cellulaire (Ouspenski *et al.*, 1995). De plus, la surexpression provoque également une sensibilité accrue à l'hydroxyurée (agent mutagène), aux UV ainsi qu'aux lésions à l'ADN dans un environnement où *rad9* a été muté. Le mutant *yrb1-21* isolé plus récemment présente aussi des défauts au niveau du fuseau mitotique et une accumulation des cellules en fin de mitose ou en phase G1 du cycle cellulaire, sans que ne soit affecté significativement le transport de protéines au noyau (Ouspenski, 1998). Toutes ces observations supposent donc qu'en plus de son rôle au niveau du transport de protéines au noyau, Yrb1p pourrait être impliquée activement dans des fonctions nucléaires correspondant à la stabilité du matériel génétique.

#### **4.1.3. EFFECTEURS POTENTIELS DE Gsp1p ET PROTÉINES D'INTERACTION**

Dans le but de comprendre le rôle de Gsp1p dans les différents processus auxquels il est associé, il devient essentiel de caractériser les effecteurs avec lesquels il interagit. Les effecteurs sont définis comme étant des protéines autres que le GEF et le GAP qui interagissent spécifiquement avec la forme GTP ou GDP de la GTPase et qui seront ainsi impliqués dans les divers processus biologiques observés. Yrb1p est le premier effecteur de Gsp1p à avoir été caractérisé (Ouspenski *et al.*, 1995). Comme décrit précédemment,

cette protéine semble impliquée dans le transport au noyau mais également au niveau de la stabilité chromosomique (voir section 4.1.2.4). Il est toutefois difficile de déterminer si Yrb1p est un véritable effecteur, puisqu'il semble être impliqué activement dans la régulation même de l'état de liaison de Gsp1p.

Pour sa part, Yrb2p est une autre protéine qui se lie directement à Gsp1p et Prp20p (Taura *et al.*, 1997). Elle possède des motifs similaires à ceux retrouvés chez Yrb1p et Nup2p, une nucléoporine. Comme c'est le cas pour Yrb1p, Yrb2p se lie à Gsp1p-GTP tout en stimulant l'activité GAP de Rna1p (Noguchi *et al.*, 1997). Par ailleurs, des expériences récentes ont démontré l'importance de son rôle dans l'exportation des ARNs (Taura *et al.*, 1998). En effet, un mutant *yrb2* provoque un arrêt de l'exportation noyau-cytoplasme de protéines contenant un signal NES (*Nuclear Export Signal*). De plus, il semble que Yrb2p ne se déplace pas du noyau vers le cytoplasme, comme c'est le cas pour d'autres récepteurs NES. Il a donc été proposé que Yrb2p agisse à l'intérieur du noyau pour réguler l'une des voies possibles d'exportation (Taura *et al.*, 1998).

Enfin, d'autres éléments sont reconnus pour interagir de près ou de loin avec la voie *GSP1/PRP20*. Une série de protéines reliées au transport ont été caractérisées. Ces protéines lient directement Gsp1p et font partie de la famille des Karyophérines  $\beta$  (revue par Wozniak *et al.*, 1998). Il existe également d'autres éléments qui interviennent dans la régulation de *GSP1* ou dans les processus biologiques attribuables à ce dernier. En effet, *GTR1* code pour une GTPase qui interagit génétiquement avec Prp20p. Un mutant *gtr1-11* est capable de supprimer l'effet des allèles *mtr1-2*, *srm1-1* et *prp20-1* (Nakashima *et al.*,

1996). Pour sa part, *DED1* code pour une ARN hélicase et semble également interagir avec Prp20p, puisqu'un mutant *ded1-21* (sensible au froid) supprime l'effet de l'allèle *srm1-1* (Hayashi *et al.*, 1996). Enfin, Dis3p (voir section 4.1.4.4 et 4.1.5) se lie directement à Gsp1p en stimulant l'activité GEF de Prp20p (Noguchi *et al.*, 1996). Ces informations suggèrent donc que la voie *GSP1/PRP20* puisse être modulée par plusieurs phénomènes différents ou soit impliquée dans divers processus autres que le trafic nucléocytoplasmique des ARNs et protéines.

#### **4.1.4. FONCTIONS BIOLOGIQUES ATTRIBUÉES À *RAN/GSP1***

Jusqu'à présent, plusieurs évidences ont démontré l'implication de Gsp1p (ou les composantes assurant sa régulation) dans une panoplie de fonctions (voir Tableau II). Des mutations ou la disruption d'un de ces éléments affectent plusieurs processus comme la stabilité chromosomique, la condensation/décondensation des chromosomes, l'initiation de la phase S, la réplication de l'ADN, la maturation et l'exportation des ARNm, le transport nucléocytoplasmique des protéines et la structure nucléolaire. De ces fonctions identifiées, le transport protéique au noyau est assurément l'élément le mieux caractérisé et où l'implication directe de Gsp1p a été clairement démontrée. Il existe toutefois plusieurs autres processus biologiques différents pour lesquels la voie *GSP1/PRP20* semble tenir un rôle.

<p><b>Tableau II. Processus influencés par le système de la GTPase <i>GSP1</i></b></p> <p><b>Progression du cycle cellulaire</b></p> <p><b>Condensation / décondensation des chromosomes</b></p> <p><b>Stabilité chromosomique</b></p> <p><b>Importation des protéines au noyau</b></p> <p><b>Réplication d'ADN</b></p> <p><b>Structure des microtubules</b></p> <p><b>Structure des nucléoles</b></p> <p><b>Maturation des ARNs</b></p> <p><b>Développement et structure de l'enveloppe nucléaire</b></p> <p><b>Initiation de la transcription</b></p> <p><b>Initiation de la phase S</b></p>
--

(Inspiré de Sazer, 1996).

#### 4.1.4.1 Transport nucléocytoplasmique des protéines

De nombreuses études ont démontré le rôle indéniable de *GSP1/RAN* et des éléments régulant son activité dans le transport nucléocytoplasmique des protéines. D'abord, suite à des expériences *in vitro* utilisant un système de cellules de mammifères perméabilisées, il a été possible de mieux caractériser ce mécanisme de transport (Adam *et al.*, 1990). L'utilisation de ce système a permis de purifier, cloner et caractériser les principales protéines impliquées dans la voie classique de transport de protéines au noyau, soit Ran, l'importine  $\alpha$ , l'importine  $\beta$  et Ntf2p. Par la suite, des expériences de

translocation au noyau sont venues confirmer l'implication de Ran dans ce phénomène de transport. En effet, l'addition de Ran, de Ntf2p, de GTP et d'ATP sont nécessaires et suffisants pour permettre l'importation de protéines (ex : protéines couplées à un signal de localisation nucléaire) qui est déjà ancrées aux pores nucléaires (Melchior *et al.*, 1993; Moore et Blobel, 1993). Dans ces études, il a également été observé que l'ajout d'un homologue du GTP non hydrolysable inhibe l'importation de protéines. Allant dans le même sens, la surexpression d'un mutant de *Ran* incapable d'hydrolyser le GTP provoque un arrêt de transport (Schlenstedt *et al.*, 1995a). Ces données suggèrent donc que l'hydrolyse du GTP porté par Ran soit nécessaire au transport adéquat des protéines au noyau. D'autre part, des expériences plus directes impliquent GSP1/RAN dans ces mécanismes de transport. Il a été démontré que Ran-GTP se lie directement à l'importine  $\beta$ , ce qui provoque la dissociation de l'hétérodimère importine  $\alpha/\beta$  qui est un complexe protéique impliqué dans le transport des protéines du cytoplasme jusqu'aux pores nucléaires (Rexach et Blobel, 1995; Chi *et al.*, 1996; Görlich *et al.*, 1996). Enfin, certaines nucléoporines comme Ranbp2p contiennent des motifs RBD (*Ran Binding Domain*) susceptibles de lier Ran (Hartmann, 1995; Yokoyama *et al.*, 1995), ce qui laisse suggérer une possible interaction entre Ran et ces domaines. Par ailleurs, de nombreuses mutations au niveau de *PRP20* (Tachibana *et al.*, 1994; Koepp *et al.*, 1996), *RNAI* (Corbett *et al.*, 1995) et *YRB1* (Schlenstedt *et al.*, 1995b) démontrent également des problèmes de transport. Toutes ces observations suggèrent donc un rôle direct de Gsp1p/Ran au niveau du transport de protéines au noyau.

Un des modèles intégrant Ran au transport nucléocytoplasmique propose un système voulant que la distribution asymétrique de Ran-GTP (noyau) versus Ran-GDP (cytoplasme) provoque un gradient permettant un transport unidirectionnel du cytoplasme au noyau. Ainsi, l'hétérodimère importine  $\alpha/\beta$  se formerait dans le cytoplasme, accomplirait sa fonction de transport par la liaison des protéines à importer à la sous-unité  $\alpha$  et se dissocierait au noyau grâce à Ran-GTP présent en grande quantité (Görlich *et al.*, 1998). La notion de gradient pourrait également être applicable à l'exportation, mais impliquerait une association du cargo nucléaire avec Ran-GTP pour ensuite être dissocié au cytoplasme. Toutefois, cette dernière hypothèse vient en contradiction avec l'accumulation nucléaire de Ran.

#### 4.1.4.2 Transport et maturation des ARNs

Peu de facteurs concernant le transport, la synthèse et la modification des ARNs ont été identifiés et caractérisés jusqu'à présent. Toutefois, une multitude de phénotypes associés à ces fonctions ont été caractérisés dans le système impliquant la GTPase Gsp1p. En effet, plusieurs phénotypes différents reliés aux ARNs ont été rapportés suite à l'analyse de mutants *rna1* et *prp20*. Ces derniers présentent des défauts non seulement dans l'exportation d'ARNm, mais aussi au niveau de la polyadénylation des ARNm, de l'épissage et de la maturation des ARNr ainsi que de l'initiation et de la terminaison de la transcription (Forrester *et al.*, 1992). De plus, il est possible d'observer une accumulation nucléaire d'ARNs polyadénylés lorsque RCC1 n'est plus fonctionnelle, ceci après quelques minutes seulement (Forrester *et al.*, 1992; Aebi *et al.*, 1990). Ces processus nécessitent également l'hydrolyse du GTP. En effet, un des mutants *rna1* provoque rapidement cette

même accumulation au noyau (Forrester *et al.*, 1992). Ces observations supportent donc un rôle de Gsp1p dans le transport d'ARNm, en impliquant son état lié en GTP ainsi que son hydrolyse.

Par ailleurs, il est bon de noter que Rna1p et Prp20p semblent tous deux impliqués dans le transport protéique au noyau autant que dans les fonctions d'export des ARNs. Il existe ainsi une forte corrélation entre les phénotypes associés à la maturation/transport d'ARNs et les problèmes retrouvés au niveau du transport de protéines au noyau. Ces observations proposent donc l'idée que, le transport nucléaire étant un processus bidirectionnel, le trafic des molécules dirigées du cytoplasme vers le noyau influence celles impliquées dans la voie inverse. Ainsi, toute mutation bloquant l'importation des protéines pourrait affecter l'exportation des ARNs et vice versa. Cette hypothèse explique d'ailleurs pourquoi une protéine cytosolique comme Rna1p peut influencer des fonctions typiquement nucléaires comme la maturation des ARNs. Toutefois, cette association des phénomènes d'importation de protéines / exportation des ARNs ne peut être applicable systématiquement. En effet, certains mutants de *GSP1*, par exemple, ne démontrent pas de défauts d'exportation d'ARNs alors que le transport au noyau est affecté (Oki *et al.*, 1998). D'autre part, la similitude de nombreux phénotypes observés entre des mutants *rna1* et *prp20* laisse suggérer qu'une modification d'un de ces deux éléments mène à une perturbation globale du système impliquant la GTPase Gsp1p (Forrester *et al.*, 1992). Ceci souligne donc l'importance du cycle GTP/GDP pour la GTPase et la nécessité de pouvoir passer d'un état à l'autre afin d'effectuer les diverses fonctions biologiques essentielles.

#### 4.1.4.3 Progression du cycle cellulaire

Les cellules eucaryotes ont la particularité de posséder des mécanismes de contrôle leur permettant de prévenir l'entrée prématurée de la cellule en mitose, si cette dernière n'a pas complété la synthèse de son ADN. Il a été ainsi suggéré que *RCC1* soit impliqué activement dans ces processus, puisqu'il semble réguler de façon négative l'initiation de la condensation des chromosomes (Bischoff *et al.*, 1991). De plus, certaines observations effectuées chez *Schizosaccharomyces pombe* ont démontré qu'un *RCC1* non fonctionnel provoquait des problèmes au niveau de la mitose (Sazer *et al.*, 1994), alors que la surexpression de *Ran* supprime ces défauts observés. Une telle association supporte donc l'hypothèse que le système *RAN/RCC1* soit une composante intrinsèque du contrôle de l'entrée en mitose.

Par ailleurs, étant localisée à la chromatine, *RCC1* détecterait le niveau de progression de la phase S et agirait via *Ran* afin de réguler l'activation de la protéine kinase *Cdc2/cyclin B* et ainsi contrôler l'entrée en mitose. Certaines évidences supportent cette hypothèse. Tout d'abord, des mutants de *Ran* comportant des défauts de l'activité GTPasique provoquent un arrêt du cycle cellulaire avant même l'entrée en phase S et la transition G2-M (Ren *et al.*, 1993). Ensuite, des évidences plus directes impliquant *Ran* avec le complexe *Cdc2/Cyclin B* proviennent d'un système utilisant des extraits d'œufs de *Xenopus*. Dans ce système, un mutant dominant de *Ran* inhibe l'activation de la kinase, qu'il y ait présence ou non d'un noyau reconstitué (Clarke *et al.*, 1995). De plus, l'injection directe de *Ran-GTP* dans des cellules où la fonction de *RCC1* est compromise empêche la condensation prématurée des chromosomes, ce qui indique que *Ran-GTP* peut par lui seul

jouer un rôle sur l'inhibition de l'activation du MPF (*Mitosis Promoting Factor*) (Ohba *et al.*, 1996). Finalement, des mutants thermosensibles de *GSP1* semblent bloquer en phase G1 du cycle cellulaire (Oki *et al.*, 1998).

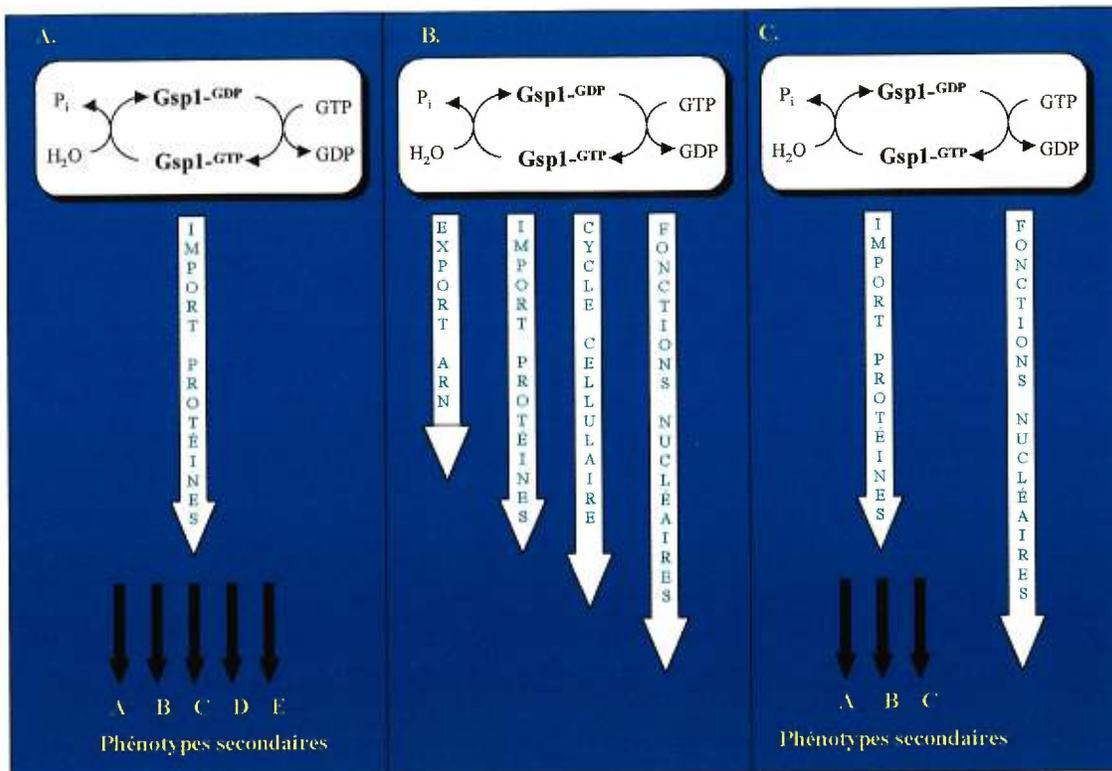
#### 4.1.4.4 Fonctions nucléaires et stabilité chromosomique

De nombreuses évidences suggèrent l'implication de la GTPase Gsp1p dans des fonctions nucléaires et dans l'organisation du noyau. Tout d'abord, l'architecture de l'enveloppe nucléaire est altérée dans des cellules possédant une activité GEF déficiente. Chez *S. pombe*, une telle mutation provoque la fragmentation de cette enveloppe (Demeter *et al.*, 1995) alors que chez la levure à bourgeonnement, on observe un plus petit noyau possédant une membrane altérée (Sazer *et al.*, 1994). Dans le cas de *Xenopus*, la présence d'un mutant dominant négatif de Ran (RanT24N) résulte en un plus petit noyau contenant de la chromatine condensée incapable d'initier la réplication d'ADN (Kornbluth *et al.*, 1994). La synthèse d'ADN est donc un autre aspect où la GTPase pourrait occuper un rôle. D'autre part, des fonctions associées aux chromosomes ont également été caractérisées. Premièrement, RCC1 se lie avec la chromatine et semble contrôler l'initiation de la condensation de la chromatine (Bischoff *et al.*, 1991). De plus, la surexpression de Yrb1p démontre un taux élevé de perte et de non-disjonction des chromosomes, phénotype semblable à celui observé lorsque Gsp1p est surexprimée (Ouspenski *et al.*, 1995). Yrb1p agirait également au niveau du fuseau mitotique (Ouspenski, 1998), ce qui suggère fortement l'implication du système dans la stabilité chromosomique. Pour aller dans le même sens, il a également été démontré que le mutant *srm1-1* mène à une stabilité réduite des plasmides et chromosomes (Clark *et al.*, 1991).

Par ailleurs, certaines protéines associées à l'organisation nucléaire/fonction mitotique sont des cibles ou effecteurs possibles de la GTPase Gsp1p. En effet, Dis3p se lie directement à Gsp1p en stimulant l'activité GEF de Prp20p (Noguchi *et al.*, 1996). Cette protéine a été décrite à l'origine comme étant impliquée dans la mitose, puisqu'un mutant *dis3-54* mène à un défaut au niveau de cette fonction. D'autre part, la surexpression de *PRP20* supprime un défaut de croissance de certains mutants conditionnels de l'alpha-tubuline qui provoque un arrêt de croissance et un excès de microtubules (Kirkpatrick *et al.*, 1994).

#### **4.1.5. GSP1 : UNE OU PLUSIEURS FONCTIONS?**

Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à savoir de quelle façon la GTPase Gsp1p est impliquée dans les différents phénotypes observés (voir Figure 2). En effet, Gsp1p pourrait être impliquée directement dans tous les processus biologiques. À l'opposé, elle pourrait n'être impliquée qu'au niveau du transport, ce dernier élément influençant tous les autres phénotypes observés. Enfin, Gsp1p pourrait à la fois être impliquée dans certains processus comme le transport au noyau et des fonctions nucléaires essentielles.



**Figure 2.** Hypothèses expliquant les effets pléiotropiques observés lorsque le cycle *GSP1* est altéré. (A) *Gsp1p* agit directement au niveau d'un seul phénomène, par exemple au niveau du transport, et tous les autres phénotypes observés sont secondaires. (B) *Gsp1p* est impliqué dans la majorité des processus, impliquant un rôle direct de la GTPase dans les divers processus. (C) *Gsp1p* fonctionne directement dans plus d'une voie, mais certains phénotypes sont attribuables à des effets secondaires causés par un défaut dans l'une de ces voies (inspiré de Rush *et al.*, 1996).

Il semble peu probable que la voie *GSP1/PRP20* soit impliquée directement dans tous les processus biologiques décrits jusqu'à maintenant. Beaucoup de phénotypes observés peuvent fort bien être la conséquence d'un défaut du transport ou d'une fonction nucléaire déficiente. Par ailleurs, on ne peut expliquer tous les phénotypes en ne se basant que sur le concept de transport au noyau. Ces éléments supportent donc la troisième

hypothèse proposée ci-haut (voir Figure 2). Des expériences démontrent en effet que certaines fonctions essentielles de Gsp1p sont perturbées sans toutefois affecter de façon détectable le transport nucléaire des protéines.

Tout d'abord, un mutant dominant négatif de *Ran* semble interférer avec une fonction essentielle à la croissance de la cellule sans pour autant nuire au transport nucléocytoplasmique (Carey *et al.*, 1996; Kornbluth *et al.*, 1994). De plus, contrairement aux autres allèles mutantes de *YRB1*, la mutation *yrb1-21* ne cause pas de déficiences détectables au niveau du transport des protéines Npl3p, histone H2B ou de la beta-galactosidase fusionnée à un signal de localisation nucléaire classique. Il a donc été suggéré que le phénotype de mortalité observé à température restrictive soit causé par une fonction essentielle autre que le système de transport au noyau (Ouspenski, 1998).

Par ailleurs, une série de mutants de *GSP1* démontrent un arrêt de croissance en phase G1 du cycle cellulaire (Oki *et al.*, 1998). Or, certaines expériences ont démontré qu'un mutant de l'importine  $\alpha$ , qui est défectueux au niveau du transport de protéines au noyau, est arrêté en phase G2 (Loeb *et al.*, 1995). Il serait donc possible qu'un élément relatif à la phase S entre en ligne de compte. Aussi, comme il a été décrit précédemment, lorsqu'un mutant dominant négatif de *Ran* est ajouté à des extraits d'œufs de *Xenopus*, l'activation du MPF est inhibée alors que le transport au noyau semble normal (Kornbluth *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1995). Ces observations mettent donc en évidence une fonction cellulaire qui n'est pas attribuable à un défaut du transport nucléaire de protéines ou d'ARN, puisque l'activation du MPF par *Ran* survient même en absence d'un noyau chez *Xenopus*.

Enfin, des expériences récentes ont prouvé que Ran-GTP interagit avec RanBPM, une protéine impliquée dans la formation des microtubules (Masafumi *et al.*, 1998). Ces données suggèrent donc un nouveau rôle de Ran dans la régulation du centrosome via sa liaison avec RanBPM. De plus, des éléments comme Dis3p qui interagissent directement avec la GTPase et qui semblent indépendants des phénomènes de transport au noyau viennent renforcer l'hypothèse de l'implication de la voie *GSP1* dans plusieurs fonctions différentes chez la levure.

