

단 보

THOC5의 분열효모 이종상동체가 생장 및 mRNA export에 미치는 영향

고은진 · 윤진호*

성신여자대학교 생명과학·화학부 및 기초과학연구소

Effects of fission yeast ortholog of THOC5 on growth and mRNA export in fission yeast

Eun-Jin Koh and Jin Ho Yoon*

Basic Science Research Institute, School of Biological Science and Chemistry, Sungshin Women's University, Seoul 01133, Republic of Korea

(Received November 25, 2015; Accepted December 16, 2015)

ABSTRACT: THO/TREX complex plays an important role in transcriptional elongation, mRNA processing, nuclear RNA export, and genome stability. A fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, SPBC577.04 gene encoding the ortholog of THOC5, a component of THO/TREX complex, was identified and characterized. The *S. pombe thoc5* (*spthoc5*) is not essential for both growth and mRNA export, but deletion of the *spthoc5* gene caused growth defect and slight accumulation of poly(A)⁺ RNA in the nucleus. And the functional spThoc5-GFP protein is localized mainly in the nucleus. Co-immunoprecipitation analysis showed that the Hpr1(THOC1) protein, an evolutionally well-conserved component of THO/TREX complex, interacted with spThoc5 as well as Tho2(THOC2), another subunit of THO complex. These results suggest that *S. pombe* Thoc5 as a component of THO/TREX complex is also involved in mRNA export from the nucleus.

Key words: *S. pombe*, mRNA export, THOC5, THO/TREX complex

진핵생물의 핵 안에서 일어나는 전사(transcription) 과정은 pre-mRNA의 가공, 성숙한 mRNP (messenger ribonucleoparticle)의 포장(packaging) 및 세포질로의 방출 등과 긴밀하게 연계되어 조절된다. 이와 같은 유전자 발현의 초기 단계들은 전사과정 동안 RNA 중합효소와의 상호작용을 통해 pre-mRNA로 옮겨가는 많은 단백질 또는 단백질 복합체들에 의해 이루어지며, 각 단계들은 서로 조절된다(Perales and Bentley, 2009; Stewart, 2010). 출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 전사의 신장과정에 관여하는 복합체로 처음 알려진 THO는 RNA 중합효소 II의 가장 큰 소단위인 Rbp1의 인산화된 C-말단 영역(CTD)과 직접 결합함으로써 전사가 활성화된 유전자 부위에 모여든다(Chavez *et al.*, 2000; Meinel *et al.*, 2013). THO 복합체를 불활성화시키면 전사신장에 문제가 생기는데, G/C가 많거나 길고 반복서열이 있는 유전자의 전사가 특히 감

소한다(Li *et al.*, 2005; Voynov *et al.*, 2006). 또한 THO 돌연변이는 유전체의 불안정성을 야기하여 재조합 빈도가 증가하는 표현형(hyper-recombination)을 보인다(Aguillera, 2002; Jimeno *et al.*, 2002; Dominguez-Sanchez *et al.*, 2011). 이것은 THO 복합체에 이상이 생기면 전사된 RNA가 주형 DNA와 결합된 DNA:RNA 혼성체인 R-loop가 축적되고, 이로 인해 재조합수선 기작이 활성화되기 때문이다(Huertas and Aguilera, 2003; Stirling *et al.*, 2012). 한편, THO 복합체는 mRNA 방출에 관여하는 mRNA-결합 단백질인 Sub2 (DEAD box RNA helicase), Yra1 (mRNA 방출인자인 Mex67의 adaptor), 그리고 SR-유사 단백질인 Gbp2, Hrb1 등과 결합하여 TREX (transcription and export)라 불리는 복합체를 형성한다(Strasser *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002; Hurt *et al.*, 2004). TREX는 전사과정 동안 pre-mRNA로 이동하여 결합하는데, 전사된 mRNA가 적절한 mRNP로 포장되는데 관여하는 것으로 여겨진다(Abruzzi *et al.*, 2004). mRNA에 결합한 TREX는 필수적인 mRNA 방출