D'autre part, la découverte récente d'une interaction entre Gsp1p et Sir4p (manuscrit en préparation), une protéine impliquée au niveau de la répression transcriptionnelle chez *S. cerevisiae*, nous a portés à croire que la voie *GSP1/PRP20* serait impliquée dans ce phénomène. Supportant cette hypothèse, il a été observé que l'instabilité chromosomique est un phénotype commun aux deux processus. En effet, la délétion des gènes *RIF1* et *RIF2* (Wotton *et al.*, 1997) et la surexpression de Sir2p et Sir3p, chacun étant impliqué dans la répression transcriptionnelle, causent une perte de chromosomes (Holmes *et al.*, 1997). De plus, ce phénomène de répression s'établit en phase S du cycle cellulaire, ce qui coïncide avec la réplication d'ADN (Miller and Nasmyth, 1984). Notons que *GSP1* joue un rôle dans l'initiation de la phase S et que certains mutants de *GSP1* se trouvent bloqués en phase G1, ce qui suggère un rôle possible de cet élément dans la phase réplication d'ADN (Oki *et al.*, 1998). La similitude des phénotypes observés entre la voie *GSP1/PRP20* et la répression transcriptionnelle soulève donc la question à savoir dans quelle mesure ces deux phénomènes peuvent être reliés.

## 4.2. RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE TYPE "SILENCING"

### 4.2.1. INTRODUCTION

Le "silencing" est le processus par lequel un gène se retrouve réprimé transcriptionnellement, dû à sa proximité d'une structure fermée de la chromatine, qui empêche l'appareil transcriptionnel ainsi que les diverses enzymes de modification de l'ADN d'y avoir accès. Ce phénomène est un bon exemple de répression qui ne dépend pas du type de gène impliqué mais bien de la position critique de ce gène à l'intérieur d'une structure modifiée de la chromatine. Ce processus de régulation se retrouve chez plusieurs organismes, de la bactérie à l'humain. Il participe entre autres à la formation de pilus chez *E. coli* (Russo et al, 1996) tandis qu'il est responsable de l'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles (revue par Henikoff, 1996).

Pour sa part, la levure *Saccharomyces cerevisiae* constitue un excellent modèle afin d'étudier ce genre de phénomène. En effet, le "silencing" transcriptionnel est probablement le phénomène épigénétique le mieux défini chez cet organisme. Ce processus est retrouvé à trois niveaux différents dans la cellule : au niveau des télomères, aux loci *HM* (*Mating type locus*) ainsi qu'au rDNA. La répression est hiérarchique, c'est-à-dire que les loci *HM* exerceront la plus forte répression, suivi des télomères et ensuite du rDNA. Ces régions possèdent des séquences spécifiques qui agiront en *cis* afin de recruter certains facteurs, ces derniers agissant en *trans* afin de promouvoir la répression transcriptionnelle. Les facteurs seront donc impliqués plus ou moins directement dans le phénomène de "silencing". En effet, on dénombre au moins une douzaine de protéines qui y sont associées (Laurenson, 1992), les plus connues étant les protéines Sir (*Silent Information Regulator*) (Ivy et al., 1986) et Rap1p (Shore et al., 1987).

#### 4.2.2. ÉLÉMENTS MODULANT LA RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE

Étant donné l'étroite relation qui existe entre la répression transcriptionnelle de type "silencing" et un état fermé de la chromatine, il devient clair que toute protéine devant modifier cet état aura un effet plus ou moins direct sur les niveaux de "silencing" à l'intérieur de la cellule. D'une part, il existe une série de protéines qui agissent directement sur la répression transcriptionnelle, en formant un complexe protéique aux domaines silencieux et aura ainsi comme fonction de modifier l'état de la chromatine. Certains autres facteurs ne font pas partie intégrante de ce complexe, mais auront quand même un rôle à jouer dans ce phénomène. Il faut aussi souligner que tous ces facteurs ne se retrouveront pas nécessairement à chaque locus réprimé par le "silencing". De plus, certains facteurs favorisent la répression alors que d'autres auront un effet antagoniste sur ce phénomène.

##### 4.2.2.1. Rôle des protéines Sir

Les gènes *SIR* codent pour des protéines nucléaires non essentielles à la viabilité mais qui ont une importance cruciale dans l'établissement et le maintien de la répression transcriptionnelle aux loci *HM*, aux télomères ainsi qu'au rDNA. Tout d'abord, la protéine Sir1p est uniquement retrouvée aux loci *HM* où elle agirait principalement au niveau de l'établissement de la répression (Chien *et al.*, 1993). Pour leur part, les protéines Sir3p et Sir4p sont retrouvées autant à cet endroit qu'au niveau des télomères et agissent surtout comme protéines structurales (Palladino *et al.*, 1993). Unique en son genre, la protéine Sir2p est impliquée dans tous les domaines décrits ci-haut. Sa surexpression provoque toutefois une hypoacétylation des histones, ce qui laisse supposer une fonction directe au niveau de la déacétylation des histones ou bien un rôle dans la modulation de l'acétylation (Braunstein *et al.*, 1993). D'autre part, les protéines Sir n'ont pas une grande homologie entre elles et aucune ne possède la capacité de lier directement l'ADN.

Plusieurs expériences de surexpression et de mutations des protéines Sir ont souligné leurs rôles au niveau de la répression transcriptionnelle. D'une part, les mutants *sir3Δ* et *sir4Δ* affectent l'intégrité des télomères en provoquant leur raccourcissement (Gotta *et al.*, 1996). De plus, la répression transcriptionnelle aux télomères est également abolie dans un mutant *sir2Δ*, *sir3Δ* et *sir4Δ* (Aparicio *et al.*, 1991). D'autre part, la surexpression de Sir4p ou de la portion C-terminale de Sir4p provoque une dérégulation transcriptionnelle aux loci *HM* ainsi qu'aux télomères (Marshall *et al.*, 1987; Cockell *et al.*, 1995). Quant Sir3p, son augmentation de la quantité de Sir3p stimule la répression transcriptionnelle aux télomères en augmentant à plus de 16 kb la région susceptible d'être affectée par la répression (Hecht *et al.*, 1996). Enfin, la surexpression de la portion C-terminale de Sir3p mène à la dérégulation des loci *HML* et *HMR* (Le *et al.*, 1997).

Plusieurs évidences suggèrent que Sir2p, Sir3p, Sir4p et Rap1p interagissent ensemble pour former un complexe et qu'une stœchiométrie précise de ses composantes est essentielle pour l'intégrité du complexe. Tout d'abord, Rap1p, Sir3p, Sir4p et une portion du pool cellulaire de Sir2p se retrouvent localisés aux régions télomériques et subtélomériques (Gotta *et al.*, 1996, 1997). Sir3p est également co-immunoprécipitée avec Sir2p, Sir4p, Rap1 ainsi que les histones H2A, H2B, H3 et H4. (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997; Holmes *et al.*, 1997). D'autre part, des études *in vitro* et expériences de deux hybrides ont démontré l'interaction entre Sir2p-Sir3p, Sir2p-Sir4p, Sir3p-Sir4p (Moazed *et al.*, 1997; Triolo *et al.*, 1996; Moretti *et al.*, 1994) et les protéines Sir3p et Sir4p avec Rap1 (Moretti *et al.*, 1994). Enfin, la disruption de *SIR3* délocalise Sir4p et vice versa (Gotta *et al.*, 1996).

#### 4.2.2.2. Rôle de la protéine Rap1 et des protéines Rif

Rap1p est le seul facteur connu pouvant lier directement une séquence télomérique  $C_{1-3}A/TG_{1-3}$  (Shore *et al.*, 1987). Il a également été identifié comme étant impliqué dans l'activation ou la répression de certains gènes. En effet, Rap1p se lie à la région promotrice de plusieurs gènes, incluant les gènes codant pour des protéines ribosomales et enzymes de la glycolyse, et agit comme activateur de transcription (revue par Shore, 1994). Il se lie également aux cassettes silencieuses situées aux loci *HM* en agissant comme répresseur transcriptionnel (Moretti *et al.*, 1994). Rap1p occupe donc une fonction au niveau de la répression transcriptionnelle de type "silencing", puisque certains mutants *rap1* provoquent des défauts dans ce processus (Sussel *et al.*, 1991).

Rap1p est en fait impliqué directement dans la répression transcriptionnelle aux télomères (TPE) ainsi qu'au loci *HM* en se liant à ces domaines et en recrutant par la suite des facteurs comme Sir3p et Sir4p nécessaires à l'établissement et au maintien d'une structure silencieuse de la chromatine (Moretti *et al.*, 1994). Pour appuyer cette idée, il a été démontré que l'introduction de séquences liant Rap1p près du locus  $MAT\alpha$  initie une répression transcriptionnelle là où la transcription est normalement active (Shei *et al.*, 1996). De plus, un mutant *rap1-1p* se lie plus fortement à la protéine Sir4p et augmente ainsi la répression aux télomères (Marcand *et al.*, 1997a). Cette dernière observation et le fait que Rap1p puisse se lier directement aux protéines Sir3p et Sir4p (Moretti *et al.*, 1994) supportent donc l'hypothèse d'un rôle de recrutement pour la protéine Rap1p. Enfin, Rap1p serait également impliqué dans la régulation de la longueur des télomères. A cet effet, le plus récent modèle suggère qu'une grande quantité de Rap1p aux télomères inhibe l'activité de la télomérase, ce

qui mènerait éventuellement au raccourcissement des télomères. Lorsque la quantité de Rap1p est faible, la télomérase deviendrait active afin de rétablir une longueur adéquate des télomères (Marcand *et al.*, 1997b).

D'autre part, les protéines Rif1p et Rif2p interagissent avec la portion C-terminale de Rap1p et interagissent également entre elles. Ces données suggèrent donc la formation d'un complexe *in vivo* entre ces éléments (Wotton *et al.*, 1997). Ce complexe serait impliqué notamment dans la régulation de la longueur des télomères (Marcand *et al.*, 1997b). De plus, Rif1p et Rif2p semblent compétitionner avec Sir3p et Sir4p pour la liaison avec Rap1p (Marcand *et al.*, 1997a). Les protéines Rif agiraient donc comme agents antagonistes à la répression transcriptionnelle. Pour appuyer cette hypothèse, des expériences ont démontré que le mutant *rap1-12*, étant incapable de lier les protéines Rif, accentue la répression aux télomères probablement parce qu'une plus grande quantité de Sir3p et Sir4p peuvent ainsi être présents à cet endroit (Buck et Shore, 1995).

#### **4.2.2.3. Rôle des Histones H3/H4 et de l'acétylation**

Les gènes activement transcrits sont caractérisés par de l'ADN associé à des protéines histones acétylées, alors qu'un gène peu transcrit se caractérise plutôt par une association avec des histones hypoacétylées (Wade *et al.*, 1997). Un tel principe se retrouve également au niveau de la répression transcriptionnelle de type "silencing", puisque l'histone H4 présente aux télomères et aux loci *HM* se retrouve hypoacétylée comparativement à un gène activement transcrit (Braunstein *et al.*, 1993). Ainsi, certains gènes associés à une fonction N-acétyltransférase ont été reconnus comme étant impliqués dans le phénomène de répression

transcriptionnelle. En effet, des mutations au niveau des gènes *NAT1*, *ARD1* et *SAS2* (*Something About Silencing*) provoquent la dérégulation transcriptionnelle aux télomères (Aparicio *et al.*, 1991; Reifsnnyder *et al.*, 1996). Toutefois, de récentes études ont démontré une relation plus complexe entre l'acétylation des histones et la transcription. En effet, il semble qu'un certain niveau d'acétylation soit critique pour causer la répression, puisque deux histones déacétylases, Rpd3p et Hda1p, ont été caractérisées comme agissant contre la répression transcriptionnelle (Rundlett *et al.*, 1996). Par ailleurs, des délétions et mutations ponctuelles de la portion N-terminale de l'histone H4 provoquent une baisse de répression aux télomères ainsi qu'aux loci *HM* (Kayne *et al.*, 1988; Aparicio *et al.*, 1991). De plus, des mutations de la portion N-terminale de l'histone H3 causent une complète dérégulation aux télomères (Thompson *et al.*, 1994). Ces observations viennent confirmer l'idée que la répression au loci *HM* et télomères requiert la portion N-terminale des histones H3 et H4 et que le niveau d'acétylation des histones participerait à l'établissement et le maintien des domaines silencieux.

#### **4.2.2.4. Rôle de l'ubiquitination et de la phosphorylation**

L'ubiquitination, phénomène impliqué dans la dégradation et modification de protéines, est un élément qui semble influencer la répression transcriptionnelle. En effet, la première évidence provient de l'association entre la protéine Ubf3p, une enzyme de déubiquitination, avec Sir4p. La délétion de ce gène (augmentation d'ubiquitination) augmente la répression transcriptionnelle aux télomères (Moazed *et al.*, 1996). Ces observations ont donc amené l'hypothèse que *UBF3* pourrait réguler négativement l'assemblage du complexe Sir ou modifier le niveau de dégradation de certaines de ses

composantes. De plus, un mutant Ubc2p, protéine impliquée dans l'ubiquitination, réduit la force de répression transcriptionnelle aux loci *HM* ainsi qu'aux télomères (Huang *et al.*, 1997). Il semble donc que l'ubiquitination soit un processus favorisant la répression transcriptionnelle.

Par ailleurs, la phosphorylation est un autre moyen de réguler le "silencing". On sait par exemple que chez la Drosophile, *HP-1 (Heterochromatin Protein 1)* est phosphorylé de multiples façons lors de l'assemblage de l'hétérochromatine (Eissenberg *et al.*, 1994). D'autre part, un lien direct entre la phosphorylation et la répression transcriptionnelle a été établi chez la levure. En effet, Sir3p se trouve hyperphosphorylé en présence de phéromone (facteur  $\alpha$ ), d'une carence nutritionnelle ou d'un choc thermique. Cette hyperphosphorylation est activée par la cascade MAP Kinase et implique une augmentation de la répression transcriptionnelle aux télomères (Stone *et al.*, 1996). La phosphorylation de Sir3p pourrait donc réguler son association avec les autres protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle ou bien réguler l'assemblage de la chromatine .

#### **4.2.2.5. Rôle de la réplication et de la réparation d'ADN**

Plusieurs évidences suggèrent un lien entre la répression transcriptionnelle et la réplication d'ADN. Il a d'abord été démontré que le passage à travers la phase S du cycle cellulaire s'avère essentiel à l'établissement de la répression transcriptionnelle chez *S. cerevisiae*. En effet, le moment où cette répression est établie coïncide avec la phase S lors de la réplication d'ADN (Miller *et al.*, 1984). Ensuite, la présence de sites d'attachement du complexe protéique ORC (complexe multiprotéique impliqué dans la réplication d'ADN) aux

éléments silencieux des loci *HM* ainsi qu'aux régions subtélomériques viennent renforcer cette idée. En plus de son rôle dans la réplication d'ADN, ORC serait également impliqué au niveau du "silencing" puisque des mutants *orc2* et *orc5* démontrent des défauts dans ces deux processus (Fox *et al.*, 1995; Loo *et al.*, 1995). De plus, il existe un mutant *orc5* qui présente un défaut au niveau de la répression transcriptionnelle sans toutefois affecter la réplication (Dillin *et al.*, 1997). Ces données suggèrent donc la possibilité d'un rôle spécifique du complexe ORC dans la répression transcriptionnelle.

D'autre part, des essais de deux hybrides ont démontré l'interaction entre la protéine Sir4p et Hdf1p (homologue du facteur Ku retrouvé chez les mammifères), une protéine impliquée dans la réparation non homologue de bris double brins d'ADN (Tsukamoto *et al.*, 1997). Il est également important de souligner la nécessité des protéines Sir2p, Sir3p et Sir4p dans ces phénomènes de réparation (Tsukamoto *et al.*, 1997). Il a été ainsi proposé que Ku puisse recruter directement Sir4p et éventuellement le complexe Sir aux endroits où l'ADN double brins est brisé, et induire la formation d'une région fermée de la chromatine qui s'avère essentielle à la résolution de la cassure.

#### 4.2.2.6. Autres protéines impliquées

Il existe une multitude d'autres gènes pouvant intervenir de façon positive ou négative dans le phénomène de répression transcriptionnelle. En effet, les gènes *ASF1* et *ASF2* (*Anti-Silencing Function*) provoquent la dérpression des loci silencieux lorsqu'ils sont surexprimés (Le *et al.*, 1997). Le gène *DIS1* est également un élément qui interfère avec la répression transcriptionnelle. Ce gène code pour une ATPase qui s'associe à Sir4p *in vivo* (Zhang *et al.*,

1997). D'autre part, des éléments comme *CAC1*, impliqué dans l'assemblage des nucléosomes (Monson *et al.*, 1997), et *WTM* agissant comme régulateur de transcription (Pemberton et Blobel, 1997) vont plutôt stimuler la répression. Par ailleurs, des défauts au niveau de la répression transcriptionnelle, notamment un mutant *rap1s*, peuvent être corrigés par certains gènes comme *SDS* (*Suppressors of Defective Silencing*) (Sussel *et al.*, 1995). Le mutant *sum1-1* permet également de restaurer la répression chez des cellules possédant des mutations au niveau des gènes SIR (Chi et Shore, 1996). Toutes ces observations, en conjonction avec les informations décrites précédemment, soulignent donc l'idée voulant que la répression transcriptionnelle soit un phénomène affecté par plusieurs composantes.

**Tableau III. Facteurs impliqués dans la répression transcriptionnelle ainsi que leurs implications au niveau des différents loci.**

Facteur	Locus		
	<i>HM</i>	Télomères	rDNA
<b>Sir1p</b>	+	-	-
<b>Sir2p</b>	+	+	+
<b>Sir3p</b>	+	+	-
<b>Sir4p</b>	+	+	+
<b>Abf1</b>	+	-	?
<b>Hst1p</b>	+	-	?
<b>Hst3p/4p</b>	-	+	-
<b>Sas2p</b>	+	+	?
<b>Sas3p</b>	+	-	?
<b>Rpd3p</b>	?	+	?
<b>Cac1p</b>	-	+	?
<b>Rap1p</b>	+	+	?
<b>Histones H3/H4</b>	+	+	+
<b>ORC</b>	+	+	?
<b>TLC1</b>	-	+	?
<b>Est2p</b>	-	+	?
<b>Hdf1p</b>	-	+	?

Les symboles +/- signifient que le facteur est impliqué ou non au niveau du locus donné. Le symbole ? signifie un rôle indéterminé pour ce locus (inspiré de Pillus, 1997).

### 4.2.3. RÉPRESSION AUX TÉLOMÈRES

#### 4.2.3.1. Fonction et structure des télomères

Les télomères sont des séquences répétitives d'ADN situées aux extrémités des chromosomes. Chez *S. cerevisiae*, ces structures sont composées de courtes séquences de  $300 \pm 75$  paires de base présentant un motif  $C_{1-3}A/TG_{1-3}$  (Shampay *et al.*, 1984). D'autres types d'éléments répétés situés à proximité du motif  $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ , les éléments X et Y', participent également à la stabilité des chromosomes et influencent le niveau de répression transcriptionnelle tout en facilitant les mécanismes de recombinaison (Louis *et al.*, 1995).

Ces séquences ont plusieurs rôles à jouer, notamment au niveau de la stabilité et de l'intégrité chromosomique. En effet, les télomères permettent d'une part aux cellules de distinguer les chromosomes intacts de ceux qui ont subi une cassure (Sandell *et al.*, 1993). Ils protègent également le bout des chromosomes contre la dégradation et empêchent la fusion terminale chromosomique qui génèrent des chromosomes dicentriques lors de la mitose (revue par Gall, 1995). Des expériences récentes ont aussi démontré leurs rôles au niveau de la ségrégation des chromosomes durant la mitose (Kirk *et al.*, 1997). Ainsi, une mutation au niveau des séquences télomériques empêcherait la séparation des chromosomes lors de l'anaphase. De plus, les télomères sont nécessaires à la réplication complète des chromosomes. La nature linéaire des chromosomes fait en sorte que l'extrémité de la molécule ne pourra être répliquée complètement par la polymérase (Watson, 1972). Les séquences télomériques permettent donc de recruter la télomérase qui a comme fonction la résolution de ces bouts d'ADN incomplets (revue par Greider, 1995). D'autre part, certains gènes comme

*EST2* et *TLC1*, codant pour des composantes de la télomérase, vont modifier la longueur des télomères et par conséquent affecter le niveau de répression transcriptionnelle aux télomères (Lendvay *et al.*, 1996; Singer *et al.*, 1994).

#### 4.2.3.2. Description du phénomène de TPE

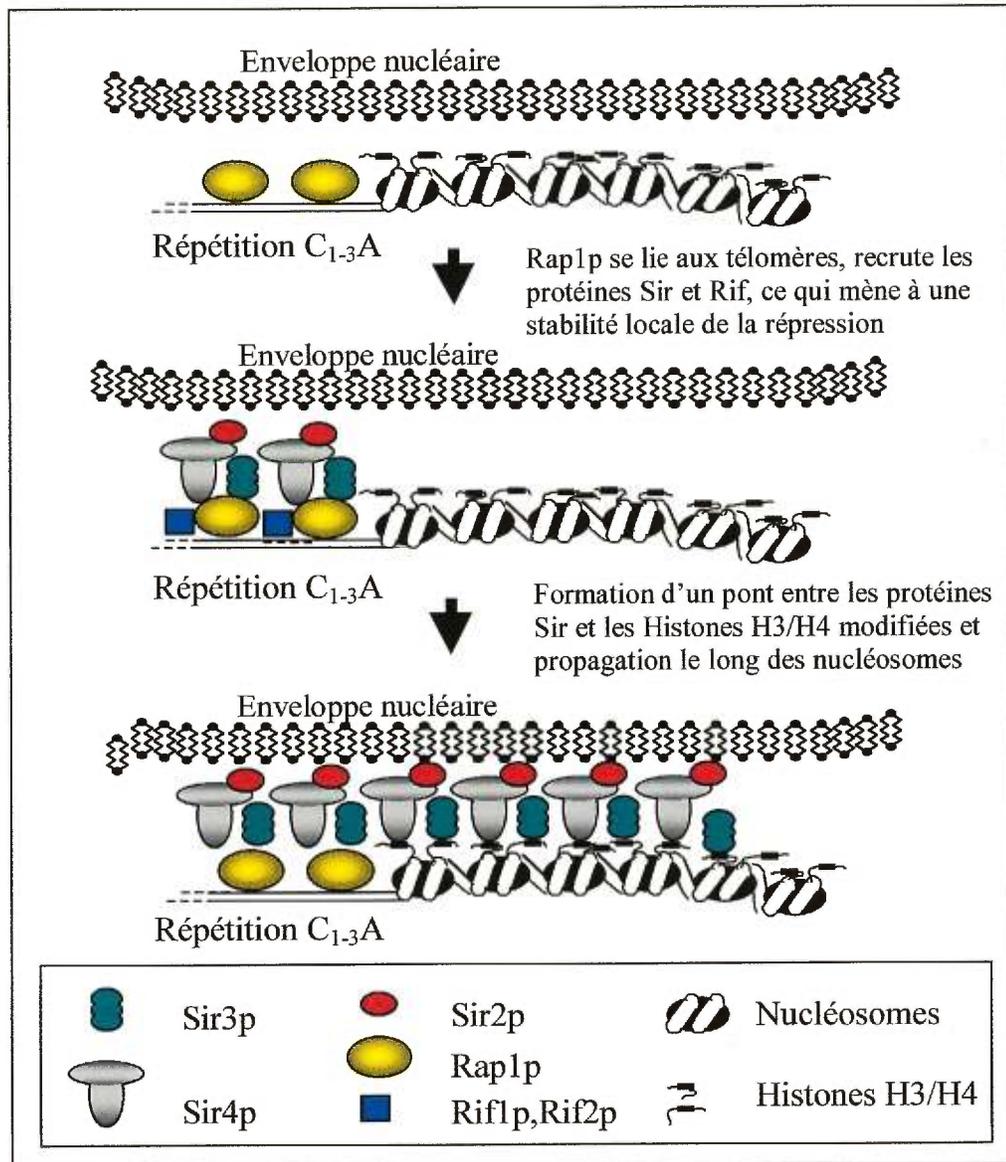
Chez *S. cerevisiae*, les gènes situés près des télomères sont sujets à la répression transcriptionnelle, mieux connue sous le nom de TPE (*Telomere Position Effect*). Ce phénomène fut d'abord observé lorsque des gènes comme *ADE2* placés près des motifs  $C_{1-3}A/TG_{1-3}$  devenaient transcriptionnellement inactifs (Gottschling *et al.*, 1990). Cette répression due au TPE concorde avec une réduction du taux de méthylation d'ADN près des télomères (Gottschling, 1992). Ces observations suggèrent donc que la région adjacente aux télomères possède une structure altérée et que la chromatine se trouve ainsi sous une forme inaccessible.