*For correspondence. E-mail: jhyoon@sungshin.ac.kr;
Tel.: +82-2-920-7675; Fax: +82-2-920-2047

운반체(export receptor)인 Mex67를 불러들임으로써 성숙한 mRNA의 핵에서 세포질로의 방출에 관여한다(Strasser *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002). 이외에도, TREX는 스플라이싱과 전사 신장에 관여하는 Prp19 복합체와도 결합하며(Chanarat *et al.*, 2011), Pcf11과 상호작용을 통해 mRNA의 3' 말단가공에도 관여한다(Rougemaille *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011). 이와 같이 THO/TREX 복합체는 전사 신장을 mRNA 성숙 및 방출 과정과 연계하고 조직화함으로써, 세포질에서 번역될 수 있는 성숙한 mRNP 생성에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다(Luna *et al.*, 2012).

위와 같은 THO 복합체의 기능에 대한 연구는 처음 발견된 출아효모인 *S. cerevisiae*에서 주로 연구되었지만, THO는 식물과 인간을 포함한 고등생물에도 진화적으로 잘 보존되어 있다. 고등생물의 THO/TREX 복합체도 출아효모와 마찬가지로 mRNA 생성 과정과 방출에 관여한다(Katahira *et al.*, 2009; Guria *et al.*, 2011). 하지만 THO/TREX 복합체가 mRNA에 결합하는 방식에는 차이가 있다. 전사 과정 중에 mRNA에 결합하는 출아효모와는 다르게, 사람의 THO/TREX 복합체는 mRNA 가공과정인 짜집기(splicing)와 5'-모자 형성(capping) 과정을 통해 mRNA의 5' 말단 쪽에 결합한다(Masuda *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006). 또한 구성인자에도 차이점이 존재하는데, 출아효모의 THO 복합체는 Tho2 (184 kDa), Hpr1 (88 kDa), Tex1 (47 kDa), Mft1 (45 kDa), Thp2 (33 kDa) 등의 5개 소단위로 구성되어 있는 반면(Chavez *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2012), 고등생물에는 THOC1, THOC2, THOC3, THOC5, THOC6, THOC7 등의 총 6개의 소단위로 구성되어 있다(Rehwinkel *et al.*, 2004; Masuda *et al.*, 2005). 즉, Hpr1 (포유동물에서는 THOC1), Tho2 (THOC2)와 Tex1 (THOC3)만 연구된 대부분의 진핵생물에 잘 보존되어 있고, Mft1과 Thp2는 출아효모에 특이적이고 THOC5, THOC6, THOC7 등은 고등생물에 특이적으로 존재한다. 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*의 유전체 database인 Pombase (www.pombase.org)에서 THO 복합체의 구성인자의 이종상동체(ortholog)를 암호화하는 유전자를 찾아보았다. *S. pombe*에는 진화적으로 잘 보존된 Hpr1 (THOC 1), Tho2 (THOC2), Tex1 (THOC3) 유전자는 존재하였고, 그 외에 SPCC24B10.11c, SPBC577.04 유전자가 존재하였다. SPCC24B10.11c는 출아효모의 Mft1보다는 사람, 생쥐, 초파리의 THOC7과 더 유사하였다(Koh and Yoon, 2014). 본 연구에서는 THO 복합체의 구성인자로 예측되는 open reading frame (ORF)인 SPBC577.04에 대해 알아 보았다. 이 ORF는 인트론이 1개 있으며, 200개 아미노산(aa)으로 이루어진 예상 분자량 23.5 kDa, 등전점이 pH 9.29인 단