De plus, ce phénomène est généralisé, c'est-à-dire qu'on le retrouve chez toutes les souches de levure et pour chacun des télomères (Gottschling *et al.*, 1990). Cette répression est également inversement proportionnelle à la distance qui sépare les gènes en question des télomères (Renauld *et al.*, 1993). En effet, une répression transcriptionnelle est observée lorsqu'un gène rapporteur est placé entre 1 et 3 kb d'un motif  $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ , alors que cette répression diminue graduellement à une distance supérieure à 3 kb (Renauld *et al.*, 1993). D'autre part, le TPE est un phénomène réversible chez la levure. En effet, cet état est transitoire, c'est-à-dire que les gènes réprimés peuvent redevenir actifs transcriptionnellement (Gottschling *et al.*, 1990). Il existerait donc une compétition constante entre l'établissement d'un complexe de transcription actif et la présence d'une chromatine réfractaire à cette

transcription. Pour appuyer cette hypothèse, des expériences ont démontré que l'élimination de certains *trans*-activateurs augmentait le niveau de TPE (Aparicio *et al.*, 1994). Par contraste, une augmentation de l'expression de ces *trans*-activateurs réduit considérablement le "silencing" transcriptionnel.

#### 4.2.3.3. Mécanisme de répression

Le présent modèle expliquant la répression télomérique suggère d'abord une liaison directe de la protéine Rap1p aux séquences télomériques (voir Figure 3). Plusieurs évidences suggèrent une telle interaction. D'une part, des mutants *rap1* affectent la longueur des télomères ainsi que le TPE (Conrad *et al.*, 1990). D'autre part, des anticorps anti-*rap1p* immunoprécipitent spécifiquement et efficacement des télosomes libres provenant de molécules d'ADN chromosomique (Thompson *et al.*, 1994). De plus, des expériences d'immunolocalisation ont permis de détecter Rap1 sur des séquences subtélomériques (Gotta *et al.*, 1996). Par la suite, les facteurs Sir3p, Sir2p et Sir4p ainsi que les antagonistes Rif1p et Rif2p sont recrutés par la protéine Rap1p localisée aux télomères. Pour appuyer cette idée, certaines expériences ont démontré que Rap1p est capable de se lier directement aux protéines Sir3p et Sir4p (Moretti *et al.*, 1994). De plus, ces trois protéines co-immunolocalisent aux télomères et régions subtélomériques. D'autre part, il est admis que Rif1p et Rif2p s'associent directement à Rap1p (Wotton *et al.*, 1997). Cette haute concentration de facteurs favorise la mise en place d'un état silencieux et stable de la chromatine. Cette structure stabilisée peut maintenant se lier à la portion N-terminale des histones H3 et H4 en formant un pont via les protéines Sir3p et Sir4p du complexe. La liaison subséquente de ces deux protéines aux histones adjacentes permettra la propagation de ces facteurs silencieux le long des nucléosomes, provoquant ainsi une répression transcriptionnelle des gènes situés à proximité.



**Figure 3.** Modèle expliquant la répression transcriptionnelle aux télomères. Rap1p se lie aux séquences télomériques et recrute les facteurs Sir3p, Sir2p et Sir4p ainsi que les antagonistes Rif1p et Rif2p à cet endroit. Cette haute concentration de facteurs favorise la mise en place d'un état silencieux et stable de la chromatine. Cette structure stabilisée peut maintenant se lier à la portion N-terminale des histones H3 et H4 en formant un pont via les protéines Sir3p et Sir4p du complexe. La liaison subséquente de ces deux protéines aux histones adjacentes permettra la propagation de ces facteurs silencieux le long des nucléosomes, provoquant ainsi une répression transcriptionnelle des gènes situés à proximité. Les régions télomériques réprimées se situent à la périphérie du noyau où une interaction pourrait s'effectuer grâce à Sir4p, car ce dernier possède des séquences similaires aux lamines nucléaires (Diffley et Sillman, 1989) (inspiré de Lustig, 1998 ; Hecht *et al.*, 1995).

#### 4.2.4. RÉPRESSION AUX LOCI *HM*

##### 4.2.4.1 Rôle des loci *HM* dans la détermination du sexe chez la levure

Chez la levure, la conjugaison permet à deux cellules haploïdes de type sexuel différent (a et alpha) de pouvoir former une cellule diploïde lorsqu'elles sont à proximité. Certains gènes comme le locus *MAT* et loci *HM* vont jouer un rôle dans la détermination du sexe. En effet, c'est dans le locus *MAT* qu'est exprimé le type sexuel a ou  $\alpha$  tandis que les loci *HM* sont responsables de la détermination de ces facteurs. Cette détermination implique la transposition de la cassette de conjugaison a ou alpha du locus inactif *HML/HMR*, vers le locus actif *MAT* (voir Figure 4). Cette transposition n'intervient que dans les souches possédant l'endonucléase HO (souche HO), enzyme qui participe à la transposition des cassettes silencieuses. Cette répression des loci *HM* est assurée par des processus semblables à ceux retrouvés lors de la répression transcriptionnelle aux télomères.

##### 4.2.4.2. Caractéristiques de la répression aux loci *HM*

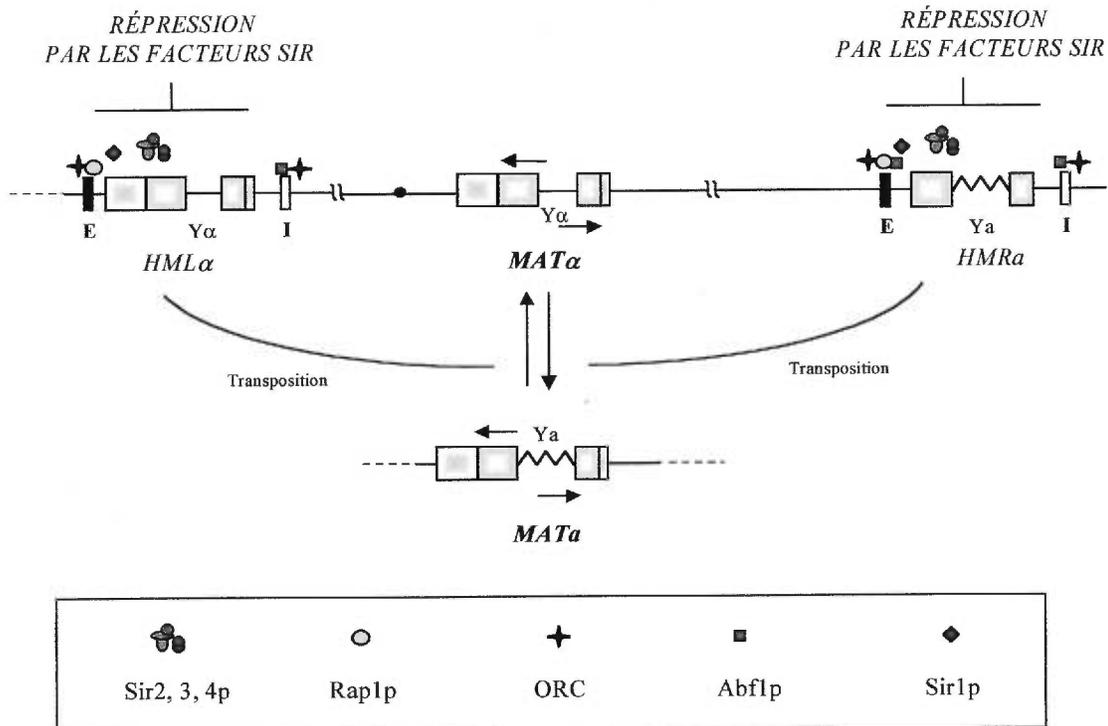
Contrairement au TPE, la répression transcriptionnelle retrouvée aux loci *HM* est extrêmement stable et ne subira pas de dérèglement transitoire spontanée (Rine *et al.*, 1987). De plus, les séquences télomériques servant à recruter les facteurs sont ici remplacées par des cassettes silencieuses, nommées *silencers*, situées à proximité des loci *HML* et *HMR*. En effet, on peut observer la présence du *silencer* E, situé à gauche de la séquence codante pour le facteur a/ $\alpha$ , ainsi que le *silencer* I situé à droite de cette séquence (voir Figure 4). Par ailleurs, beaucoup de gènes requis pour le TPE le seront également pour la répression aux loci *HM* (Rine *et al.*, 1987). Ces gènes comprennent entre autre les protéines Sir2p, Sir3p, Sir4p et Rap1p. Pour leur part, d'autres facteurs comme Sir1p et Abf1p se retrouveront spécifiquement

à cet endroit. *SIR1* est un élément essentiel à la répression stable des loci *HM*. En effet, la délétion de ce gène entraîne un relâchement du niveau de répression normalement observé (Pillus *et al.*, 1989). Cette baisse de répression se rapproche du niveau de répression transcriptionnelle retrouvée aux télomères. De plus, lorsque la protéine Sir1p est dirigée artificiellement aux télomères, la répression s'accroît à un niveau comparable à celui rencontré aux loci *HM* (Chien *et al.*, 1993). Ces observations pourraient d'ailleurs expliquer la différence du niveau de répression transcriptionnelle observée entre les télomères et loci *HM*.

#### 4.2.4.3. Mécanisme de répression

La présence des *silencers* E et I permettent le recrutement de certains facteurs comme Rap1p, Abf1p et Orc1p aux loci *HML* et *HMR* (Voir Figure 4). Ces *silencers* possèdent des capacités différentes de lier ces divers facteurs (Laurenson et Rine, 1992). Rap1p, liée aux cassettes silencieuses, permet alors de recruter les facteurs Sir3p, Sir4p et éventuellement Sir2p pour assembler le complexe de répression transcriptionnelle (Moretti *et al.*, 1994). Sir1p est également un autre élément qui est essentiel à la répression stable des loci *HM*. Il est recruté au *silencer* E, mais ne le fait pas directement et nécessite donc l'interaction avec d'autres protéines déjà situées à cet endroit. Cette interaction pourrait s'effectuer via Orc1p ou Sir4p, puisque Rap1p se lie directement à ces deux éléments (Triolo *et al.*, 1996). Par ailleurs, il est important de mentionner que les deux *silencers* doivent absolument être présents afin d'enclencher le mécanisme de répression, à moins de pouvoir y diriger les facteurs nécessaires à cette fin. En effet, Sir1p ne nécessite plus le *silencer* E pour effectuer sa fonction s'il est artificiellement dirigé à cet endroit (Chien *et al.*, 1993). La répression aux loci *HM* implique donc la participation des séquences en *cis* nommées *silencers*, la présence de facteurs similaires à ceux retrouvés aux télomères, mais

également des facteurs comme Sir1p qui renforcent cette répression transcriptionnelle.

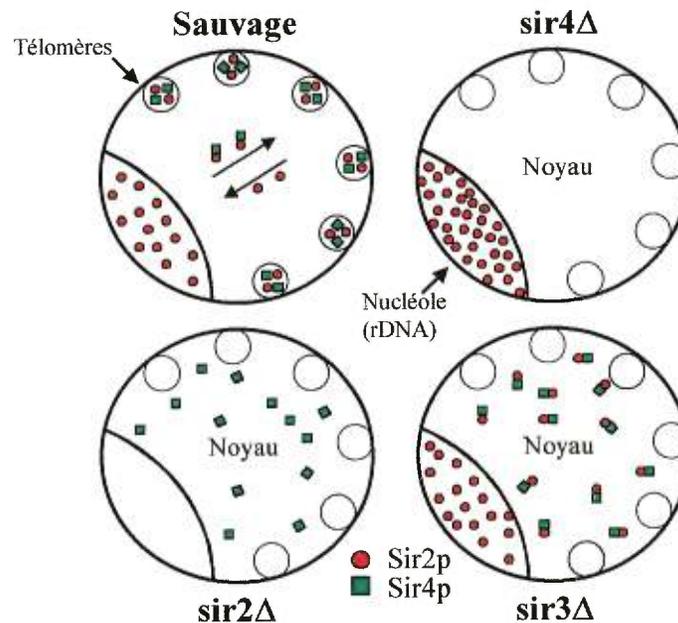


**Figure 4.** Représentation des loci *HMR* et *HML* et phénomène de répression transcriptionnelle retrouvés à cet endroit. Le locus *MAT* exprime l'un ou l'autre des facteurs  $\alpha$  et  $a$ , information retrouvée dans les éléments  $Y\alpha/Ya$  des cassettes *HML* et *HMR* qui sont sujets à la répression transcriptionnelle. L'interconversion des facteurs s'effectue par transposition des cassettes inactives vers la région active *MAT*. Pour leurs parts, les loci *HM* sont réprimés transcriptionnellement grâce au recrutement d'un complexe protéique composé de Rap1p, Abf1p, Orc1p et des quatre protéines Sirp aux cassettes silencieuses E et I. Sir1p est un élément clé favorisant une répression stable de la région. Une fois la répression établie, les gènes *HML* et *HMR* vont être sujet à une répression transcriptionnelle similaire à celle retrouvée aux télomères (inspiré de Ivy *et al.*, 1985; Stone et Pillus, 1998).

#### 4.2.5. RÉPRESSION AU rDNA

Une nouvelle forme de répression transcriptionnelle a récemment été observée dans la région nucléolaire correspondant à l'ADN ribosomal. Cette région est constituée de 100 à 200 copies d'unités de 9 kb organisées en tandem sur le chromosome XII (Petes et Botstein, 1997). Chacune des unités est composée de gènes codant pour les précurseurs de la sous-unité 5S et 35S de l'ARN ribosomal. L'assemblage des ribosomes s'effectue donc au nucléole, ce dernier étant une structure distincte en forme de demi-lune située dans le noyau chez la levure (revue par Melese et Xue, 1995). Pour confirmer la présence d'une telle répression, il a été observé que l'expression de gènes rapporteurs intégrés au niveau du rDNA était réprimée (Smith et Boeke, 1997). Ce phénomène de répression s'effectue différemment de la répression transcriptionnelle retrouvée aux télomères et loci *HM*. En effet, Sir3p qui semble nécessaire à la formation de l'hétérochromatine aux télomères (Hecht *et al.*, 1995, 1996), n'est pas retrouvée au niveau des complexes de répression transcriptionnelle au rDNA, soulignant ainsi la différence entre les complexes impliqués au rDNA de ceux agissant aux télomères/loci *HM*.

De plus, de tous les facteurs régulant la répression transcriptionnelle aux télomères et loci *HM*, seuls les facteurs Sir2p et Sir4p semblent avoir une implication au niveau de la répression transcriptionnelle au rDNA. Il a d'abord été observé qu'un mutant *sir2* présente un fort taux de recombinaison au rDNA (Gottlieb et Esposito, 1989). Des évidences plus directes ont également démontré que Sir2p réduit l'accessibilité de la chromatine du rDNA par les nucléases (Fritze *et al.*, 1997). D'autre part, une grande quantité de Sir2p se retrouve localisée à certains endroits du nucléole, où la protéine est préférentiellement associée au rDNA (Gotta *et al.*, 1997). Ces dernières observations suggèrent donc que Sir2p puisse être impliqué dans la modulation de la structure de la chromatine au rDNA.



**Figure 5.** Modèle spéculatif de la répression transcriptionnelle au rDNA. La force de la répression est proportionnelle à la quantité de Sir2p localisé au nucléole et est modulée par Sir4p. La localisation de Sir2p et Sir4p est représentée dans la souche sauvage, *sir4Δ*, *sir2Δ* et *sir3Δ*. Sir2p est normalement retrouvée au nucléole et aux télomères (Gotta *et al.*, 1997). Pour sa part, *sir4Δ* cause une redistribution de Sir2p au nucléole, ce qui accentue la répression au rDNA. *sir3Δ* provoque une localisation diffuse de Sir4p au noyau tout en redistribuant une légère quantité de Sir2p au nucléole. Enfin, *sir2Δ* mène à une élimination complète de la répression au rDNA (inspiré de Smith *et al.*, 1998).

La régulation de la répression transcriptionnelle au rDNA impliquerait donc la participation de *SIR2* et *SIR4* (voir Figure 5). En effet, Sir2p semble être un élément limitant

pour la répression puisque la force de cette répression est proportionnelle à la concentration de Sir2p présent (Smith *et al.*, 1998). Pour sa part, la surexpression de *SIR4* provoque une réduction du niveau de répression observé (Smith *et al.*, 1998) alors que la délétion de ce gène entraîne plutôt un accroissement de cette répression (Smith et Boeke, 1997). Le modèle propose donc que la régulation de la répression transcriptionnelle au rDNA dépende de la quantité de Sir2p disponible au nucléole. Ce phénomène serait contrôlé par la séquestration de Sir2p aux télomères via une interaction avec Sir4p.

#### **4.2.6. MODÈLES EXPLIQUANT LES DIVERS NIVEAUX DE RÉPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE TYPE "SILENCING"**

Le niveau de répression transcriptionnelle est variable entre les différents loci démontrant une telle propriété. En effet, il existe une hiérarchie entre les loci *HM*, qui exercent la plus forte répression, suivi des télomères et ensuite du rDNA. L'efficacité de cette répression transcriptionnelle serait contrôlée par la capacité des facteurs agissant en *trans* à interagir avec les séquences en *cis* afin d'établir ou de maintenir un état stable de répression. La question reste à savoir comment cette efficacité variable de répression transcriptionnelle est déterminée à l'intérieur de la cellule. Deux principaux modèles tentent d'y répondre. D'une part, il existerait une compétition entre les différents loci pour un pool limité de facteurs communs. Le meilleur exemple concerne une compétition observée entre les loci *HM* et les télomères pour le recrutement du facteur Rap1p. En effet, l'allongement des télomères provoque une diminution de la répression transcriptionnelle aux loci *HM* au profit d'un renforcement au niveau des télomères. Cette observation suggère qu'une plus grande quantité de Rap1, et par conséquent de Sir3p/Sir4p, se lie aux télomères, ce qui diminue la probabilité

d'en retrouver aux loci *HM* (Buck et Shore, 1995). D'autres études ont également démontré que la surproduction de Sir1p semble séquestrer des facteurs requis aux télomères (Sadowski, 1995).

Dans le même ordre d'idées, les télomères pourraient agir comme pool de facteurs impliqués dans la répression transcriptionnelle, limitant ainsi l'accès de ces derniers aux autres loci dans la cellule. Comme il a été mentionné précédemment, la régulation de la répression transcriptionnelle au rDNA pourrait s'expliquer par ce phénomène, impliquant une compétition pour le facteur Sir2p. Ces observations démontrent donc que la capacité et la force d'initier la répression transcriptionnelle à un endroit précis est un phénomène crucial. D'autres expériences supportent cette idée. D'une part, l'introduction de multiples sites liant Rap1p près du locus *MATa* provoque une répression à cet endroit qui est normalement actif au niveau transcriptionnel. De plus, lorsque Sir3p et Sir4p sont recrutés artificiellement aux télomères, le facteur Rap1p n'est plus nécessaire (Lustig *et al.*, 1996; Marcand *et al.*, 1996). Enfin, la surexpression de *SIR4* restaure la répression aux loci *HM* dans un environnement *rap1* (Sussel et Shore, 1991) tandis qu'une quantité accrue de *SIR3* annule certains défauts de répression transcriptionnelle aux télomères observés chez un mutant *rap1* (Liu *et al.*, 1994).

D'autre part, l'autre modèle propose l'existence de facteurs qui agiraient spécifiquement aux différents loci où l'on observe de la répression transcriptionnelle (voir Tableau III). Sir1p est l'un de ces facteurs retrouvés uniquement aux loci *HM*. Même si ce dernier permet l'augmentation de la répression aux télomères s'il est dirigé à cet endroit, on ne retrouve pas de Sir1p de façon normale à ce locus (Chien *et al.*, 1993). Sir1p ne semble pas non plus agir au rDNA (Smith et Boeke, 1997). D'autres facteurs agissent également de façon

spécifique. Ces facteurs incluent entre autre *ABF1* aux loci *HM* (Chien *et al.*, 1993), *TLC1* et *EST2* aux télomères (Singer et Gottschling, 1994) et la participation spéciale de *SIR2* au rDNA (Smith et Boeke, 1997), sans oublier les gènes *SAS* (Reifsnyder *et al.*, 1996). Une liste plus complète est présentée au Tableau III. Les deux modèles présentés ici ne sont pas mutuellement exclusifs. Il est fort probable que l'efficacité de la répression transcriptionnelle est acquise par la combinaison d'une compétition pour des facteurs communs ainsi que la présence de facteurs spécifiques.