백질을 암호화하고 있다. 이 단백질은 포유동물의 THOC5 (683 aa) 보다 작고 전체적인 유사도도 매우 낮지만, 짧은 보존 서열이 존재한다. 그러므로 THOC5의 분열효모 이종상동체(spThoc5로 명명)를 암호화하는 것으로 예측되는 SPBC577.04 유전자가 생장 및 mRNA 방출에 관여하는지, 세포 내 어디에 위치하는지, 그리고 분열효모의 다른 THO 구성요소들과 상호결합 여부를 조사하였다. 본 실험에서는 이전에 기술된 분열효모의 유전학적 방법과 배양 방법을 사용하였다(Moreno *et al.*, 1991; Alfa *et al.*, 1993). 먼저 one-step gene disruption 방법을 사용하여 $\Delta sphoc5$ 결실돌연변이 균주를 제작하였다. 선별유전자로 *ura4⁺*를 사용하여 $\Delta sphoc5::ura4⁺$ DNA 절편을 double-joint PCR 방법으로 제작한 후, 반수체 야생형 균주인 AY217 (*h⁺ leu1-32 ura4-d18*)에 형질전환하였다. 우라실이 빠진 EMM 최소배지에서 자라는 형질전환체들을 얻은 후, 이중 $\Delta sphoc5$ 결실돌연변이를 선별하기 위해 형질전환체의 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. 대조군으로 사용한 야생형인 균주에서는 2.4 kb의 DNA가 증폭되는 것에 비해 3.5 kb의 DNA가 증폭되는 결실돌연변이를 선별하였으며, *ura4⁺*에 존재하는 프라이머와 *sphoc5* 유전자의 5' 쪽 또는 3' 쪽 프라이머를 각각 사용하여 야생형에서는 아무것도 증폭되지 않지만 결실돌연변이에서는 각각 0.8 kb와 0.9 kb DNA가 증폭되는 것도 확인하였다(Fig. 1A). 이렇게 반수체 $\Delta sphoc5$ 결실돌연변이를 얻은 것은 *sphoc5* 유전자가 생장에 필수적이지 않다는 것을 의미한다. *S. pombe* THO 복합체의 구성요소 중 진화적으로 잘 보존된 *hpr1*, *tho2* 유전자는 생존에 필수적이지만(Lee and Yoon, 2012; Koh and Yoon, 2015), 출아효모보다 고등생물과 더 유사한 *sphoc7*처럼 *sphoc5*는 필수적이지 않았다(Koh and Yoon, 2014). 이러한 결과는 분열효모에서 THO 복합체의 모든 구성요소들이 하나의 복합체로 항상 동일한 기능에 관여하지 않거나, 구성요소 각각의 고유 기능이 존재함을 암시한다.

한편 출아효모 *S. cerevisiae*의 THO 복합체의 구성요소들은 모두 최적생장 온도에서는 생장에 아무런 영향을 미치지 않지만, 높은 온도에서는 온도민감성(temperature-sensitivity)을 보인다. 그러므로 다양한 온도에서 $\Delta sphoc5$ 결실돌연변이의 생장을 spot assay로 확인하였다. 대조군인 야생형(WT)에 비해 $\Delta sphoc5$ 결실돌연변이는 측정된 모든 온도(22, 28, 34°C)에서 느린 생장 속도를 보였다(Fig. 1B). 이러한 결과는 *S. cerevisiae*의 THO 복합체와는 다르게 분열효모의 *sphoc5*는 생장에 필수적이지는 않지만, 모든 온도에서 정상적인 생장에 필요하다는 것을 의미한다.

다음으로 spThoc5 단백질이 mRNA의 핵에서 세포질로의 방

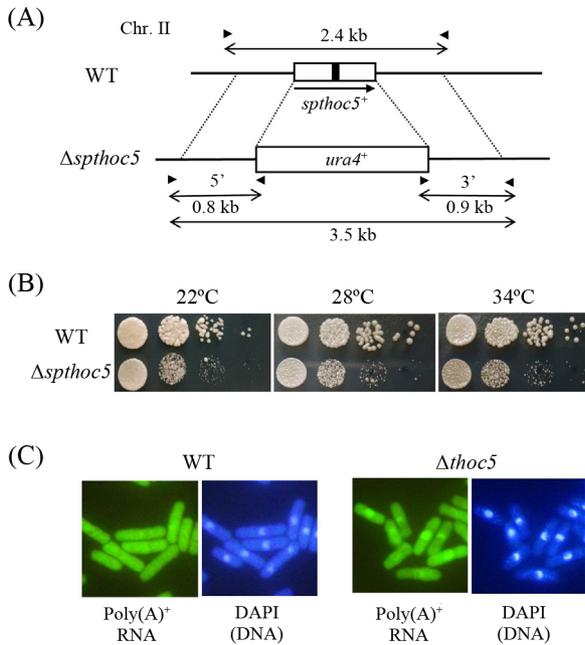


Fig. 1. *S. pombe thoc5 (sphthoc5)* is not essential for growth and mRNA export. (A) A schematic diagram represents the wild-type *sphthoc5* allele and the $\Delta sphthoc5$ deletion allele in *S. pombe*. The entire *sphthoc5* (SPBC 577.04) ORF region was replaced by the marker gene, *ura4+*, using one-step gene disruption method. The *sphthoc5* ORF is shown by an open box and one intron is represented by vertical thick line in the open box. The arrow under the ORF indicates the direction of transcription. The arrowheads mark the positions of PCR primers for confirmation of wild type and deletion allele. The size of PCR products is denoted under or above the arrows. (B) $\Delta sphthoc5$ null mutant cells showed the growth defects. Wild type *sphthoc5+* (WT) cells and $\Delta sphthoc5$ null mutant cells were monitored by spot assay. Cells were serially diluted and spotted on YES plates, and incubated for 5 days at 22°C, 3 days at 28°C, and 2 days at 34°C, respectively. (C) $\Delta sphthoc5$ null mutant cells showed the defect of mRNA export. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium at 28°C. Oligo-(dT)₅₀ carrying an α -digoxigenin at the 3' end was used as the hybridization probe. FITC-anti-digoxigenin Fab antibody was used for detecting the hybridization probe by fluorescence microscopy. The DNA was coincidentally stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and shown in the right panels.

출에 관여하는지 알아보고자 fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 방법을 사용하였다(Yoon *et al.*, 2000). Fig. 1C에서 보듯이 세포 내의 poly(A)⁺ RNA의 분포는 야생형 균주에서는 정상적으로 세포 전체에 거의 균일하게 분포하였다. 반면, $\Delta sphthoc5$ 결실돌연변이 균주에서는 핵 안에 poly(A)⁺ RNA가 약간 더 축적되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 분열효모의 THOC5 상동체도 정상적인 bulk mRNA의 방출에 필요하다는 것을 의미한다. 이렇게 *sphthoc5* 유전자가 결실되면 성장과 mRNA 방출에 결함을 보이므로, 반대로 과발현(over-expression) 되는 경우에도 표현형에 영향을 미치는지를 알아보았다. 강력한 야생형 *nmt1* 프로모터를 이용하여 spThoc5 단백질이 정

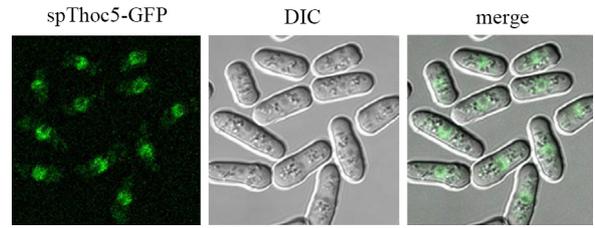


Fig. 2. Localization of spThoc5 protein fused to GFP. spThoc5 was tagged with GFP at its carboxyl-terminus (spThoc5-GFP). The *sphthoc5-gfp* fusion was integrated at the *sphthoc5* locus, and the localization of the fusion protein was determined. Cells were grown in appropriately supplemented EMM medium at 28°C. Green fluorescent image (GFP) and coincident differential interference contrast image (DIC), and the merged image of both are shown.