Enfin, cette efficacité de répression est un critère important lorsqu'il est question de l'établissement de la répression transcriptionnelle. En effet, le phénomène de "silencing" peut être séparé en trois étapes distinctes : l'établissement (formation d'un état réprimé de la chromatine), le maintien (stabilité de l'état fermé de la chromatine) et le suivi de la répression transcriptionnelle (stabilité de la répression de générations en générations). Certains éléments sont impliqués spécifiquement dans l'une ou l'autre de ces étapes. Par exemple, les *silencers* retrouvés aux loci *HM* semblent impliqués dans l'établissement (recrutement de facteurs) ainsi que dans le suivi (Holmes *et al.*, 1996). Ces conclusions ont été tirées suite à l'élimination de ces *silencers* par recombinaison. Utilisant ce système, des expériences ont démontré que les cellules qui sont déjà dans un état de répression conservent cet état. Toutefois, la répression était perdue lorsque la cellule passait à un cycle cellulaire subséquent, ce qui indique l'importance des *silencers* pour perpétuer la répression de générations en générations. Malgré le fait que l'initiation et le suivi de la répression transcriptionnelle soient des phénomènes que l'on relie spontanément, certaines protéines incluant Sir1p, Orc2p et Sas2p agissent de façon prédominante dans l'établissement de la répression (Reifsnyder *et al.*, 1996; Ehrenhofer-

Murray, 1995; Pillus et Rine, 1989) alors que d'autres éléments comme CAF-1 jouent plutôt un rôle essentiellement au niveau du maintien et du suivi (Monson *et al.*, 1997).

Certaines données nous portent à croire que la voie *GSP1/PRP20* serait impliquée dans le processus de répression transcriptionnelle chez *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, notre laboratoire a récemment découvert une interaction *in vivo* et *in vitro* entre Gsp1p et Sir4p, ce qui supporte fortement cette idée (Clément et Belhumeur, manuscrit en préparation). Il existe également certaines similitudes au niveau des phénotypes observés entre la voie *GSP1/PRP20* et le phénomène de répression transcriptionnelle, en ce qui concerne entre autres la stabilité chromosomique (voir section 4.1.5). Cette nouvelle association nous a donc menés à investiguer de façon plus approfondie la façon dont *GSP1/PRP20* ainsi que les composantes assurant la régulation de son état de liaison (*PRP20*, *RNA1*, *YRB1*) pouvaient intervenir dans ce processus de répression transcriptionnelle. Afin de répondre à cette interrogation, nous avons utilisé des souches de levures qui possèdent le gène rapporteur *URA3* situé à proximité d'un des trois domaines réprimés transcriptionnellement (télomères, loci *HM* ou rDNA). A l'état normal, ce gène *URA3* est sujet à la répression transcriptionnelle. Il peut toutefois se retrouver activement transcrit si la surexpression de certains facteurs vient perturber le système. En effet, il est reconnu que la surexpression de Sir4p mène à une dérégulation transcriptionnelle aux télomères (Singer and Gottschling, 1994), probablement parce qu'il déstabilise les complexes nécessaires à la répression transcriptionnelle. Dans le but de vérifier si *GSP1* ou l'une des composantes impliquées dans la régulation de son état de liaison possèdent une telle propriété, nous avons surexprimé ces éléments dans les différentes souches décrites ci-haut et avons ensuite vérifié le niveau d'expression du gène rapporteur *URA3*.

**ARTICLE**

**Impact de la surexpression des éléments composant la voie *GSP1/PRP20* sur le  
"silencing" transcriptionnel chez *Saccharomyces cerevisiae***

**Résumé de l'article**

La protéine Gsp1p est une petite GTPase nucléaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* impliquée dans plusieurs processus nucléaires, incluant entre autres le transport nucléocytoplasmique des protéines et ARNs, l'intégrité du matériel génétique et le contrôle du cycle cellulaire. La similitude de certains phénotypes observés entre la voie *GSP1/PRP20* et le phénomène de "silencing" transcriptionnel nous a menés à nous interroger sur la façon dont ces deux éléments pouvaient être reliés. La répression transcriptionnelle de type "silencing" est un processus de régulation important chez la levure qui est observée à trois sites différents dans la cellule : au niveau des télomères, aux loci *HM* (*Mating type locus*) ainsi qu'au rDNA.

Afin de déterminer le rôle de la voie *GSP1/PRP20* au niveau de la répression transcriptionnelle de type "silencing", nous avons utilisé des souches de levures qui possèdent un gène rapporteur *URA3* intégré aux différentes régions réprimées transcriptionnellement. Dans ces souches, nous avons surexprimé Gsp1p ainsi que les différentes protéines assurant la régulation de son état de liaison en GDP/GTP, soit Rna1p, Prp20p et Yrb1p et ensuite évalué dans quelle mesure ces changements affectaient l'expression du gène *URA3*. L'expression de ce gène rapporteur indique la capacité des éléments surexprimés à interférer avec les processus de répression transcriptionnelle. Les résultats démontrent qu'une haute concentration de Prp20p, qui se doit d'être pleinement

fonctionnel, mène à une forte dérépression transcriptionnelle aux télomères, suggérant ainsi que l'état Gsp1p-GTP pourrait être un élément de régulation important à ce niveau. Pour sa part, la surexpression de Yrb1p démontre un effet contraire entre le niveau de dérépression retrouvé aux télomères et au rDNA. Il est alors possible que ce facteur soit relocalisé des télomères au rDNA ou mène à la relocalisation d'un autre facteur suite à sa surexpression dans la cellule.

**Impact of the overexpression of the *GSP1/PRP20* pathway components  
on silencing function in *Saccharomyces cerevisiae*.**

Francis Deshaies and Pierre Belhumeur \*

Department of Microbiology and Immunology

Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. Centre-Ville

Montréal, Québec H3C 3J7 Canada

\* Correspondence to:

Dr. Pierre Belhumeur

(same address as above)

Telephone: (514) 343-5639

FAX: (514) 343-5701

e-mail: pierre.belhumeur@umontreal.ca

## 5.1 ABSTRACT

Gsp1p is a small nuclear GTPase in *Saccharomyces cerevisiae* that is implicated in several nuclear processes including nucleocytoplasmic transport of macromolecules, maintenance of nuclear structure and control of cell cycle progression. In order to investigate a novel function of the *GSP1/PRP20* pathway on silencing phenomenon, we used yeast strains in which increase gene dosage of Gsp1p and its regulators Prp20p, Rna1p and Yrb1p affected the expression of a silenced reporter *URA3* located at specific silent loci. These domains include telomeres, mating-type and rDNA silenced regions. In our assays, each element of the *GSP1/PRP20* pathway seemed to derepresses telomere silencing at different level, while it did not affect significantly the mating type locus. Overexpression of Prp20p, which needs to be fully functional for proper effect, has shown the strongest phenotype on telomeres silencing derepression. On the other hand, higher amount of Yrb1p caused increased rDNA silencing. These results suggest an implication of the *GSP1/PRP20* pathway in the *S. cerevisiae* silencing phenomenon and a new role for Yrb1p at the rDNA locus.

## 5.2. INTRODUCTION

Gsp1p is an abundant nuclear-located GTPase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Belhumeur *et al.*, 1993). The relative abundance of GDP- and GTP-bound form is regulated by Rna1p, acting as a GTPase-Activating Protein (GAP), and Prp20p known as its exchange factor (GEF) (Atkinson *et al.*, 1985; Clark *et al.*, 1989; Vijayraghavan, 1989; Kadowaki *et al.*, 1992). An additional level of regulation involves the protein Yrb1p, a protein binding to the GTPase in its GTP-bound form and acting as co-activator of GAP function (Lounsbury *et al.*, 1994; Schlenstedt *et al.*, 1995). Gsp1p and its mammalian homologue Ran have been implicated in several nuclear functions, including nucleocytoplasmic trafficking of protein and RNA, processing of mRNA, control of mitosis, cell cycle coordination, assembly of a functional nucleus, DNA replication and chromosome stability (Avis and Clarke, 1996; Rush *et al.*, 1996; Sazer, 1996).

Among these phenotypes, involvement of Gsp1p in the protein import to the nucleus is probably the best documented one (Melchior *et al.*, 1993; Moore and Blobel, 1993). However, while a number of phenotypes observed with mutants of the *GSP1/PRP20* pathway could be explained by a general defect in nucleocytoplasmic trafficking of macromolecules, some of these mutant phenotypes along with Gsp1-interacting proteins suggest there might be additional functions to this pathway. For instance, a mutant of Ran locked in its GDP-bound form inhibits the activation of the maturation promoting factor (MPF) in *Xenopus* eggs extract, even in absence of nuclei (Kornbluth, 1994; Clarke *et al.*, 1995), indicating that this phenotype can't be explained by

defective nuclear trafficking of macromolecules. Furthermore, premature initiation of mitosis caused by loss of RCC1 (mammalian homologue of PRP20) can be prevented by GTP $\gamma$ S-bound Ran which blocks the nucleocytoplasmic transport of proteins (Melchior *et al.*, 1993). In addition, a novel function of Ran in centrosome regulation has been recently established by its interaction with RanBPM, a protein involved in microtubules nucleation (Masafumi *et al.*, 1998). In other respects, overexpression of Ran or RanBP1 (YRB1 mammalian homologue) increases rate of chromosomal loss and nondisjunction (Ouspenski *et al.*, 1995). *Srm1-1* mutant (allele of *PRP20*) also exhibits reduced plasmid and chromosome stability (Clark *et al.*, 1991). Some of these phenotypes are shared by other processes in the cell. For instance, deletion of *RIF1* and *RIF2*, which are implicated in telomere length, and hyperactivation of the silencing proteins Sir2p and Sir3p causes chromosome loss (Holmes *et al.*, 1997; Wotton *et al.*, 1997). The timing of establishment of silencing has also been observed in S phase, coincident with DNA replication (Miller and Nasmyth, 1984). Thus, common phenotypes found between silencing and *GSP1/PRP20* pathway raises the question whether these two mechanisms can be linked.

Silencing is an important mechanism of gene regulation in which an altered chromatin structure lead to transcriptional repression of large regions of the genome. This process of position-dependent effects occurs in many organisms, from pilus formation in *E. coli* (Russo *et al.*, 1996), to position effect variegation in *Drosophila* (Henikoff, 1992) and X chromosome inactivation observed in female mammals (reviewed in Henikoff *et al.*, 1996). In yeast, transcriptional silencing is a well-studied epigenetic phenomenon found in several distinct domains, where accessibility of chromosomal domain to DNA-modifying

enzymes is significantly reduced (reviewed in Thompson *et al.*, 1993). These include the silent mating-type loci (*HML* and *HMR*) and the variegation expression of genes placed near telomeric sequences. In addition to these regions, certain genes reporter within rDNA also seem to be silenced (Bryk *et al.*, 1997; Smith and Boeke, 1997), whereas mechanisms and components accounting for silencing at this locus are the least characterized.

*Cis*-acting silencers, composed of binding sites for silencing factors, and *trans*-acting factors are required for both telomeric and mating type silencing. These factors include Rap1p, the silent information regulators (Sir2p,3,4) and the N-termini of histone H3 and H4 (Ivy *et al.*, 1986; Aparicio *et al.*, 1991; Sussel and Shore, 1991; Thompson *et al.*, 1994). Many experiments confirm that these proteins interact to form a complex *in vivo*. Sir2p, Sir3p, Sir4p, histones and Rap1p coimmunoprecipitate with subtelomeric regions (Hecht *et al.*, 1996; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997). Immunostaining experiments has demonstrated a colocalization of Rap1, Sir3p and Sir4p at telomeres (Gotta *et al.*, 1996). Furthermore, *in vitro* and two hybrids experiments have revealed interaction between Sir2p-Sir3p, Sir2p-Sir4p, Sir3p-Sir4p and proteins Sir3p/Sir4p with Rap1p (Moazed *et al.*, 1997; Triolo *et al.*, 1996; Moretti *et al.*, 1994). A number of modifying proteins can also modulate transcriptional repression. Ubiquitination, acetylation and phosphorylation are all mechanisms believed to influence silencing function in *S. cerevisiae* (reviewed in Lustig, 1998). It is likely that many different processes may play a role in establishment, maintenance or heritability of silencing.

In order to determine a novel implication of *GSP1/PRP20* pathway in silencing function, we have used a silencing assay where we could evaluate the reactivation of a silenced reporter gene located at specific silent loci caused by increased gene dosage of *GSP1* or its regulators, *PRP20*, *RNA1* and *YRB1*. We show that *PRP20* has the strongest effect on telomeric silencing, while *YRB1* is affecting both telomeres and rDNA locus in an opposite manner. We propose that Gsp1p-GTP could be an important element implicated in telomeres silencing. We also suggest that Yrb1p could itself shuttle or mediate the shuttling of another factor between the telomeres and nucleolus to perform its silencing function

### 5.3. Materials and methods

#### Strains and media

The yeast strains used in this study were UCC3505 (MATa *ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ppr1::HIS3 adh4::URA3-TEL*) and UCC3515 (MATα *lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ura3-52 hml::URA3*), both described in Singer and Gottschling (1994) and kindly provided by R. Wellinger. Another strain used was JS128 (MATα *his3Δ200 leu2Δ1 ura3-167 RDN1::Ty1-mURA3*), described in Smith and Boeke (1997) and kindly provided by J. Boeke. Bacterial and yeast media were prepared as described previously (Belhumeur *et al.*, 1993). Silencing assay induction medium consisted of SD supplemented with 2% galactose and 0.1% 5-FOA with appropriate amino acids added (Sikorski and Boeke, 1991). Drop Out medium was prepared as described by Adams *et al.* (1997). Finally, DOΔP was prepared as described by Haguenaer-Tsapis and Hinnen (1986).

#### Plasmid constructions

Plasmids used in this work were: pRS315 (CEN, *LEU2*) and pRS316 (CEN, *URA3*; Sikorski and Hieter, 1989); YEp352 (2μ, *URA3*; Hill *et al.*, 1986); pRS424 (2μ, *TRP1*) and pRS425 (2μ, *LEU2*; Christianson *et al.*, 1992); YCpIF16 (CEN, *TRP1*, GAL; Foreman and Davis, 1994) and p414GAL (CEN, *TRP1*, GAL; Funk, 1994). Overexpression of *SIR4* was achieved by using pTRP61 (Singer and Gottschling, 1994), kindly provided by D.E. Gottschling. We have obtained the gene *YRB1* (pIL33) from I. Ouspenski (Ouspenski *et al.*, 1995) and the gene *RNAI* (YEp24-RNA1) has been kindly provided by A. Hopper

(Atkinson *et al.*, 1985). The *SIR2* gene on a multicopy plasmid, pSIR2 $\mu$  (Smith and Boeke, 1997), was kindly provided by J. Boeke. The plasmid pS199 derives from pRS315 where a EcoRI/BamHI GAL1 promotor fragment was cloned (C. Boone). Finally, the plasmid used to mutagenize *PRP20* is pDR1 (Razaka *et al.*, 1994), kindly provided by J. Velours.

An EcoRI site was introduced prior to the ATG codon of the *PRP20* gene (5'-GAA TTC ATG-3'), which lead to plasmid pBS-*PRP20*nterm by insertion of a 1kb EcoRI/BamHI cut fragment into SKII+ pBluescript vector (Stratagene) cut with the same enzymes. To construct YCpIF16/*PRP20*, a 600bp fragment from pBS-*PRP20*nterm digested EcoRI/NcoI along with a 2kb fragment generated by excision of YEp352/*PRP20* (Fleischmann *et al.*, 1991) with EcoRI/NcoI (C-terminal region of *PRP20*), were cloned in YCpIF16 vector cut with EcoRI. Resultant plasmid was digested with ApaI/SacI enzymes and the generated 3.1 kb was inserted in pRS315 vector digested with the same enzymes, forming pRS315/GAL::*PRP20*.

p414GAL/GSP1 was constructed from plasmid pRS316/GSP1 (Belhumeur *et al.*, 1993) cut with internal site ClaI and vector site HindIII, generating a 730 pb fragment, blunt-ended and cloned into the SmaI site of p414GAL vector. The same blunt-ended GSP1 fragment was inserted into pS199 vector BamHI cut/blunted, forming pS199/GSP1. Each pKB(x) plasmid bearing *PRP20* mutation (Lee *et al.*, 1994) was digested with MluI/SacI, generating a 2.5 kb fragment, and subcloned into pBS-*PRP20*nterm cut with the same enzymes, forming pBS-*prp20*(1-11). Digestion of those plasmids with EcoRI/SacI leaded to 2.6 kb fragments that were inserted into EcoRI/SacI cut YCpIF16, creating

YCpIF16/*prp20*(1-11). Each plasmid contains the following mutation : YCpIF16/*prp20*(1):  $\Delta$ 147-162, YCpIF16/*prp20*(2):  $\Delta$ 128-162, YCpIF16/*prp20*(3): G92D, YCpIF16/*prp20*(4): W418R, YCpIF16/*prp20*(5): H405D, YCpIF16/*prp20*(6): G117D, YCpIF16/*prp20*(7): S22A/K23R, YCpIF16/*prp20*(8): D128-146, YCpIF16/*prp20*(9): G402D, YCpIF16/*prp20*(10): D470-482, YCpIF16/*prp20*(11): G402D, YCpIF16/*prp20*(12): S55A/S182A/T373A.

pRS424-RNA1 was constructed by digestion of Yep24-RNA1 with Ecl136II, generating a 2.2 kb fragment that was cloned into pRS424 vector cut with the same enzyme. pRS425-RNA1 was cloned using the same strategy, but using pRS425 vector. pRS424-YRB1 was created using a EcoRI 1.4 kb fragment from pIL33, blunt-ended and then inserted into Ecl136II cut pRS424. The same YRB1 fragment was also cloned into pRS425 Ecl36II site.

### **Protein extraction and immunoblotting**

After transformation of plasmid YCpIF16/*prp20*(1-6) mutants into UCC3505 strain, transformants were grown to saturation in 10 ml of SD-TRP medium containing 2% raffinose. Cells were diluted in fresh medium to an  $A_{600}$  of  $\sim$ 0.2 and grown to an  $A_{600}$  of  $\sim$ 0.6. Galactose was then added (4% final) and induction was for 4 hours. Harvested cells were lysed using glassbead method (Harrow and Lane 1988). 50 $\mu$ g of total protein extract were resuspended in 5X Laemmli buffer, boiled for 5 min and loaded on a 10 % SDS-PAGE. Gel was electroblotted to a nitrocellulose membrane at 100 mA for 1 hour. Membrane was then blocked overnight with 20 ml of blocking solution (10mM Tris pH

7.5, 150mM NaCl, 2% milk), then incubated with mouse anti-HA antibody 12CA5 (1:2000) for 1hr at room temperature. Secondary antibody (anti-mouse conjugated to alkaline phosphatase; Gibco BRL) was used at 1 :5000 dilution for 1hr at room temperature as well. Each wash was done in 20 ml of TBS (10mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl) for 10 minutes. Membrane was then developed with NBT/BCIP in alkaline phosphatase buffer (100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5).

### **Site-directed mutagenesis**

Site-directed mutagenesis on PRP20 was performed with mutagenic primers P108-S55A: 5'-GCTCACACATAGCACCAGTACCCCAG-3', P109-S182A: 5'-GTATA-CCTCGCCATTGGCGAAACAGGGCGCAAC-3', P-110-T373A: 5'-CATCTTTGTAAGC-ATATTCGGGTAAATTG-3' and using the U.S.E. Mutagenesis Kit from Pharmacia/Biotech. pDR1/PRP20 plasmid was generated as follow : a 2.9 kb XhoI/EcoRI fragment from YEp352/PRP20 was cloned in pDR1. Mutagenesis was performed as described by the manufacturer to generate a double mutant pDR1-prp20(S55A/S182A) and a single mutant pDR1-prp20(T373A). Single mutant was transferred into SKII+ pBluescript vector by cloning a 2.1kb fragment generated by MluI/XbaI digestion from pDR1-prp20(T373A) into MluI/XbaI cut pBS-PRP20-nterm. YCpIF16/prp20(S55A/S182A/T373A) was constructed using 600bp fragment from pDR1-prp20(S55A/S182A) cut with EcoRI/NcoI enzymes and 2 kb NcoI-SacI fragment from pBS-prp20(T373A) into SacI-EcoRI sites of YCpIF16.

### **In vivo labelling of yeast cells**

For  $^{35}\text{S}$  *in vivo* labelling experiments, cells were grown to mid-exponential phase in Drop Out medium (DO). For  $^{32}\text{P}$ -labelling, inorganic phosphate was depleted from DO medium resulting in DO $\Delta$ P medium. Cells were also grown to mid-exponential phase in DO $\Delta$ P medium. Galactose was then added (4% final) and induction was for 2 hours.  $5 \times 10^7$  cells were then resuspended in 1 ml of fresh minimal medium containing galactose as well. Radiolabelling of proteins was performed by adding 150  $\mu\text{Ci}$  of TRAN- $^{35}\text{S}$  label (ICN,  $>1000\text{Ci/mmol}$ ) or 250  $\mu\text{Ci}$  of  $^{32}\text{P}$  labelled orthophosphate (Amersham, PBS.13A) to cells and shaking for 1h15 at  $30^\circ\text{C}$ .

### **Immunoprecipitation of Prp20**

Cells labelled with  $^{35}\text{S}$  were harvested and resuspended in 200  $\mu\text{l}$  of TNE (50mM Tris [pH7.5], 150mM NaCl, 5mM EDTA) containing protease inhibitor PIN (1.7  $\mu\text{g/ml}$  PMSF, 2  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 2  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin, 2  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin). Cells were lysed using glassbead method (Harlow and Lane 1988) and 0.9 mL of IP buffer (1.1 % Triton X-100, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris [pH7.5], BSA [2mg/mL], PIN) was added. After addition of 5  $\mu\text{l}$  of 12CA5 anti-HA antibody (BAbCO), samples were incubated for 1h15 at  $4^\circ\text{C}$ . 100  $\mu\text{l}$  of protein-A sepharose beads in IP buffer was then added, followed by an incubation of 1h15 h at  $4^\circ\text{C}$ . Protein A beads were washed 3 times in 1 ml of wash buffer (0,1 % Triton X-100, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris [pH7.5], 0.05% SDS, PIN) and 2 times in TNE.

Cells labelled with  $^{32}\text{P}$  were harvested and resuspended in 200  $\mu\text{l}$  of BSB (10mM Na-Borate, 150mM NaCl, pH 8.0) containing PIN and 2mM Na Molybdate. Cells were lysed using glassbead method (Harlow and Lane 1988) and 1 mL of RXN buffer (1 % Triton X-100, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 50mM Tris [pH8.0], BSA [2mg/mL], 2mM Na Molybdate, PIN) was added. After addition of 5  $\mu\text{l}$  of 12CA5 anti-HA antibody, samples were incubated for 1h15 at 4°C. 100  $\mu\text{l}$  of protein-A sepharose beads in RXN buffer was then added, followed by an incubation of 1h15 at 4°C. Protein A beads were washed 5 times in 1 ml of  $^{32}\text{P}$  wash buffer (0,1 % Triton X-100, 150mM NaCl, 50mM Tris [pH8.0], PIN). Beads from  $^{35}\text{S}$  and  $^{32}\text{P}$  labelled extracts were resuspended in 50  $\mu\text{l}$  of Laemmli sample buffer and 30  $\mu\text{l}$  of samples loaded on a SDS-PAGE. After fixing gels,  $^{35}\text{S}$  part was treated with 1M Sodium salicylate for 1 hour, then gels were dried and exposed to a film.