상보다 훨씬 많이 과발현되는 균주를 제작하였다. 하지만, *sphthoc5* 유전자가 과발현되더라도 성장에 아무런 영향이 없었으며, FISH를 통한 poly(A)⁺ RNA의 분포도 정상적이었다(자료 미제시).

spThoc5 단백질의 세포 내 위치를 알아보기 위하여 GFP 유전자를 *sphthoc5*의 ORF의 3' 말단에 붙인 *sphthoc5-gfp::kan'* DNA 절편을 제작한 후 야생형 반수체 균주인 AY217에 형질 전환하여 *sphthoc5* 유전자 위치에 삽입하였다. 이렇게 제작한 균주는 성장과 poly(A)⁺ RNA 분포가 야생형 균주와 거의 차이가 없기 때문에 spThoc5-GFP 융합단백질이 정상적인 기능을 하는 것으로 여겨진다(자료 미제시). 이 균주에서 spThoc5-GFP의 세포 내 위치를 형광현미경으로 관찰한 결과, 세포질에서도 약간 존재하였지만 대부분 핵 안에서 관찰되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 핵 안에서 역할을 하는 THO/TREX 복합체를 고려하면 spThoc5가 THO/TREX 복합체의 구성요소라는 가정과 잘 부합한다.

출아효모의 THOC5의 상동체가 핵 안에 주로 존재하고 정상적인 성장과 mRNA 방출에 관여하므로, 실제로 다른 THO/TREX 구성요소와 상호결합 하는지를 알아보기 위해 TAP (Tandem Affinity Purification) 방법을 사용하였다(Puig *et al.*, 2001). 이를 위해 주요 THO/TREX 구성요소인 *sphpr1* ORF의 3' 말단에 TAP tag을 붙인 *sphpr1-tap::kan'* DNA 절편을 제작한 후, *sphpr1* 유전자 위치에 삽입하여 spHpr1-Tap 균주를 제작하였다(Gould *et al.*, 2004). TAP tag에는 Protein A와 CBP (Calmodulin binding peptide) tag이 연속적으로 존재한다(Rigaut *et al.*, 1999). 한편 spThoc5를 포함하여 THO/TREX 구성요소로 알려진 spTho2와 spThoc7 단백질의 N' 말단에는 HA tag을 붙이기 위해 pSLF273 벡터에 각 유전자의 ORF를 클로닝하였다(Forsburg and Sherman, 1997). 제작된 균주와 벡터들은 DNA 염기서열 분석을 통해 이상이 없음을

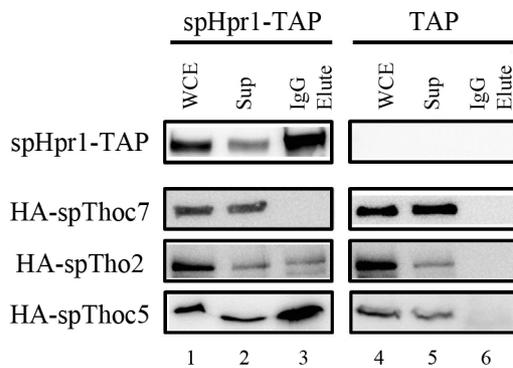


Fig. 3. Association of spThoc5 with spHpr1 in *S. pombe* extracts. The spHpr1-Tap and Tap (control) cells were transformed with HA-spTho2, HA-spThoc5, and HA-spThoc7 plasmids, respectively. The TAP tag consists of two IgG binding domains of *S. aureus* protein A (ProtA) and a calmodulin binding peptide (CBP) separated by a TEV protease cleavage site. Input extracts from strains expressing spHpr1-Tap fusion (lane 1) or Tap (lane 4) are denoted. Tap or spHpr1-Tap associated proteins were captured on IgG-Sepharose beads and separated on SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane and detected by Western blot using antibodies against HA or protein A. Input whole cell extracts (WCE), supernatants (Sup), and eluents from IgG bead (IgG Elute) are shown as indicated.

확인하였다. 이렇게 확인된 벡터들을 spHpr1-Tap 균주 그리고 대조균으로 사용될 spHpr1-Tap 단백질이 발현되지 않은 균주(Tap)에 각각 형질전환하였다. 형질전환체로부터 얻은 세포 추출물을 사용하여 spHpr1-Tap 단백질을 IgG-Sepharose beads로 포획하였다. 포획된 spHpr1-Tap 단백질과 결합한 HA-단백질을 Western blotting으로 분석함으로써, 각각의 단백질들이 서로 물리적으로 상호작용을 하는지를 알아보았다. 대조균에는 spHpr1-Tap 단백질이 발현되지 않으므로, HA-tagged 단백질은 정상적으로 발현되었지만 어느 단백질도 IgG-Sepharose beads로 포획되지 않았다(Fig. 3, lanes 4-6). 반면, spHpr1-Tap 단백질이 IgG beads에 포획된 경우, HA-spThoc7는 같이 포획되지는 않았지만 HA-spTho2와 HA-spThoc5는 같이 포획되었다(Fig. 3, lanes 1-3). 특히 HA-spThoc5 단백질이 HA-spTho2보다 더 많이 포획되었다. 이 결과들은 분열효모의 spThoc5 단백질은 spHpr1 단백질과 강하게 결합한다는 것을 의미한다. 앞선 모든 결과들을 종합하면 spThoc5는 분열효모에서도 THO/TREX 복합체의 구성요소로서 성장과 mRNA 방출에 관여한다는 것을 보여준다.

적 요

THO/TREX 복합체는 전사 신장, mRNA 가공 및 방출, 그리고 유전체 안정성에 중요한 역할을 담당한다. 분열효모

*Schizosaccharomyces pombe*에서 THO/TREX 복합체의 한 구성요소인 THOC5의 이중상동체를 암호화하고 있는 SPBC 577.04 유전자를 찾아, 그것의 기능을 분석하였다. *S. pombe thoc5* (*spthoc5*) 유전자는 성장과 mRNA의 방출에 필수적이지는 않지만, 결실돌연변이는 야생형에 비해 성장 결함을 보였고 poly(A)⁺ RNA도 핵 안에 약간 축적되는 현상을 보였다. 또한 정상적인 기능을 가진 spThoc5-GFP 단백질은 주로 핵 안에 존재하였다. Co-immunoprecipitation 분석에서 진화적으로 잘 보존된 THO/TREX 복합체의 주요 구성인자인 Hpr1 (THOC1)는 또 다른 구성인자인 Tho2 (THOC2) 뿐만 아니라 spThoc5와도 상호작용을 하였다. 이와 같은 결과들은 *S. pombe*의 Thoc5 상동체도 THO/TREX 복합체의 구성인자로 mRNA 방출에 관여하고 있음을 시사한다.

감사의 말

이 논문은 2013년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Abruzzi, K.C., Lacadie, S., and Rosbash, M. 2004. Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *EMBO J.* **23**, 2620-2631.
- Aguilera, A. 2002. The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J.* **21**, 195-201.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., Mcleod, M., and Warbrick, E. 1993. Experiments with Fission Yeast. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Chanarat, S., Seizl, M., and Strässer, K. 2011. The Prp19 complex is a novel transcription elongation factor required for TREX occupancy at transcribed genes. *Genes Dev.* **25**, 1147-1158.
- Chavez, S., Beilharz, T., Rondon, A.G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svestrup, J.Q., Lithgow, T., and Aguilera, A. 2000. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**, 5824-5834.
- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C.S., Hsu, J.L., Dias, A., and Reed, R. 2006. Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* **127**, 1389-1400.
- Dominguez-Sanchez, M.S., Barroso, S., Gomez-Gonzalez, B., Luna, R., and Aguilera, A. 2011. Genome instability and transcription elongation impairment in human cells depleted of THO/TREX. *PLoS Genet.* **7**, e1002386.