## 5.4. RESULTS

**Gsp1 pathway is globally implicated in telomere silencing, while it doesn't affect significantly silencing at *HM* loci.**

To examine silencing at telomeres, we used the UCC3505 strain which contains a *URA3* reporter gene integrated next to telomeric sequences at the very end of the chromosome VII-L (Singer and Gottschling, 1994). Such gene located near telomeres is transcriptionally repressed, a phenomenon called telomere position effect (Gottschling *et al.*, 1990). This strain is also defective for the gene *PPR1* coding for *URA3* *trans*-activator, resulting in a tighter transcriptional repression of the reporter (Singer and Gottschling, 1994). Mating type silencing was tested using UCC3515 strain bearing the same *URA3* reporter integrated within the tightly silenced *HML* locus (Singer and Gottschling, 1994). *URA3* expression is monitored by using medium containing 5-FOA, which leads to lethality when *URA3* gene product is expressed. Increased gene dosage of silencing factors like Sir4p has previously been shown to causes transcriptional derepression at telomeres and *HM* loci using this system (Singer and Gottschling, 1994).

To test whether *GSP1/PRP20* pathway is implicated in telomeric/*HM* loci silencing, we generated plasmids in which *GSP1* and *PRP20* are driven by a GAL promotor. *RNAI* and *YRB1* were designed onto a 2 $\mu$  vector because overexpression of these genes from a GAL promotor causes toxicity (data not shown). The strength of silencing of the *URA3* reporter, as measured by survival on GAL 5-FOA medium, was tested using serial dilution growth assay for each gene overexpressed. As shown in Figure 1A, increased gene dosage

of *PRP20* and *YRB1* cause the strongest silencing derepression phenotype at telomeres, while *RNAI* and *GSP1* demonstrate just a slight effect. The *PRP20* effect is comparable to the *SIR4* overexpression, which serves as positive control to determine the efficiency of silencing derepression. Since lethality due to overexpression of the genes can not be detected on inductor medium (GAL) depleted from 5-FOA, our results should be specific to the *URA3* gene expression. Mating type silencing assay didn't show the same portrait as telomere silencing. As it can be seen in Figure 1B, *GSP1* is the only element giving a slight effect at *HML* locus. These observations suggest that the nucleotide bound state of *GSP1* is an important element for telomere silencing, while it doesn't seem to suffice to affect transcriptional repression at the mating type. In addition, the observation that *PRP20* shows a stronger effect than *RNAI*, we can propose that Gsp1p-GTP state is more critical than Gsp1p-GDP. This could be supported by the fact that Prp20p is located in the nucleus compared to Rna1p that is cytoplasmic.

### **High-copy YRB1 increases rDNA silencing**

The JS128 strain used to examine rDNA silencing carry *mURA3*-marked TY1 elements integrated within the rDNA. This marker is partially silenced when integrated within the rDNA tandem array but is fully expressed when located outside of the rDNA (Smith and Boeke, 1997). *mURA3* expression is monitored by using medium lacking uracil. To examine the role of *GSP1/PRP20* pathway on rDNA silencing, we designed plasmids similar to those used in telomere/mating type silencing assay (different selection marker). The strength of rDNA silencing, as measured by growth on -Ura medium, was tested using serial dilution growth assay. Results indicate that increased amount of Yrb1p led to

reinforcement of rDNA silencing (Figure 1C). Actually, YRB1 data are very similar to those obtained with overexpression of SIR2, which is known to strengthen rDNA silencing. (Smith *et al.*, 1998). No other genes implicated in the Gsp1p regulation exhibited such an effect on rDNA. Overexpression of Yrb1p seems to be implicated in telomere transcriptional repression as well as in rDNA silencing.

### **Proper balance of *GSP1/PRP20* is critical for telomeric silencing**

Silencing complexes are multicomponent structures and each one should be of crucial importance. For instance, disruption of *SIR3* delocalize Sir4p and vice versa (Gotta *et al.*, 1996). Moreover, increased amount of Sir3p C-terminus lead to derepression at the mating type locus, while overexpression of Sir4p results in a reduced level of silencing at both mating type and telomeres loci (Le *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 1987; Cockell *et al.*, 1995). In addition, increased amount of Sir1p and Sir4p restore repression at *HMR* locus in a *rap1* mutant (Sussel and Shore, 1991). These observations suggest that stoichiometry among proteins must be carefully balanced to form a functional multicomponent complex. If such mechanism occur for *GSP1/PRP20* pathway, one can propose that increased concentration of Gsp1p along with Prp20p should re-equilibrate the Prp20p/Gsp1p ratio and lead to restoration of the silencing function defect observed when Prp20p alone is overexpressed. In order to test this hypothesis, we used the same telomeric silencing assay as described previously. As it can be seen in Figure 2, co-overexpression of Prp20p and Gsp1p led to partial restoration of silencing function compared to increased dosage of Prp20p alone. Based on these results, we can propose that level of Gsp1-GTP is brought back nearby a normal state, which critical concentration is likely to influence directly or indirectly the integrity of the silencing complexes.

### **Fully functional PRP20 is required for proper effect on telomeric silencing**

Prp20 and all of the other RCC1 homologues share a unique structural feature, a repeated motif of ~40 amino acids containing predominantly aliphatic and glycine residues, which occurs seven times within the protein (Ohtsubo *et al.*, 1987; Aebi *et al.*, 1990; Renault *et al.*, 1998). Mutations among these repeats revealed that *PRP20* possess distinct activity domains (Lee *et al.*, 1994). Essential residues for *PRP20* function are located mainly in the second, third and last repeats. Carboxyl-terminal mutations also differ from amino-terminal, showing loss of dsDNA binding. We asked if some of these domains would be necessary in *PRP20* silencing function.

In order to address this question, we transformed different *prp20* mutants (described in Lee *et al.*, 1994) driven by GAL promoter into UCC3505 strain. As it can be seen in Figure 3A, our results show that some mutants exhibit the same phenotype as wild type *PRP20*, while other mutants lose their capacity to induce telomere derepression when they are overexpressed. Actually, second, third and seventh domain of the Prp20 protein seem critical to perform silencing function, since mutations within these regions abrogate silencing derepression phenotype (Figure 3A). These same mutations also lead to an incapacity to complement a *prp20* null mutant (Table 1). Taken together, these observations suggest that a fully functional Prp20p is essential to perform appropriate telomeres transcriptional repression. Furthermore, it was important to verify if loss of function induced by *prp20* mutants was due to increased protein instability. To address this question, we induced expression of each mutant in UCC3505 strain (as described in Materials and Methods) and detected Western blot expression levels of defective

HA-prp20p mutants. Results revealed no significant differences compared to wild type Prp20p (Figure 3B). Finally, we wanted to know if any prp20 mutants would lead to changes concerning mating type silencing. As suspected, no differences compared to wild type Prp20p were detected (Table 1).

### **Putative role of PRP20 phosphorylation in silencing**

In vivo labelling experiments previously revealed that Prp20p is a phosphoprotein (Fleishmann *et al.*, 1996). However, the way phosphorylation function influences *PRP20* regulation remain elusive. Phosphorylation is a type of protein modification that seem critical for silencing. Direct link between these two phenomenon has been established, since MAP-kinase cascade-dependent hyperphosphorylation of Sir3p increases telomeric silencing (Stone and Pillus, 1996). To test whether phosphorylation of Prp20p is an important element regulating its silencing function, site-directed mutagenesis of putative phosphorylation site was conducted. The choice of these sites was selected by comparing *S. cerevisiae* and *C. albicans* Prp20 protein (Fournier, Clément, DeRepentigny and Belhumeur, in preparation), assuming that conserved motif found between species would reflect important functional domains. Three conserved putative casein kinase II phosphorylation sites were detected and used for further investigation. Serine residue at position 55 and threonine at position 182 and 373 where all mutated to alanine.

This triple mutant was first tested for the complementation of a *prp20* null mutant and no loss of function has been observed (data not shown). Then, immunoprecipitation of HA-prp20p triple mutant has revealed no differences in protein phosphorylation state.

Actually, as it can be seen in Figure 4 (lane 3/5, lane 9/11), comparable ratios of wild type Prp20p and prp20p mutants were detected between  $^{32}\text{P}$  and  $^{35}\text{S}$  labelled samples. These data indicate that Prp20p is phosphorylated at sites other than those mutated in this analysis. Finally, we wanted to test if this mutant could affect telomeric silencing, even if it still could be phosphorylated. Silencing assay has not revealed any effect at telomeres (Figure 3A).

## 5.5. TABLES

**Table1:** Comparison between dsDNA binding activity, complementation abilities and telomere/mating type silencing capabilities of different *prp20p* mutants. Data regarding *in vitro* dsDNA binding and complementation abilities were adapted from Lee *et al.*, 1994. Telomere/mating type silencing represent the derepression effect observed when *prp20p* mutants are increased in dosage.

<i>In vitro</i> dsDNA binding activity	<i>prp20</i> nul mutant complementation	Telomere silencing derepression	Mating type silencing derepression
+	+	+	-
+	-	-	-
+	+/-	+/-	-
+	+	+	-
+	+	+	-
ND	+	+	-
-	-	-	-
+	-	-	-
+	+	+	-
+	-	-	-
+	-	-	-
+	+	+	-
+	+	+	-

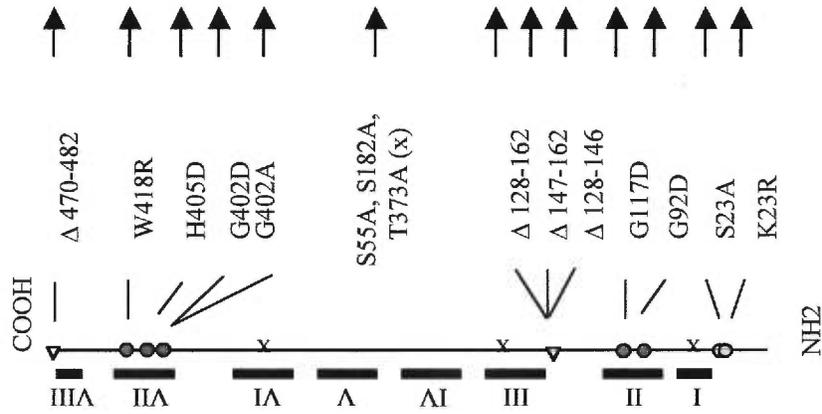


Table 1. Deshaies and Belhumeur, 1999.

## 5.6. FIGURES

**Figure 1** : Effect of Gsp1p, Prp20p, Rna1p and Yrb1p increased concentration in silencing strength at telomeres, mating type and rDNA loci. **A)** Strain UCC3505 was transformed with YCpIF16/PRP20 (*PRP20*), p414GAL/GSP1 (*GSP1*), pRS424/RNA1 (*RNA1*), pRS424/YRB1 (*YRB1*), pTRP61 (*SIR4*), YCpIF16 (Vector). The strains were patched onto SD-TRP raffinose(2%) plate and incubated 48 hr. Cells were resuspended in YNB solution and plated as tenfold serial dilution (3.5  $\mu$ l each spot) on SD-Trp galactose(2%) + 5-FOA, SD-Trp galactose(2%), SD-Trp glucose(2%) and incubated 6 days for galactose medium and 2 days for glucose medium. **B)** Strain UCC3515 was transformed with the same plasmids described above and processed using the same method. **C)** Strain JS128 was transformed with pRS315/pGAL::*PRP20* (*PRP20*), pS199/GSP1 (*GSP1*), pRS425/RNA1 (*RNA1*), pRS425/YRB1 (*YRB1*), pSIR2 $\mu$  (*SIR2*), pRS425 (Vector). The strains were patched onto SD-Leu raffinose(2%) plate and incubated 48 hr. Cells were resuspended in YNB solution and plated as tenfold serial dilution (3.5  $\mu$  L each spot) on SD-Leu galactose(2%) + 5-FOA, SD-Leu galactose(2%), SD-Leu glucose(2%) and incubated 6 days for galactose medium and 2 days for glucose medium.

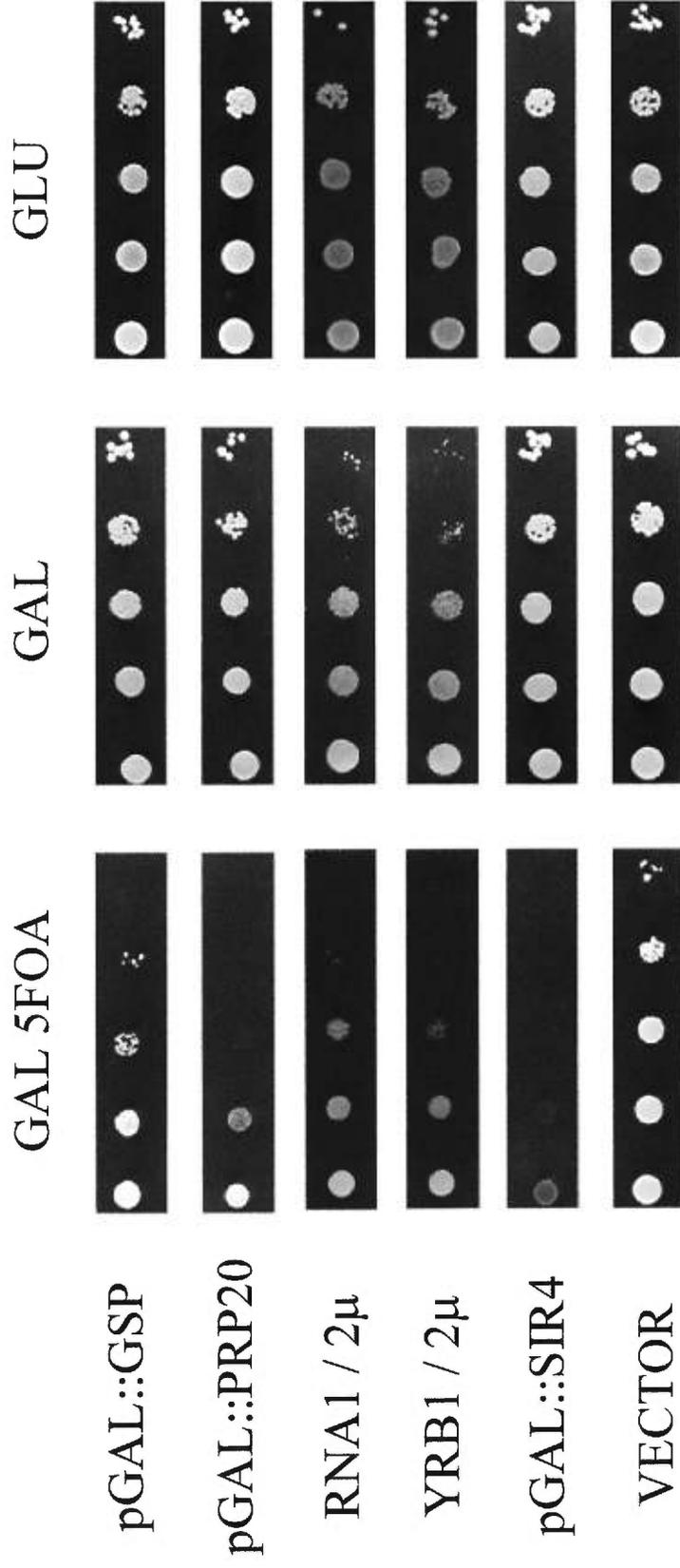


Figure 1A. Deshaies and Belhumeur, 1999.

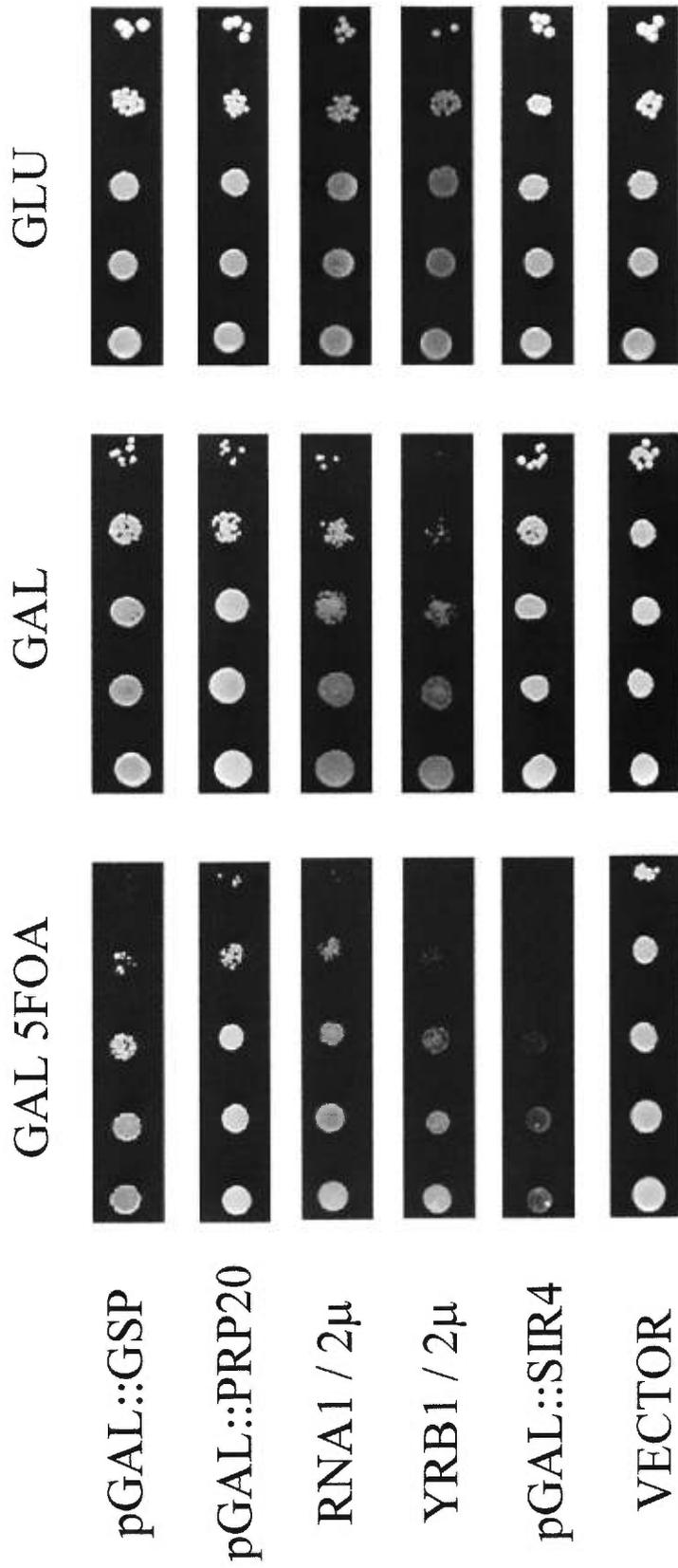


Figure 1B. Deshaies and Belhumeur, 1999.

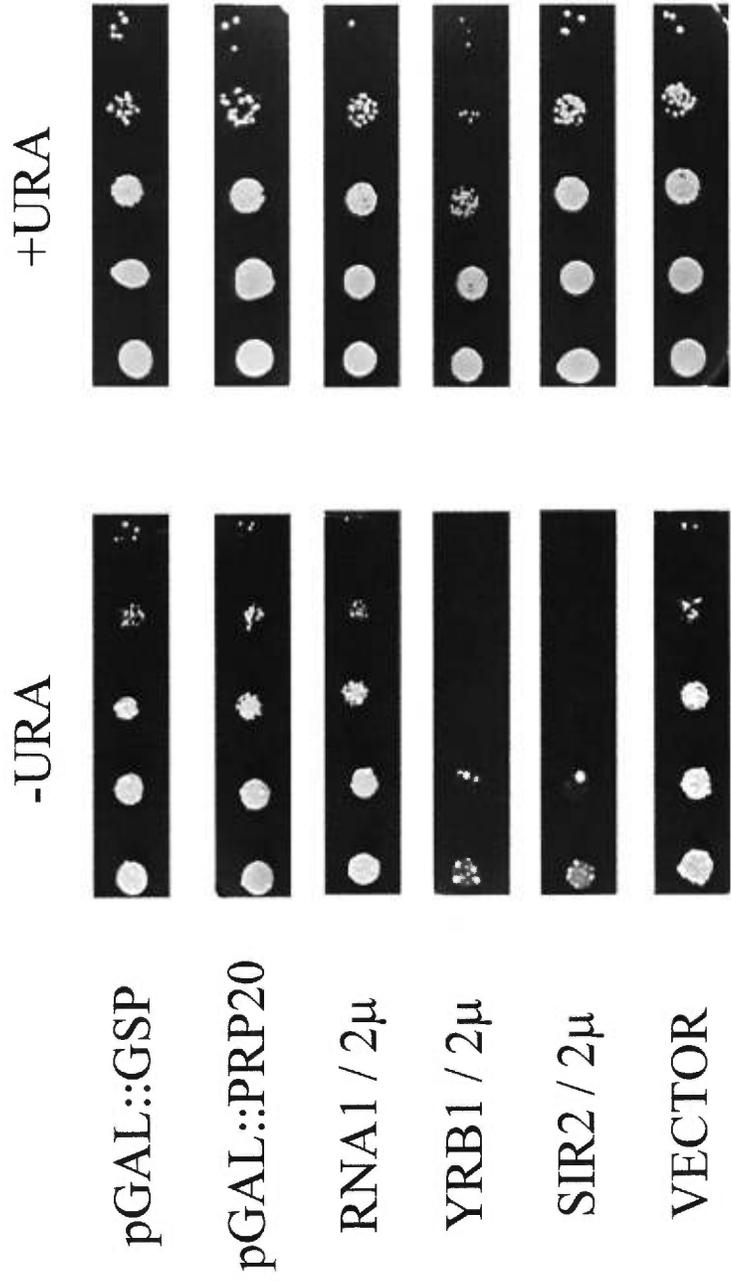


Figure 1C. Deshaies and Belhumeur, 1999.

**Figure 2 :** Effect of *GSP1* and *PRP20* co-overexpression on telomere silencing. Strain UCC3505 was transformed with TRP1 and LEU2 plasmids in combinations of two. The TRP1 plasmids were either the empty vector YCpIF16 or YCpIF16/*PRP20* (*PRP20*). The LEU2 plasmids were the empty vector pS199 or pS199/*GSP1* (*GSP1*). Leu<sup>+</sup> Trp<sup>+</sup> transformants for each combination were patched onto SD-Leu-TRP raffinose(2%) plate and grown for 2 days. Cells were resuspended in YNB solution and plated as tenfold serial dilution (3.5 µl each spot) on SD-Leu-Trp galactose(2%) + 5-FOA, SD-Leu-Trp galactose (2%), SD-Leu-Trp glucose(2%) and incubated 6 days for galactose medium and 2 days for glucose medium.



**Figure 3 :** Effect of different *prp20* mutants overexpression on temoleric silencing. **A)** Strain UCC3505 was transformed with two series of plasmids: first serie was YCpIF16/*prp20*(1-6) plasmids followed by YCpIF16/PRP20 (PRP20WT), and YCpIF16 (Vector). Second serie contains other *prp20* mutants YCpIF16/*prp20*(7-12), YCpIF16/PRP20 (PRP20WT), and YCpIF16 (Vector). The strains were patched onto SD-Trp raffinose(2%) plate and incubated 48 hr. Cells were resuspended in YNB solution and plated as tenfold serial dilution (3.5  $\mu$ l each spot) on SD-Trp galactose(2%) + 5-FOA, SD-Trp galactose(2%), SD-Trp glucose(2%) and incubated 6 days for galactose medium and 2 days for glucose medium. **B)** Expression levels of defective HA-*Prp20* mutants in UCC3505 strain. Each PRP20 mutant was expressed from the following plasmid (described in materials and methods): Lane 1, YCpIF16/*prp20*(1). Lane 2, YCpIF16/*prp20*(3). Lane 3, YCpIF16/*prp20*(2). Lane 4, YCpIF16/*prp20*(4). Lane 5, YCpIF16/*prp20*(5). Lane 6, YCpIF16/*prp20*(6).

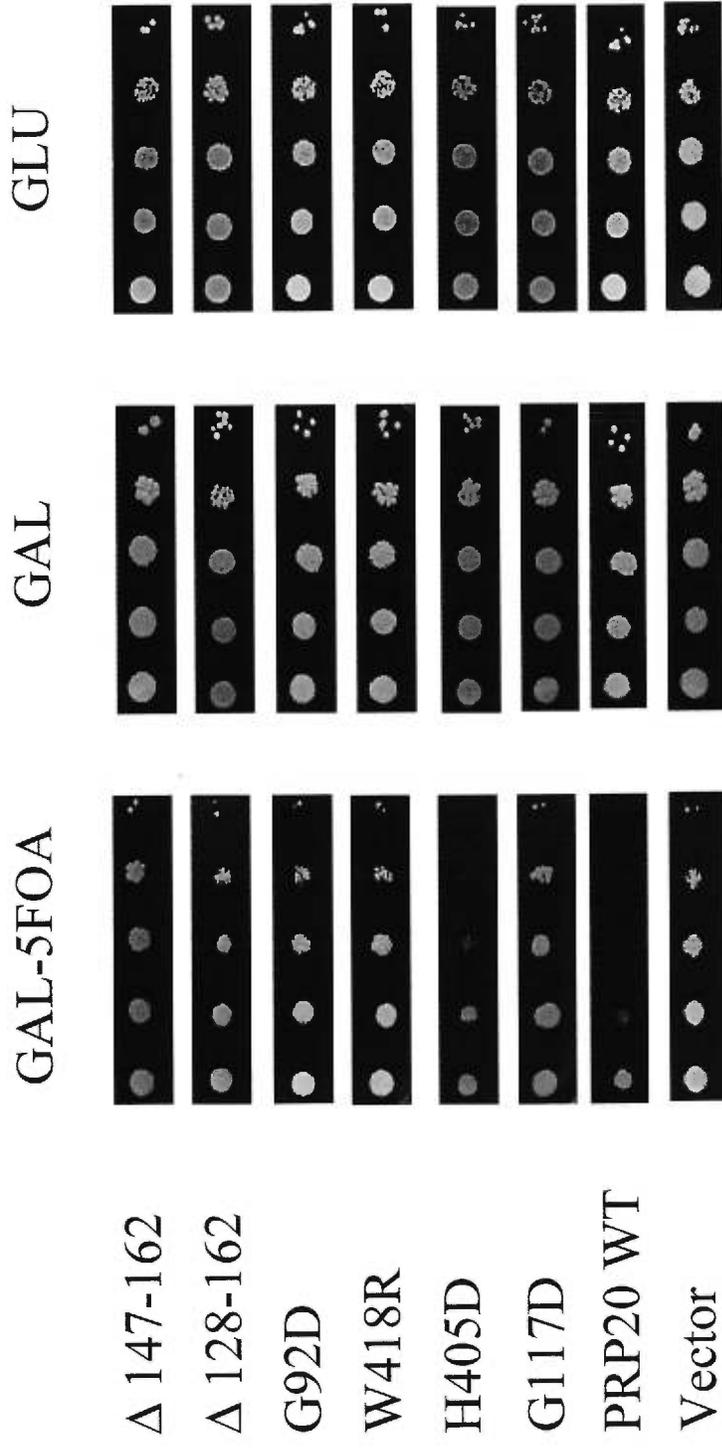


Figure 3A (First part). Deshaies and Belhumeur, 1999.

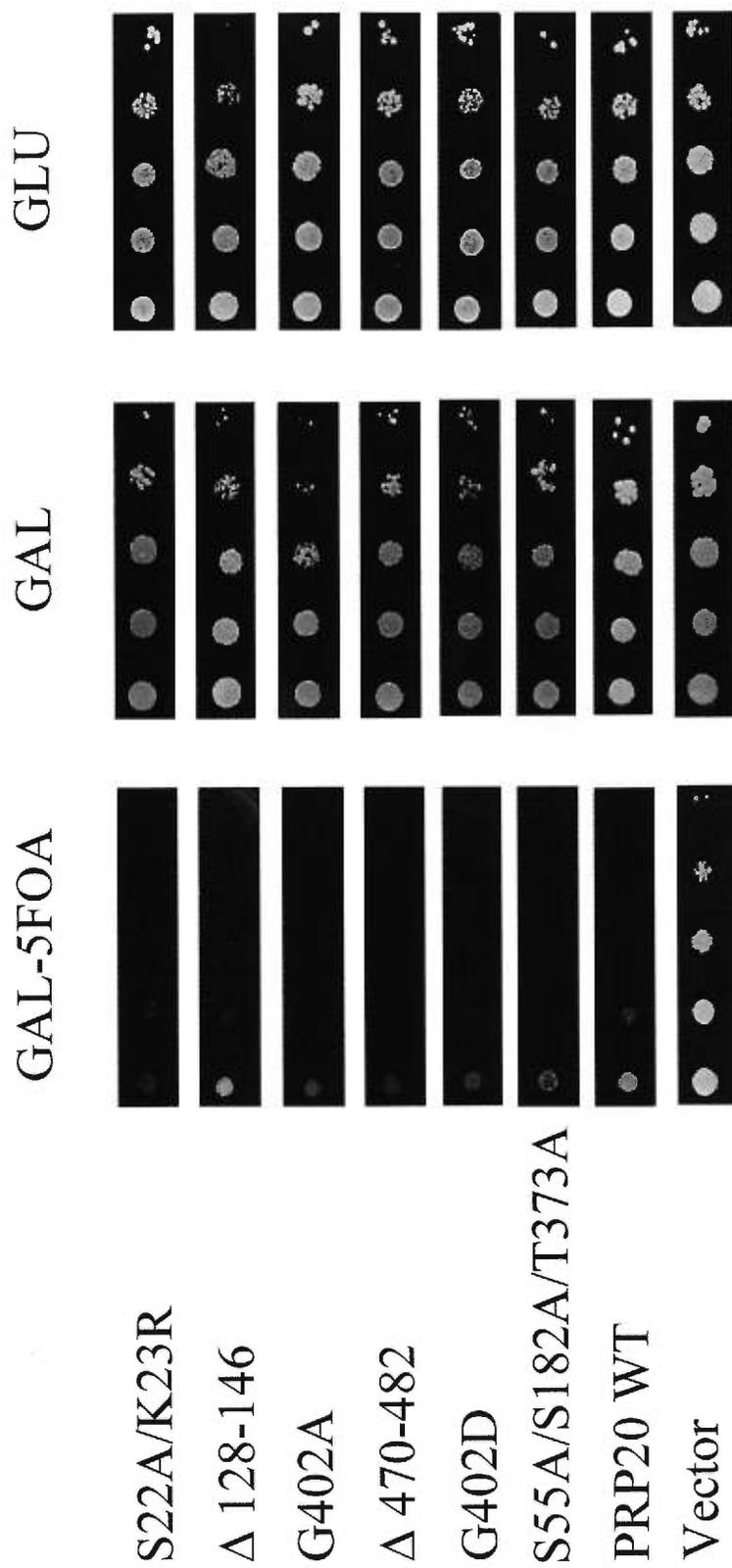


Figure 3A (Second part). Deshaies and Belhumeur, 1999.

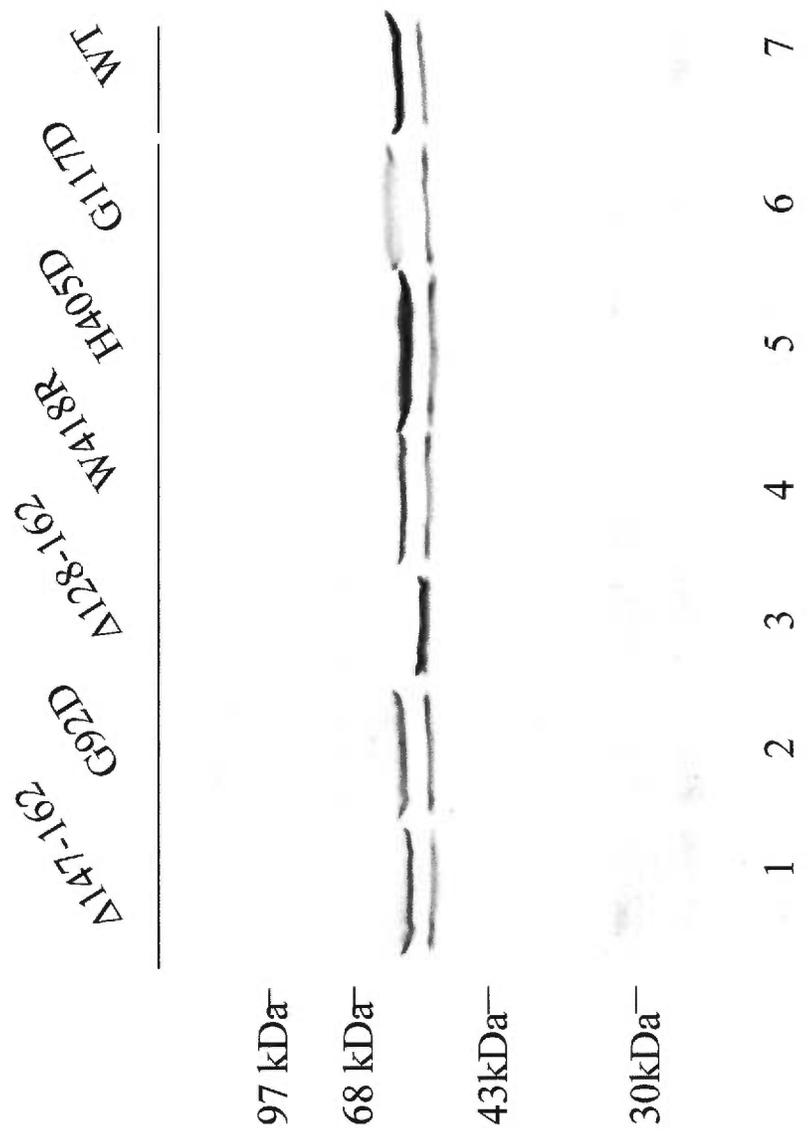


Figure 3B. Deshaies and Belhumeur, 1999.

**Figure 4 :** Immunoprecipitation of wild type Prp20p and triple mutant prp20p-S55A/S182A/T373A (3M). Strain UCC3505 transformed with vector YCpIF16 (V, lanes 1,2,7,8), YCpIF16/PRP20 (WT, lanes 3,4,9,10) or YCpIF16/*prp20*(12) (3M, lanes 5,6,11,12) was processed as described in Material and Methods. Each labelled samples (32P, lanes 1-6; 35S, lanes 7-12) was immunoprecipitated using 12CA5 antibody (lanes 1,3,5,7,9,11) or processed without antibodies addition as control (lanes 2,4,6,8,10,12). Arrow indicates Prp20p-specific band.

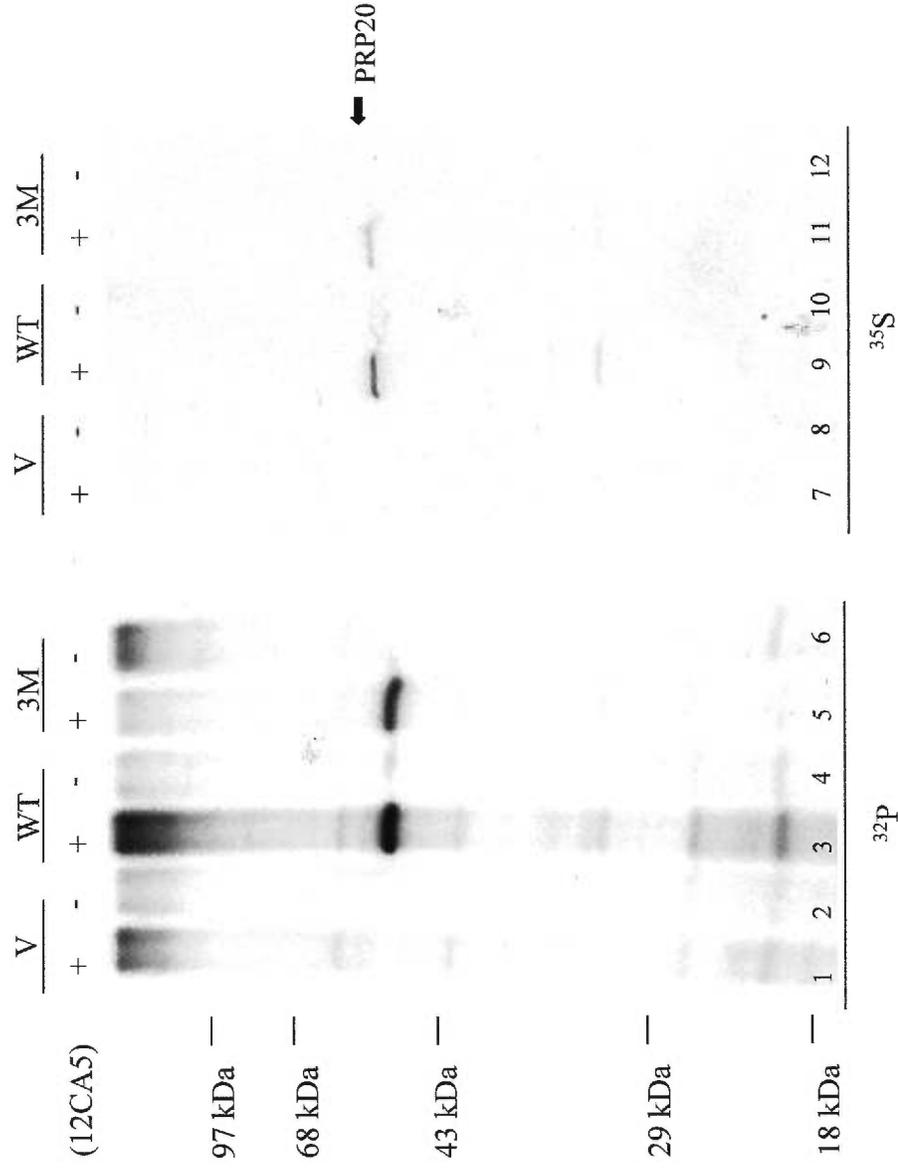


Figure 4. Deshaies and Belhumeur, 1999.

## 5.7. DISCUSSION

The Gsp1p GTPase has been implicated in several nuclear processes, including nucleocytoplasmic transport, maintenance of nuclear structure and control of cell cycle progression. Numerous experimental results suggest that *RAN/GSP1* pathway is implicated in other functions than nucleocytoplasmic protein transport. In order to investigate a novel function of *GSP1/RAN* in silencing phenomenon, we used yeast strains in which increased dosage of Gsp1p and its regulators affected the expression of a reporter gene integrated near silenced regions.

In this report, we have shown that Prp20p overexpression exhibits the strongest effect on telomeric silencing, suggesting that Gsp1p-GTP is a critical element influencing transcriptional repression at the telomeres. Telomere silencing could implicate regulation of a critical concentration of Gsp1p-GTP to this specific locus. Thus, increased concentration of Gsp1p-GTP could destabilise silencing complex, lead to sequestration of essential silencing factors or interfere in some other functions like ubiquitination or acetylation. Overexpression of Gsp1p did not cause similar behaviour as the one observed with Prp20p. One possible explanation comes from the fact that amount of Prp20p could be more limiting than is Gsp1p. Hence, the amount of Gsp1p-GTP depend on the quantity of Prp20p present in the cell, rather than Gsp1p concentration that is found in excess (Klebe *et al.*, 1995). Furthermore, Prp20p is known to bind to chromatin through a multicomponent complex (Lee *et al.*, 1993), affecting the regulation of chromatin

condensation (Bischoff *et al.*, 1991). Since Prp20p is located in a chromosomal region, we can infer that it is the most probable component of the *GSP1/PRP20* pathway likely to influence nuclear function such as telomere silencing,

Alternatively to the direct implication of Gsp1p-GTP regulation per se, effect of Prp20p overexpression on telomeres silencing could be an indirect consequence of the role of Gsp1p in nucleocytoplasmic transport, since perturbations of the *GSP1/PRP20* pathway have been shown to cause defect in this process (Rush *et al.*, 1996; Sazer, 1996). Actually, some essential factors implicated in silencing function may be unable to proceed to the nucleus. In contrast, nucleocytoplasmic transport defect could result in an accumulation of these factors to the nucleus, which need to be present at proper concentrations. However, this kind of nucleocytoplasmic defect is likely to cause general failure of the protein import to the nucleus. In such event, one can imagine that all silenced domains will exhibit the same phenotypes, assuming that mislocalized factors that are shared between loci will lead to a global silencing defect. Indeed, this idea is not consistent with the multiple behaviours observed among silenced loci, which exhibit specific telomere silencing derepression from Prp20p overexpression and opposite effect between telomeres and rDNA loci when Yrb1p amounts are increased. Without excluding that there might be a nucleocytoplasmic traffic defect accounting for these observations on silencing, it cannot alone explain all of the various effects. Therefore, there must be other factor(s) explaining these silencing perturbation, and nuclear amounts of Gsp1p-GTP is a likely candidate.

Little of the phenotypes observed for telomeric silencing assays were present at the mating type locus, except a slight effect shown by *GSP1*. Some conclusions can be drawn from these observations. First, Prp20p could be a specific factor implicated in telomere silencing. Existence of such factors that affect distinct loci has been described previously, including *SIR1* at the *HM* loci, *TLC1* at the telomeres and *SIR2* at rDNA (Chien *et al.*, 1993; Singer and Gottschling, 1994; Smith and Boeke, 1997). However, it seems unlikely that the *GSP1/PRP20* pathway is only implicated in telomere silencing, since *YRB1* effect has been observed at two different loci, at rDNA and telomeres, and there is also a little effect of *GSP1* at the *HM* loci. Second, Prp20p could be confined to telomeres regions with no possibilities to move elsewhere in the nucleus. Third, not all silenced loci are repressed with the same efficiency. The *HM* loci are most-tightly silenced, followed by the telomeres, and then the rDNA. This kind of differences between loci may explain why *PRP20* effect is only found at telomeres and not at the *HM* loci. However, rDNA locus, which is considered more leaky, has not exhibit a stronger silencing defect than at the telomeres. On the other hand, silencing feature at the rDNA locus is extremely different from the one seen at other loci and therefore, some comparisons cannot be made.

Yrb1p is a protein known to be implicated in chromosomal function, since its overexpression causes chromosome instability (Ouspenski *et al.*, 1995) and a *yrb1-21* mutant shows mitotic spindles defaults (Ouspenski, 1998). One can propose that this kind of nuclear perturbation is likely to cause defective silencing function. However, perturbation of the silencing function itself may lead to chromosomal instability. Experiments have shown that hyperactivation of the silencing proteins Sir2p and Sir3p and

deletion of *SIR4* lead to silencing complex disassembly and chromosome loss (Holmes *et al.*, 1997). Therefore, it is tempting to speculate that these two phenomenon can be related, but if so, it is hard to tell in which process *YRB1* is mostly involved. In other respects, phenotypes shared between *YRB1* and *SIR2* increased gene dosage suggest that these two gene could be implicated in the same pathway. Opposite effects are also observed between telomeres and rDNA silencing when amount of Yrb1p is increased. It has been proposed that telomeres act as a silencing factor pool, limiting access elsewhere in the nucleus (Maillet *et al.*, 1996; Marcand *et al.*, 1996). Yrb1p could be such factor present initially at telomeres. Increased dosage of Yrb1p could then lead to its relocalization from telomeres to rDNA or could mediate the shuttling of another factor like Sir2p, resulting in silencing reinforcement of this locus while decreasing telomere silencing. Finally, increased amount of Yrb1p could lead to sequestration of Sir4p, resulting in relocalization of Sir2p to the nucleolus and less Sir4p to telomeres. Such rDNA silencing regulation has been proposed previously from the observation that deleted *SIR4* lead to increased concentration of Sir2p to the nucleolus and enhancement of rDNA silencing (Smith and Boeke, 1997).

Further investigations are indeed essential to provide a better understanding on how the *GSP1/PRP20* pathway is implicated in silencing function. Seeking *in situ* detection of Gsp1p, Prp20p, and Yrb1p at specific silent loci should be an indicated approach to sort out these mechanisms.

## **5.8. ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to Drs. J. Boeke, J. Velours, R. Wellinger, D.E. Gottschling, C. Boone, K. Clark and A. Hopper for their gift of strains and plasmids. We are also grateful to M. Clément for helpful discussion. Francis Deshaies held a studentship from the FCAR and this work was supported by NSERC-Canada (#OGP0138289).

## 5.9. REFERENCES

- Aebi, M., Clark, M.W., Vijayraghavan, U., and Abelson, J. (1990) A yeast mutant, *prp20*, altered in mRNA metabolism and maintenance of the nuclear structure, is defective in a gene homologous to the human gene RCC1 which is involved in the control of chromosome condensation. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 72-80.
- Adams, A., Gottschling, D.E., Kaiser, C.A., and Stearns, T. "Methods in yeast genetics". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, 1997.
- Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Gottschling, D.E. (1991) Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**, 1279-1287.
- Atkinson, N.S., Dunst, R.W., and Hopper, A.K. (1985) Characterization of an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene related to RNA processing: cloning of RNA1 and generation of new allele with novel phenotype. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 907-915.
- Avis, J.A. and Clarke, P.R. (1996) Ran, a GTPase involved in nuclear processes: its regulators and effectors. *J. Cell Sci.* **109**, 2423-2427.
- Belhumeur, P., Lee a., Tam, R., DiPaolo, T., Fortin, N., and Clark, M.W. (1993) GSP1 and GSP2, genetic suppressors of the *prp20 -1* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding protein involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2152-2161.
- Bischoff, F.R., et Ponstingl, H. (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**, 80-82.

Bryk, M., Banerjee M., Murphy, M., Knudsen, K.E., Garfinkel, D.J., *et al.* (1997) Transcriptional silencing of TY1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes Dev.* **11**, 255-269. *Genes Dev.* **11**, 255-269.

Chien, C.T., Buck, S., Sternglanz, R., and Shore D. (1993) Targeting of SIR1 protein establishes transcriptional silencing at *HM* loci and telomeres in yeast. *Cell* **75**, 531-541.

Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., and Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* **110**, 119-122.

Clark, K.L. and Sprague, G.F. (1989) Yeast pheromone response pathway: Characterization of a suppressor that restores mating to receptorless mutants. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2682-2694.

Clarke, P., Klebe, C., Wittinghofer, A., and Karsenti, E. (1995) Regulation of cdc2/cyclin B activation by ran, a Ras-related GTPase. *J. Cell Sci.* **108**, 1217-1225.

Cockell, M., Palladino, F., Laroche, T., Kyrion, G., Liu, C., Lustig, A.J., and Gasser, S.M. (1995) The carboxy termini of Sir4 and Rap1 affect Sir3 localization: evidence for a multicomponent complex required for yeast telomeric silencing. *J. Cell Biol.* **129**, 909-924.

Fleischmann, M., Clark, M.W., Forrester, W., Wickens, M., Nishimoto, T., and Aebi, M. (1991) Analysis of yeast *prp20* mutations and functional complementation by the human homologue RCC1, a protein involved in the control of chromosome condensation. *Mol. Gen. Genet.* **227**, 417-423.

Fleischmann, M., Stagljar, I., and Aebi, M. (1996) Allele-specific suppression of a *Saccharomyces cerevisiae* *prp20* mutation by overexpression of a nuclear serine/threonine protein kinase. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 614-625.

- Foreman, P.K., and Davis, R.W. (1994) Cloning vectors for the synthesis of epitope-tagged, truncated and chimeric proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **144**, 63-8.
- Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *NAR*. **25**, 5767.
- Gotta M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet L., Scherthan, H., et Gasser, S.M. (1996) The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **134**, 1349-1363.
- Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Zakian, V.A. (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres : reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**, 751-762.
- Haguenaer-Tsapis, R., and Hinnen, A. (1986) A deletion that includes the segment coding for the signal peptidase cleavage site delays release of *Saccharomyces cerevisiae* acid phosphatase from the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 723-9.
- Harrow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., and Grunstein, M. (1996) Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* **383**, 92-96.
- Henikoff, S. (1992) Position effect and related phenomena. *Curr. Opin. Genete. Dev.* **2**, 907-912.
- Henikoff, S. (1996) Dosage-dependant modification of position-effect variegation in *Drosophila*. *Bioessays*. **18**, 401-409.
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J., and Tzagoloff, A. (1986) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**, 163-167.

Holmes, S.G., Rose, A.B., Steuerle, K., Saez, E., Sayegh S., Lee, Y.M. *et al.* (1997) Hyperactivation of the silencing proteins, Sir2p and Sir3p, causes chromosome loss. *Genetics* **145**, 605-614.

Ivy, J.M., Klar, A.J., and Hicks, J.B. (1986) Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 688-702.

Kadowaki, T., Y. Zhao, And A. Tartakoff (1992) A conditional yeast mutant deficient in mRNA transport from nucleus to cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 2312-2316.

Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer A., and Goody, R.S. (1995) The kinetics mechanism of Ran-nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry* **34**, 12543-12552.

Kornbluth S., Dasso M., and Newport J. (1994). Evidence for a dual role for TC4 protein in regulating nuclear structure and cell cycle progression. *J. Cell Biol.* **125**, 705-719.

Le, S., Davis, C., Konopka, J.B., and Sternglanz, R. (1997) Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1029-1042.

Lee A., Tam, R., Belhumeur, P., DiPaolo, T., Clark, M.W. (1993) Prp20, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the regulator of chromosome condensation, RCC1, interacts with double-stranded DNA through a multi-component complex containing GTP-binding proteins. *J. Cell Sci.* **106**, 287-298.

Lee, A., Clark, K.L., Fleishmann, M., Aebi, M., and Clark, M.W. (1994) Site-directed mutagenesis of the yeast PRP20/SRM1 gene reveals distinct activity domains in the protein product. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 32-44.

Lounsbury, K., Beddow, A., and Macara, I. (1994) A family of proteins that stabilize the Ran/TC4 GTPase in its GTP-bound conformation. *J. Biol. Chem.* **269**, 11285-11290.

Lustig, A.J. (1998) Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Genete. Dev.* **8**, 233-239.

Maillet, L., Boscheron, C., Gotta, M., Marcand, S., Gilson, E., and Gasser SM. (1996) Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: a role for telomere proximity and Sir protein concentration in silencer-mediated repression. *Genes Dev.* **10**, 1796-1811.

Marcand, S., Buck, S.W., Moretti, P., Gilson, E., and Shore, D. (1996) Silencing of genes at nontelomeric sites in yeast is controlled by sequestration of silencing factors at telomeres by Rap 1 protein. *Genes Dev.* **10**, 1297-1309.

Marshall, M., Mahoney, D., Rose, A., Hicks, J.B., and Broach J.R. (1987) Functional domains of Sir4, a gene required for position effect regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4441-4452.

Masafumi, N., Hiroshima, M., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M., et Takeharu, N. (1998) When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to  $\gamma$ -Tubulin. *J. Cell Biol.* **143**, 1041-1052.

Melchior, F., Paschal, B., Evans, J., and Gerace, L. (1993) Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J. Cell Biol.* **123**, 1649-1659.

Miller, A.M., and Nasmyth, K.A. (1984) Rôle of DNA replication in the repression of silent mating type loci in yeast. *Nature* **312**, 247-251.

Moazed D., and Johnson A.D. (1996) A deubiquinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell* **86**, 667-677.

Moazed, D., and Johnson, D. (1996) A deubiquitinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell* **86**, 667-77.

Moore, M.S., and Blobel, G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into nucleus. *Nature* **365**, 661-663.

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore D. (1994) Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* **8**, 2257-2269.

Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., Kuma, K., Miyata, T., Fukushige, S., Murotsu T., Matsubara, K., and Nishimoto, M. (1987) Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation. *Genes Dev.* **1**, 585-593.

Ouspenski, I.I. (1998) A RanBP1 mutation which does not visibly affect nuclear import may reveal additional functions of the Ran GTPase system. *Exp. Cell. Res.* **244**, 171-83.

Ouspenski, I.I., Mueller U.W., Matynia A., Sazer S., Elledge S.J., et Brinkley B.R. (1995) Ran-binding protein-1 is an essential component of the Ran/RCC1 molecular switch system in budding yeast. *J. Biol. Chem.* **270**, 1975-1978.

Razaka, D., Aigle, M., and Velours, J. (1994) Construction of a shuttle vector for site-directed mutagenesis and functional studies in yeast without further cloning. *Anal. Biochem.* **223**, 167-70.

Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M., and Wittinghofer, A. (1998) The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature* **392**, 97-101.

- Rush, M.G., Drivas, G., and D'Eustachio, P.D. (1996) The small nuclear GTPase Ran: how much does it run? *Bioessays*. **18**, 103-112.
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., and Riggs, A.D. (1996) Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sazer, S. (1996) The search for primary function of the Ran GTPase continues. *Trends Cell Biol.* **6**, 81-85.
- Schlenstedt, G., Wong, D.H., Koepp, D.M., and Silver, P.A. (1995) Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *EMBO J.* **14**, 5367-5378.
- Sikorski, R.S., and Boeke, J.D. (1991) In vitro mutagenesis and plasmid shuffling : from cloned gene to mutant yeast. *Methods in enzymology.* **194**, 302-318.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Singer, M.S., and Gottschling, D.E. (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**, 404-409.
- Smith, J.S., and Boeke, J.D. (1997) An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* **11**, 241-254.
- Smith, J.S., Brachmann, C.B., Pillus, L., and Boeke, J.D. (1998) Distribution of a limited Sir2 protein pool regulates the strength of yeast rDNA silencing and is modulated by Sir4p. *Genetics* **149**, 1205-1219.

Stone E.M., and Pillus, L. (1996). Activation of an MAP kinase cascade leads to Sir3p hyperphosphorylation and strengthens transcriptional silencing. *J. Cell Biol.* **135**, 571-583.

Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K., Grunstein, M. (1997) Sir2 and Sir4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* **11**, 83-93.

Sussel L., and Shore, D. (1991) Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7749-7753.

Thompson, J.S., Hecht, A., and Grunstein, M. (1993) Histones and the regulation of heterochromatin in yeast. *Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**, 247-256.

Thompson, J.S., Ling, X., Grunstein, M. (1994) Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* **639**, 245-247.

Triolo, T., and Sternglanz, R. (1996) Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature* **381**, 251-253.

Vijayraghavan, U., Company, M., and Abelson, J. (1989) Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **3**, 1206-1216.

Wotton, D., and Shore, D. (1997) A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**, 748-760.

## **DISCUSSION**

## 6. DISCUSSION

### 6.1. Hypothèses

La manière dont la voie *GSP1/PRP20* est impliquée dans la répression transcriptionnelle peut être interprétée de multiples façons. Les principales hypothèses s'y rattachant ont été discutées précédemment dans l'article (voir discussion). La présente section ne fait donc que souligner brièvement les éléments qui en ressortent. Dans notre étude, nous avons démontré que *PRP20* et *YRB1* sont deux éléments du système les plus susceptibles de modifier les mécanismes de répression. Afin d'y parvenir, nous avons utilisé des souches de levures dans lesquelles la surexpression de *GSP1* et des éléments assurant la régulation de son état de liaison au GDP/GTP affectaient un gène rapporteur *URA3* intégré aux différentes régions démontrant de la répression transcriptionnelle. L'expression de ce gène rapporteur indique donc la capacité des éléments surexprimés à interférer avec les mécanismes de répression transcriptionnelle. Cette expression est mesurée par le niveau de mortalité, occasionné par un composé toxique résultant du métabolisme du 5-FOA par le produit du gène *URA3*. Pour sa part, la surexpression de la plupart des protéines est effectuée à l'aide d'un promoteur inductible au galactose alors que certains gènes sont surexprimés grâce à un vecteur multicopies. Les résultats suggèrent que l'état Gsp1p-GTP pourrait être un élément important au niveau de la régulation de la transcription aux télomères, puisque *PRP20* démontre le phénotype de dérégulation transcriptionnelle le plus fort. De plus, *PRP20* se doit également d'être pleinement fonctionnel afin d'accomplir sa fonction aux télomères.

Par ailleurs, *YRB1* démontre un effet contraire entre le niveau de répression observé aux télomères et au rDNA. Il est donc possible que ce facteur se trouve relocalisé des télomères au rDNA ou participe à la relocalisation d'un autre facteur suite à sa surexpression dans la cellule, d'une façon semblable à Sir2p (Smith *et al.*, 1998). Toutes ces données démontrent donc l'importance d'une balance adéquate des facteurs impliqués dans la répression transcriptionnelle puisqu'une surexpression mène à un changement de la répression. Pour ce qui est de la voie *GSP1/PRP20*, Gsp1p est déjà présent en excès dans la cellule. C'est donc des éléments régulateurs comme Prp20p qui auront un rôle plus important à jouer en modifiant l'état de liaison de Gsp1p.

D'autre part, l'effet de la surexpression de Prp20p sur le "silencing" pourrait être relié indirectement au rôle de Gsp1p dans le transport nucléocytoplasmique. En effet, des perturbations au niveau de la voie *GSP1/PRP20* causent fréquemment des défauts dans ces processus. Suite à un problème de transport, des facteurs essentiels au "silencing" transcriptionnel pourraient ne plus être dirigés au noyau pour accomplir leurs fonctions. Néanmoins, ce type d'anomalie occasionne habituellement un défaut général du système de transport protéique au noyau. Partant de ce principe, le phénomène de "silencing" devrait donc être perturbé d'une façon globale, si on considère que certains facteurs communs à tous les loci ne peuvent plus être transportés au noyau de façon adéquate. Or, nos résultats ne démontrent pas d'homogénéité à ce niveau. En effet, la surexpression de Prp20p semble agir spécifiquement aux télomères alors que la surexpression de Yrb1p démontre un effet contraire entre les télomères et le rDNA. Sans exclure la possibilité que le problème de transport nucléocytoplasmique puisse être une cause partielle des phénotypes observés au

niveau du "silencing", cette hypothèse ne peut expliquer à elle seule la diversité des effets que nous observons. Il existerait donc d'autres facteurs impliqués dans la régulation de la répression transcriptionnelle de type "silencing", et à cet effet, la concentration nucléaire de Gsp1-GTP pourrait être un bon candidat.

## 6.2. Conditions affectant le "silencing"

En plus des facteurs agissant en *cis*, des séquences en *trans* ainsi que les nombreuses enzymes modifiant l'état de la chromatine, d'autres éléments comme la source de carbone employée et la température utilisée sont autant de composantes qui auront un effet appréciable sur les niveaux de répression transcriptionnelle. En effet, nous avons observé qu'une température de 37°C enlevait toutes formes de répression aux télomères dans la souche UCC3505. De plus, l'utilisation de milieux contenant du glucose ne favorise pas la répression stable dans cette souche. Il est donc préférable d'utiliser une autre source de carbone comme le galactose, qui s'avère beaucoup plus efficace afin de maintenir un état stable de la répression transcriptionnelle. Pour ces raisons, toutes les expériences ont été effectuées en présence de galactose, autant pour les milieux d'induction que les milieux contrôles. Il est cependant reconnu que le passage d'un milieu glucose vers un milieu galactose donne lieu à une réadaptation des cellules face à la nouvelle source de carbone présente, ce qui peut occasionner des changements importants au niveau du métabolisme cellulaire. Sachant que la répression transcriptionnelle aux télomères est fragile, il était essentiel de ne pas trop perturber l'état physiologique des cellules que nous utilisons. Afin de prévenir l'effet potentiel de ce changement physiologique au niveau de la répression transcriptionnelle, toutes les cellules ont poussé en présence de raffinose avant d'être mises

sur des milieux contenant du galactose. En effet, le raffinose permet une adaptation graduelle entre le glucose et le galactose sans perturber de façon significative le métabolisme.

D'autre part, il était également important de s'assurer que le système n'était pas perturbé par d'autres facteurs comme la toxicité associée à la surexpression de protéines. En effet, il est connu que le promoteur inductible au galactose donne lieu à une forte expression de protéines et que cette expression peut mener à une toxicité dans certains cas. Nous avons utilisé ce système car il nous permettait de contrôler l'effet de l'expression, passant d'un état "off" à l'état "on" en ajoutant du galactose. Nous avons ainsi découvert que *YRBI* et *RNAI* s'avèrent toxiques pour les cellules lorsque surexprimés utilisant un promoteur inductible au galactose. C'est d'ailleurs pour cette raison que dans ces deux cas nous avons utilisé des vecteurs 2 $\mu$  (vecteur à haut nombre de copies) au lieu d'employer un tel promoteur. La façon de vérifier si la surexpression cause une toxicité consiste à utiliser en parallèle avec des milieux Galactose/5-FOA, d'autres milieux ne contenant que du galactose. Sur ces milieux, nous pouvions ainsi évaluer directement l'effet de la surexpression sur le niveau de survie.

### **6.3. Implications de la phosphorylation sur la répression transcriptionnelle**

Plusieurs conditions comme les carences nutritionnelles, chocs thermiques et exposition aux phéromones sexuels mènent à l'hyperphosphorylation de Sir3p, et par le fait même un changement au niveau de la répression transcriptionnelle aux télomères (Stone et

Pillus, 1996). La phosphorylation de Sir3p pourrait être un point de contrôle régulant l'état silencieux de la chromatine, d'une façon semblable à celle rencontrée chez *Drosophila*, où la phosphorylation de Hp1p corrèle avec l'assemblage de l'hétérochromatine (Eissenberg *et al.*, 1994). Sachant que Prp20p est phosphorylée *in vivo* et qu'elle est impliquée dans la répression transcriptionnelle aux télomères, un mécanisme semblable est envisageable. Pour ces raisons, il est important de caractériser plus en profondeur le rôle qu'occupe le niveau de phosphorylation observé chez la protéine Prp20. Dans la présente étude, nous n'avons malheureusement pas pu générer des mutants complets de phosphorylation (voir Figure 4 de l'article). Il est toutefois possible que la protéine possède plusieurs sites de phosphorylation et que nos mutagenèses n'en aient affecté qu'une partie. Des recherches exhaustives permettraient donc de fournir des informations précieuses non seulement sur un rôle potentiel au niveau de la répression transcriptionnelle, mais également sur d'autres fonctions biologiques attribuées à *PRP20* qui seraient modulées par cette phosphorylation.

Par ailleurs, nous avons pu constater que l'expression de divers mutants ainsi que la version sauvage de Prp20p révèle la présence de deux bandes distinctes lors du "Western", ce qui laisse suggérer deux états différents de la protéine (voir Figure 3B de l'article). Une constatation similaire avait été notée dans une autre étude qui proposait que ces deux états puissent être attribuables à la forme phosphorylée et non phosphorylée de Prp20p (Fleishmann *et al.*, 1993). Toutefois, nos expériences d'immunoprécipitations au <sup>35</sup>S semblent nous indiquer qu'une seule forme de la protéine est présente (voir Figure 4 de l'article). Certaines hypothèses peuvent expliquer cette divergence. D'une part, les conditions utilisées lors de l'immunoprécipitation sont différentes de celles employées lors

du "Western". Il est alors probable qu'un des deux états soit moins facilement immunoprécipitable. D'autre part, il est possible qu'un des deux états observés soit attribuable à la présence d'une protéine non spécifique révélée seulement lors du "Western". Enfin, l'expérience permettant de déterminer quelle bande correspond à l'état phosphorylé de Prp20p consisterait à faire migrer sur un même gel un échantillon destiné au "Western" avec celui utilisé suite à l'immunoprécipitation et de comparer par la suite leur distance de migration respective.

#### **6.4. Validité du système et expériences futures**

Il est important de souligner que la répression transcriptionnelle est un état transitoire dans la cellule et qu'inévitablement cet état devra être modifié durant le cycle cellulaire. En effet, ces régions devront être accessibles à la polymérase lors de la réplication du matériel génétique. La répression transcriptionnelle est donc un phénomène réversible et implique un fragile équilibre, surtout au niveau des télomères, où une compétition constante survient entre la mise en place d'un complexe de transcription actif et l'établissement d'une chromatine réfractaire à cette transcription (Gottschling *et al.*, 1990; Aparicio *et al.*, 1994). Il devient alors difficile d'étudier le phénomène de la répression transcriptionnelle aux télomères puisque ce dernier est très instable. Afin de minimiser la fréquence de dérégulation transcriptionnelle, il était important d'utiliser une souche de levure dans laquelle un gène rapporteur situé près des télomères était réprimé de façon la plus stable possible. Afin d'y parvenir, *URA3* a été utilisé comme gène rapporteur et son trans-activateur, le gène *PPR1*, a été désactivé. De cette façon, l'état silencieux est favorisé par rapport à l'initiation de la transcription.

D'autre part, l'initiation de la transcription dépend en partie de la force des promoteurs qui n'ont pas tous la même capacité à initier efficacement cette transcription. Par conséquent, un promoteur faible favorisera la répression transcriptionnelle alors qu'un promoteur fort empêchera son établissement. Dans notre étude, il était important d'utiliser un système où l'environnement transcriptionnel est semblable entre les différents loci étudiés. Pour s'assurer de cette uniformité, nous avons utilisé des souches qui possèdent le même gène rapporteur, soit le gène *URA3*. De cette façon, nous pouvions nous assurer que l'effet observé entre chaque locus réprimé transcriptionnellement n'était pas dû à la force inégale des promoteurs, chose qui aurait pu survenir si nous avions utilisé des gènes rapporteurs différents. Cette caractéristique constitue donc un avantage certain en diminuant les erreurs possibles d'interprétation.

Des expériences futures permettront de déterminer plus spécifiquement l'implication de la voie *GSP1/PRP20* au niveau de la répression transcriptionnelle. Par exemple, afin de vérifier le rôle d'un état Gsp1p-GTP dans le processus, il serait possible de surexprimer un mutant de *GSP1* (Gsp1-G21V) qui stabilise la forme liée en GTP dans la souche UCC3505 (gène rapporteur situé à proximité des télomères). Toutefois, ce genre de mutant interfère avec le transport nucléocytoplasmique, ce qui rend difficile une interprétation valable des résultats. Une autre possibilité plus simple serait de co-exprimer *PRP20* et *RNAI* à l'intérieur de cette souche afin d'équilibrer les niveaux de Gsp1p-GTP, pour ensuite comparer le niveau de dérégulation par rapport à la surexpression de *PRP20* seule.

D'autre part, Prp20p pourrait être un facteur spécifiquement impliqué aux télomères, en jouant par exemple un rôle sur la longueur de ces derniers. Une façon de vérifier cette hypothèse consisterait à surexprimer *PRP20* dans la souche UCC3505 et déterminer la longueur des télomères à l'aide d'une sonde spécifique à *URA3* (Singer and Gottschling, 1994). Enfin, il serait intéressant de vérifier la présence *in situ* des protéines Prp20p, Gsp1p ou Yrb1p aux différents loci où l'on retrouve de la répression transcriptionnelle de type "silencing". Une technique permettant de vérifier une telle hypothèse impliquerait l'utilisation d'un agent "cross-linker" qui provoque la liaison covalente entre les protéines et l'ADN situé à proximité. Après récupération de la protéine étudiée (et éventuellement l'ADN qui lui est associé), un PCR utilisant des sondes spécifiques à une région silencieuse déterminée peut être effectué. L'amplification de l'une ou plusieurs de ces régions nous indiquerait alors que la protéine agirait au niveau de ces domaines.

**REMERCIEMENTS**

## 7. REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Pierre Belhumeur, mon directeur de maîtrise, pour son soutien tout au long de ma formation et pour m'avoir permis de développer un esprit scientifique ainsi qu'un sens critique rigoureux. Je tiens également à remercier Martin Clément, mon collègue de travail, pour son aide continuel et ses conseils forts utiles. Je veux également souligner le support accordé par l'organisme des Fonds FCAR, qui m'a assuré un soutien financier durant ma formation de maîtrise.

Je voudrais remercier spécialement Alexandre et Sonia, mes amis de toujours, qui m'ont supporté, encouragé, et qui ont été là lorsqu'il le fallait. Leur présence fut pour moi d'une importance capitale à tous les niveaux. Un petit mot aussi pour Martin, qui malheureusement est parti en Australie juste au moment où ça devenait intéressant ! Une attention particulière revient également à mes amis Marie-Josée, Pako, Jess, et Éric qui ont grandement contribué à m'enrichir en tant que personne.

Merci infiniment à mes parents Louise et André pour tout le support et l'amour qu'ils m'ont témoigné, et ce depuis toujours. Je tiens également à remercier les autres membres de ma famille, Nicolas et Solène, pour leurs aides et encouragements ainsi que leur présence continuelle. Enfin, je remercie ma copine Mélanie pour toute la confiance qu'elle m'a portée et pour m'avoir appuyé et donné l'énergie nécessaire afin de mener à terme mes projets.

## RÉFÉRENCES

## 7. RÉFÉRENCES

Aebi, M., Clark, M.W., Vijayraghavan, U., et Abelson, J. (1990) A yeast mutant, *prp20*, altered in mRNA metabolism and maintenance of the nuclear structure, is defective in a gene homologous to the human gene *RCC1* which is involved in the control of chromosome condensation. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 72-80.

Adam, S.A., Sterne Marr, R., and Gerace, L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.* **111**, 807-816.

Amberg, D.C., Goldstein, A.L., et Cole, C.N. (1992) Isolation and characterization of *RAT1*: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev.* **6**, 1173-1189.

Aparicio, O.M., et Gottschling, D.E. (1994) Overcoming telomeric silencing: a *trans*-activator competes to establish gene expression in a cell-dependant way. *Genes Dev.* **8**, 1133-1146.

Aparicio, O.M., Billington, B.L., et Gottschling, D.E. (1991) Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**, 1279-1287.

Belhumeur, P., Lee a., Tam, R., DiPaolo, T., Fortin, N., et Clark, M.W. (1993) *GSP1* and *GSP2*, genetic suppressors of the *prp20 -1* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding protein involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2152-2161.

Bischoff, F.R., et Ponstingl, H. (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator *RCC1*. *Nature* **354**, 80-82.

Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D., et Broach, J.R. (1993) Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* **7**, 592-604.

Buck, S.W., et Shore, D. (1995) Action of a RAP1 C-terminal silencing domain reveals an underlying competition between *HMR* and telomeres in yeast. *Genes Dev.* **9**, 370-384.

Carey, K.L., Richards, S.A., Lounsbury, K.M., et Macara, I.G. (1996) Evidence using a green fluorescent protein-glucocorticoid receptor chimera that the Ran/TC4 GTPase mediates an essential function independent of nuclear protein import. *J. Cell Biol.* **133**, 985-996.

Chi, M.H., et Shore, D. (1996) *SUM1-1*, a dominant suppressor of SIR mutations in *Saccharomyces cerevisiae*, increases transcriptional silencing at telomeres and *HM* mating-type loci and decreases chromosome stability. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4281-4294.

Chi, N.C., Adam, E.J.H., Visser, G.D., et Adam S.A. (1996) RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 in nuclear protein import. *J. Cell Biol.* **135**, 559-569.

Chien, C.T., Buck, S., Sternglanz, R., et Shore D. (1993) Targeting of SIR1 protein establishes transcriptional silencing at *HM* loci and telomeres in yeast. *Cell* **75**, 531-541.

Clark, K. L., Ohtsubo, M., Nishimoto, T., Goebel, M., et Sprague, G.F. Jr. (1991) The yeast SRM1 protein and human RCC1 protein share analogous functions. *Cell Regul.* **2**, 781-792.

Clark, K.L., et Sprague, G.F. (1989) Yeast pheromone response pathway: Characterization of a suppressor that restores mating to receptorless mutants. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2682-2694.

Clarke, P., Klebe, C., Wittinghofer, A., et Karsenti, E. (1995) Regulation of *cdc2*/cyclin B activation by ran, a Ras-related GTPase. *J. Cell Sci.* **108**, 1217-1225.

Cockell, M., Palladino, F., Laroche, T., Kyriou, G., Liu, C., Lustig, A.J., et Gasser, S.M. (1995) The carboxy termini of Sir4 and Rap1 affect Sir3 localization: evidence for a multicomponent complex required for yeast telomeric silencing. *J. Cell Biol.* **129**, 909-924.

Conrad, M.N., Wright, J.H., Wolf, A.J., et Zakian, V.A. (1990) RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**, 739-750.

Corbett, A.H., Koepp, D. M., Schlenstedt, G., Lee, M.S., Hopper, A.K., et Silver, P.A. (1995) Rna1p, a Ran/TC4 GTPase activating protein, is required for nuclear import. *J. Cell Biol.* **130**, 1017-1026.

Coutavas, E., Ren, M., Oppenheim, J.D., D'Eustachio, P., et Rush, M.G. (1993) Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. *Nature* **366**, 585-587.

Dasso, M. (1995) in *Progress in Cell Cycle Research (Vol.1)* (Meijer, L., Guidet, S., et Tung, H.Y.L., eds), pp.163-172, Plenum press.

Dasso, M. (1993) RCC1 in the cell cycle: the regulator of chromosome condensation takes on new roles. *Trends biochem. Sci.* **18**, 96-101.

Demeter, J., Morphew, M., et Sazer., S. (1995) A mutation in the RCC1-related protein pim1 results in nuclear envelope fragmentation in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 1436-1440.

Diffley, J.F, and Stillman, B. (1989) Transcriptional silencing and lamins [letter]. *Nature* **342**, 24.

Dillin, A., et Rine, J. (1997) Separable functions of ORC5 in replication initiation and silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 1053-1062.

Ehrenhofer-Murray, A.E., Gossen, M., Pak, D.T.S., Botchan, M.R., et Rine, J. (1995) Separation of origin recognition complex functions by cross-species complementation. *Science* **270**, 1671-1674.

Eissenberg, J.C., Ge, Y.W., et Hartnett, T. (1994) Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J. Biol. Chem.* **69**, 21315-21321.

Fleischmann, M., Stagljar, I., et Aebi, M. (1996) Allele-specific suppression of a *Saccharomyces cerevisiae* *prp20* mutation by overexpression of a nuclear serine/threonine protein kinase. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 614-625.

Forrester, W., Stutz, F., Rosbash, M., et Wickens, M. (1992) Defects in mRNA 3'-end formation, transcription initiation, and mRNA transport associated with the yeast mutation *prp20*: possible coupling of mRNA processing and chromatin structure. *Genes Dev.* **6**, 1914-1926.

Fox, C.A., Loo, S., Dillin, A., et Rine, J. (1995) The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication. *Genes Dev.* **9**, 911-924.

Fritze, C.E., Verschueren, K., Strich, R., et Esposito, R.E. (1997) Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *EMBO J.* **16**, 6495-6509.

Gall, J.D. (1995) Beginning of the end: origins of the telomere concept. *Telomeres*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press. 396pp. (pp.1-10).

Görlich, D. (1998) Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* **17**, 2721-2727.

Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U., et Bischoff, F.R. (1996) Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* **15**, 5584-5594.

Gotta M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet L., Scherthan, H., et Gasser, S.M. (1996) The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **134**, 1349-1363.

Gotta, M., Strahl-Bolsinger, S., Renaud, H., Laroche, T., Kennedy, B.K., Grunstein, M., et Gasser, S.M. (1997) Localization of Sir2p : the nucleolus as a compartment for silent information regulators. *EMBO J.* **16**, 3243-3255.

Gottlieb, S., et Esposito, R.E. (1989) A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56**, 771-776.

Gottschling, D.E. (1992) Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is refractory to methyltransferase activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 4062-4065.

Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., et Zakian, V.A. (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres : reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**, 751-762.

Greider, C.W. (1995) Telomerase biochemistry and regulation. In : *Telomeres*, pp.35-68, Blackburn E.H. and Greider, C.W. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Hartmann, E., et Görlich, D. (1995) A Ran-binding motif in nuclear pore proteins. *Trends Cell Biol.* **5**, 192-193.

Hartwell, L. (1967) Macromolecular synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.* **93**, 1662-1670.

Hayashi, N., Seino, H., Irie, K., Watanabe, M., Clark, K.L., Matsumoto, K., et Nishimoto, T. (1996) Genetic interaction of DED1 encoding a putative ATP-dependent RNA helicase with SRM1 encoding a mammalian RCC1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 149-156.

Hecht, A, Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., et Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins : a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**, 583-592.

Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., et Grunstein, M. (1996) Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* **383**, 92-96.

Henikoff, S. (1996) Dosage-dependant modification of position-effect variegation in *Drosophila*. *Bioessays*. **18**, 401-409.

Holmes, S.G., et Broach, J.R. (1996) Silencers are required for inheritance of the repressed state in yeast. *Genes Dev.* **10**, 1021-1032.

Holmes, S.G., Rose, A.B., Steuerle, K., Saez, E., Sayegh S., Lee, Y.M. *et al.* (1997) Hyperactivation of the silencing proteins, Sir2p and Sir3p, causes chromosome loss. *Genetics* **145**, 605-614.

Hopper, A.K., Shultz, L.D., et Evangelidis, V. (1978) A yeast mutant wich accumulates precursor tRNAs. *Cell* **19**, 211-219.

Hopper, A.K., Traglia, H.M., et Dunst, R. W. (1990) The yeast RNA1 gene product necessary for RNA processing is located in the cytosol and apparently excluded from the nucleus. *J. Cell Biol.* **111**, 309-21.

Huang, H., Kahana, A., Gottschling, D.E., Prakash, L., et Liebman, S.W. (1997) The ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6693-6699.

Hutchinson, H.T., Hartwell, L.H., et McLaughlin, C.S. (1969) Temperature-sensitive yeast mutant defective in robonucleic acid production. *J. Bacteriol.* **99**, 807-814.

Ivy, J.M., Klar, A.J., et Hicks, J.B. (1986) Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 688-702.

Kadowaki, T., Goldfarb, D., Spitz, L.M., Tartakoff, A.M., et Ohno, M. (1993) Regulation of RNA processing and transport by a nuclear guanine nucleotide release protein and members of the Ras superfamily. *EMBO J.* **12**, 2929-2937.

Kadowaki, T., Hitomi, M., Chen, S., and Tartakoff, A.M. (1994) Nuclear mRNA accumulation causes nucleolar fragmentation in yeast mtr2 mutant. *Mol. Biol. Cell* **5**, 1253-63.

Kayne, P.S., Kim, U.J., Han, M., Mullen, J.R., Yoshizaki, F., and Grunstein, M. (1988) Extremely conserved histone H4N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* **55**, 27-39.

Kirk K.E., Harmon, B.P., Reichardt, I.K., Sedat, J.W., et Blackburn, E.H. (1997) A block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science* **275**, 1478-1481.

Kirkpatrick, D., et Solomon, F. (1994) Overexpression of yeast homologs of the mammalian checkpoint gene RCC1 suppresses the class of alpha-tubulin mutations that arrest with excess microtubules. *Genetics* **137**, 381-92.

Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer A., et Goody, R.S. (1995) The kinetics mechanism of Ran-nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry* **34**, 12543-12552.

Koepp, D.M., Wong, D.H., Corbett, A.H., et Silver, P.A. (1996) Dynamic localization of the nuclear import receptor and its interactions with transport factors. *J. Cell Biol.* **133**, 1163-1176.

Kornbluth S., Dasso M., et Newport J. (1994). Evidence for a dual role for TC4 protein in regulating nuclear structure and cell cycle progression. *J. Cell Biol.* **125**, 705-719.

Laurenson, P., et Rine, J. (1992) Silencers, silencing, and heritable transcriptional states. *Microbiol Rev.* **56**, 543-560.

Le, S., Davis, C., Konopka, J.B., et Sternglanz, R. (1997) Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1029-1042.

Lee, A., Clark, K.L., Fleishmann, M., Aebi, M., et Clark, M.W. (1994) Site-directed mutagenesis of the yeast PRP20/SRM1 gene reveals distinct activity domains in the protein product. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 32-44.

Lendvay, T.S., Morris D.K., Sah J., Balasubramanian B., and Lundblad, V. (1996) Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional *EST* genes. *Genetics* **144**, 1399-1412.

Liu, C., Mao, X., et Lustig, A.J. (1994) Mutational analysis defines a C-terminal tail domain of RAP1 essential for telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **138**, 1025-1040.

Loeb, J.D., Schlenstedt, G., Pellman, D., Kornitzer, D., Silver, P.A., et Fink, G.R. (1995) The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 7647-51.

- Loo, S., Fox, C.A., Rine, J., Kobayashi, R., Stillman, B., et Bell, S. (1995) The origin complex in silencing, cell cycle progression, and DNA replication. *Mol. Biol. Cell* **6**, 741-756.
- Louis, E.J. (1995) The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1553-1573.
- Lounsbury, K., Beddow, A., et Macara, I. (1994) A family of proteins that stabilize the Ran/TC4 GTPase in its GTP-bound conformation. *J. Biol. Chem.* **269**, 11285-11290.
- Lustig, A. (1998) Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 233-239.
- Lustig, A.J., Liu, C., Zhang, C., et Hanish, J. (1996) Tethered Sir3p nucleates silencing at telomeres and internal loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2483-2495.
- Marcand, S., Buck, S.W., Moretti, P., Gilson, E., et Shore, D. (1996) Silencing of genes at nontelomeric sites in yeast is controlled by sequestration of silencing factors at telomeres by Rap1 protein. *Genes Dev.* **10**, 1297-1309.
- Marcand, S., Gilson, E., et Shore, D. (1997a) A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**, 986-90.
- Marcand, S., Wotton, D., Gilson, E., et Shore, D. (1997b) Rap1p and telomere length regulation in yeast. *Ciba Foundation Symposium.* **211**, 76-103.
- Marshall, M., Mahoney, D., Rose, A., Hicks, J.B., et Broach J.R. (1987) Functional domains of Sir4, a gene required for position effect regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4441-4452.

Masafumi, N., Hiroshima, M., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M., et Takeharu, N. (1998) When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to  $\gamma$ -Tubulin. *J. Cell Biol.* **143**, 1041-1052.

Melchior, F., Paschal, B., Evans, J., et Gerace, L. (1993) Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J. Cell Biol.* **123**, 1649-1659.

Melese, T., et Xue, Z. (1995) The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 319-324.

Miller, A.M., et Nasmyth, K.A. (1984) Rôle of DNA replication in the repression of silent mating type loci in yeast. *Nature* **312**, 247-251.

Moazed D., and Johnson A.D. (1996) A deubiquinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell* **86**, 667-677.

Moazed, D., Kistler, A., Rine, J., and Johnson, A.D. (1997) Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*; a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 2186-91.

Monson, E.K., de Bruin, D., et Zakian, V.A. (1997) The yeast Cdc13 protein is required for stable inheritance of transcriptionally repressed chromatin at telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 13081-13086.

Moore, M.S., et Blobel, G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into nucleus. *Nature* **365**, 661-663.

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., et Shore D. (1994) Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* **8**, 2257-2269.

Nakashima, N., Hayashi, N., Noguchi, E., et Nishimoto, T. (1996) Putative GTPase Gtr1p genetically interacts with the RanGTPase cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **109**, 2311-2318.

Nishimoto, T., Eilen, E., et Basilico, C. (1978) Premature chromosome condensation in a ts DNA mutant of BHK cells. *Cell* **15**, 475-483.

Nishitani, H., Ohtsubo, M., Yamashita, K., Iida, H., Pines, J., Yasudo, H., Shibata, Y., Hunter, T., et Nishimoto, T. (1991) Loss of RCC1, a nuclear DNA-binding protein, uncouples the completion of DNA replication from the activation of cdc2 protein kinase and mitosis. *EMBO J.* **10**, 1555-1564.

Noguchi E., Hayashi N., Azuma Y., Seki T., Nakamura M., Nakashima N., Yanagida M., He X., Mueller U., Sazer S., et Nishimoto T. (1996) Dis3, implicated in mitotic control, binds directly to Ran and enhances the GEF activity of RCC1. *EMBO J.* **15**, 5595-605.

Noguchi, E., Hayashi, N., Nakashima, N., et Nishimoto T. (1997) Yrb2p, a Nup2p-related yeast protein, has a functional overlap with Rna1p, a yeast Ran-GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2235-2246.

Ohba, T., Seki, T., Azuma, Y., et Nishimoto, T. (1996) Premature chromatin condensation induced by loss of RCC1 is inhibited by GTP- and GTP $\gamma$ S-Ran, but not GDP-Ran. *J. Biol. Chem.* **271**, 14665-14667.

Ohtsubo M., Yoshida T., Seino H., Nishitani H., Clark K.L., Sprague GF Jr., Frasch M., et Nishimoto T. (1991) Mutation of the hamster cell cycle gene RCC1 is complemented by the homologous genes of *Drosophila* and *S.cerevisiae*. EMBO J. **10**, 1265-73.

Oki, M., Noguchi, E., Hayashi, N., et Nishimoto, T. (1998) Nuclear protein import, but not mRNA export, is defective in all *Saccharomyces cerevisiae* mutants that produce temperature-sensitive forms of the Ran GTPase homologue Gsp1p. Mol. Gen. Genet. **257**, 624-634.

Ouspenski, I.I., Mueller U.W., Matynia A., Sazer S., Elledge S.J., et Brinkley B.R. (1995) Ran-binding protein-1 is an essential component of the Ran/RCC1 molecular switch system in budding yeast. J. Biol. Chem. **270**, 1975-1978.

Ouspenski, I.I. (1998) A RanBP1 mutation which does not visibly affect nuclear import may reveal additional functions of the ran GTPase system. Exp. Cell Res. **244**, 171-83.

Palladino, F., Laroche, T., Gilson, E., Axelrod, A., Pillus, L., et Gasser, S.M. (1993) SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. Cell **75**, 543-555.

Pemberton, L.F., et Blobel, G. (1997) Characterization of the Wtm proteins, a novel family of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional modulators with roles in meiotic regulation and silencing. Mol. Cell. Biol. **17**, 4830-4841.

Petes, T.D., et Botstein, D. (1997) Simple mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**, 5091-5095.

Pillus, L. (1997) An uncertain silence. Trends Genet. **13**, 308-313.

Pillus, L., et Rine, J. (1989) Epigenetic inheritance of transcriptional states in *S. cerevisiae*. Cell **59**, 637-647.

Reifsnyder, C., Lowell, J., Clarke, A., et Pillus, L. (1996) Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferase. *Nature Genet.* **14**, 42-49.

Ren M., Drivas, G., D'Eustachio, P., et Rush M.G. (1993) Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *J. Cell Biol.* **120**, 313-323.

Ren, M., Villamarin, A., Shih, A., Coutavas, E., Moore, M.S., LoCurcio, M., Clarke, V., Oppenheim, J.D., D'Eustachio, P., et Rush, M.G. (1995) Separate domains of the Ran GTPase interact with different factors to regulate nuclear protein import and RNA processing. *Mol. Cel. Biol.* **15**, 2117-2124.

Renauld H., Aparico, O.M., Zierath, P.D., Billington, B.L., Chhablani, S.J., *et al.* (1993) Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and SIR3 dosage. *Genes Dev.* **7**, 1133-1145.

Rexach, M., et Blobel, G. (1995) Protein import into nuclei : association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, et nucleoporins. *Cell* **83**, 683-692.

Rine, J., et Herskowitz, I. (1987) Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116**, 9-22.

Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M., and Grunstein, M. (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 14503-14508.

Rush, M.G., Drivas, G., et D'Eustachio, P. (1996) The small nuclear Ran : how does it run? *Bioessays* **18**, 103-111.

Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., et Riggs, A.D. (1996) Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sadowski, I. (1995) Uses for GAL4 expression in mammalian cells. *Genet. Eng. (N Y)*. **17**, 119-48.

Sandell, L.L., et Zakian, V.A. (1993) Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss. *Cell* **75**, 729-739.

Sazer, S. (1996) The search for the primary function of the Ran GTPase continues. *Trends cell Biol.* **6**, 81-85.

Sazer, S., et Nurse, P. (1994) A fission yeast RCC1-related protein is required for mitosis to interphase transition. *EMBO J.* **13**, 606-615.

Scheffzek, K., Klebe, C., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., et Wittinghofer, A. (1995) Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature* **374**, 378-381.

Schlenstedt G., Saavedra C., Loeb J.D., Cole C.N., et Silver P.A. (1995a). The GTP-bound form of the yeast Ran/TC4 homologue blocks nuclear protein import and appearance of poly(A)<sup>+</sup> RNA in the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 225-229.

Schlenstedt, G., Wong, D.H., Koepp, D.M., et Silver, P.A. (1995b) Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *EMBO J.* **14**, 5367-5378.

Shampay, J., Szostak, J.W., et Blackburn, E.H. (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**, 154-157.

Shei, G.J., et Broach, J.R. (1996) Yeast silencers can act as orientation-dependent gene inactivation centers that respond to environmental signals. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3496-3506.

Shore, D. (1994) RAP1 : a protean regulator in yeast. *Trends Genet.* **10**, 408-412.

Shore, D., et Nasmyth, K. (1987) Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* **51**, 721-732.

Singer, M.S., and Gottschling, D.E. (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**, 404-409.

Smith, J.S., et Boeke, J.D. (1997) An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* **11**, 241-254.

Smith, J.S., Brachmann, C.B., Pillus, L., et Boeke, J.D. (1998) Distribution of a limited Sir2 protein pool regulates the strength of yeast rDNA silencing and is modulated by Sir4p. *Genetics* **149**, 1205-1219.

Stone E.M., et Pillus, L. (1996). Activation of an MAP kinase cascade leads to Sir3p hyperphosphorylation and strengthens transcriptional silencing. *J. Cell Biol.* **135**, 571-583.

Stone, E.M., et Pillus, L. (1998) Silent chromatin in yeast : an orchestrated medley featuring sir3p. *Bioessays* **20**, 30-40.

Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K., et Grunstein, M. (1997) Sir2 and Sir4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* **11**, 83-93.

Sussel L., et Shore, D. (1991) Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7749-7753.

Sussel, L., Vannier, D., et Shore, D. (1995) Suppressors of defective silencing in yeast : effects on transcriptional repression at the HMR locus, cell growth and telomere structure. *Genetics* **141**, 873-888.

Tachibana T., Imamoto, N., Seino, H., Nishimoto T., et Yoneda Y. (1994) Loss of RCC1 leads to suppression of nuclear protein import in living cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 24542-24545.

Taura, T., Krebber, H., et Silver, P.A. (1998) A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 7427-7432.

Taura, T., Schlenstedt, G., et Silver P. (1997) Yrb2p is a nuclear protein that interacts with prp20p, a yeast Rcc1 homologue. *J. Biol. Chem.* **272**, 31877-31884.

Thompson, J.S., Ling, X., et Grunstein, M. (1994) Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* **639**, 245-247.

Traglia, H.M., O'Connor, J.P., Tung, K.S., Dallabrida, S., Shen, W.C., et Hopper, A.K. (1996) Nucleus-associated pools of Rna1p, the *Saccharomyces cerevisiae* Ran/TC4 GTPase activating protein involved in nucleus/cytosol transit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 7667-7672.

Triolo, T., et Sternglanz, R. (1996) Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature* **381**, 251-253.

Trueb, J., and Trueb, B. (1992) Molecular cloning of a novel ras-like protein from chicken. *FEBS Lett.* **306**, 181-184.

Tsukamoto, Y., Kato, J-i., et Ikeda, H. (1997) Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **388**, 900-903.

Wade, P.A., Pruss, D., et Wolffe, A.P. (1997) Histone acetylation : chromatin in action. Trends Biochem. Sci. **22**, 128-132.

Watson, J.D. (1972) Origin of concatemeric DNA. Nature **345**, 456-458.

Wotton, D., et Shore, D. (1997) A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev. **11**, 748-760.

Wozniak, R.W., Rout, M.P., et Aitchison, J.D. (1998) Karyopherins and kissing cousins. Trends Cell. Biol. **8**, 184-188.

Yokoyama, N. *et al.* (1995) A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. Nature **376**, 184-188.

Zhang, Z., et Buchman, A.R. (1997) Identification of a member of a DNA-dependent ATPase family that causes interference with silencing. Mol. Cell. Biol. **17**, 5461-5472.