- Forsburg, S.L. and Sherman, D.A. 1997. General purpose tagging vectors for fission yeast. *Gene* **191**, 191–195.
- Gould, K.L., Ren, L., Feoktistova, A.S., Jennings, J.L., and Link, A.J. 2004. Tandem affinity purification and identification of protein complex components. *Methods* **33**, 239–244.
- Guria, A., Tran, D.D., Ramachandran, S., Koch, A., El Bounkari, O., Dutta, P., Hauser, H., and Tamura, T. 2011. Identification of mRNAs that are spliced but not exported to the cytoplasm in the absence of THOC5 in mouse embryo fibroblasts. *RNA* **17**, 1048–1056.
- Huertas, P. and Aguilera, A. 2003. Cotranscriptionally formed DNA: RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol. Cell* **12**, 711–721.
- Hurt, E., Luo, M.J., Röther, S., Reed, R., and Strässer, K. 2004. Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1858–1862.
- Jimeno, S., Rondon, A.G., Luna, R., and Aguilera, A. 2002. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J.* **21**, 3526–3535.
- Johnson, S.A., Kim, H., Erickson, B., and Bentley, D.L. 2011. The export factor Yra1 modulates mRNA 3' end processing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1164–1171.
- Katahira, J., Inoue, H., Hurt, E., and Yoneda, Y. 2009. Adaptor Aly and co-adaptor Thoc5 function in the Tap-p15-mediated nuclear export of HSP70 mRNA. *EMBO J.* **28**, 556–567.
- Koh, E. and Yoon, J.H. 2014. Effects of spThoc7 deletion on growth and mRNA export in fission yeast. *Korean J. Microbiol.* **50**, 249–253.
- Koh, E. and Yoon, J.H. 2015. Effects of Tho2, a component of THO complex, on growth and mRNA export in fission yeast. *Korean J. Microbiol.* **51**, 181–185.
- Lee, H. and Yoon, J.H. 2012. Effects of the repression of sphpr1 expression on growth and mRNA export in fission yeast. *Korean J. Microbiol.* **48**, 171–174.
- Li, Y., Wang, X., Zhang, X., and Goodrich, D.W. 2005. Human hHpr1/p84/Thoc1 regulates transcriptional elongation and physically links RNA polymerase II and RNA processing factors. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4023–4033.
- Luna, R., Rondón, A.G., and Aguilera, A. 2012. New clues to understand the role of THO and other functionally related factors in mRNP biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1819**, 514–520.
- Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., and Reed, R. 2005. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev.* **19**, 1512–1517.
- Meinel, D.M., Burkert-Kautsch, C., Kieser, A., O'Duibhir, E., Siebert, M., Mayer, A., Cramer, P., Söding, J., Holstege, F.C., and Sträßer, K. 2013. Recruitment of TREX to the transcription machinery by its direct binding to the phospho-CTD of RNA polymerase II. *PLoS Genet.* **9**, e1003914.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795–823.
- Peña, A., Gewartowski, K., Mroczek, S., Cuéllar, J., Szykowska, A., Prokop, A., Czarnocki-Cieciura, M., Piwowarski, J., Tous, C., Aguilera, A., et al. 2012. Architecture and nucleic acids recognition mechanism of the THO complex, an mRNP assembly factor. *EMBO J.* **31**, 1605–1616.
- Perales, R. and Bentley, D. 2009. “Cotranscriptionality”: the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Mol. Cell* **36**, 178–191.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218–229.
- Rehwinkel, J., Herold, A., Gari, K., Köcher, T., Rode, M., Ciccarelli, F.L., Wilm, M., and Izauralde, E. 2004. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the THO complex in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 558–566.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1030–1032.
- Rougemaille, M., Dieppois, G., Kisseleva-Romanova, E., Gudipati, R.K., Lemoine, S., Blugeon, C., Boulay, J., Jensen, T.H., Stutz, F., Devaux, F., et al. 2008. THO/Sub2p functions to coordinate 3'-end processing with gene-nuclear pore association. *Cell* **135**, 308–321.
- Stewart, M. 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 609–617.
- Stirling, P.C., Chan, Y.A., Minaker, S.W., Aristizabal, M.J., Barrett, I., Sipahimalani, P., Kobor, M.S., and Hieter, P. 2012. R-loop-mediated genome instability in mRNA cleavage and polyadenylation mutants. *Genes Dev.* **26**, 163–175.
- Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodríguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., et al. 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**, 304–308.
- Voynov, V., Vestrepen, K.J., Jansen, A., Runner, V.M., Buratowski, S., and Fink, G.R. 2006. Genes with internal repeats require the THO complex for transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 14423–14428.
- Yoon, J.H., Love, D., Guhathakurta, A., Hanover, J.A., and Dhar, R. 2000. Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* interacts with Rae1p in mediating mRNA export. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8767–8782.
- Zenkhusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.C., and Stutz, F. 2002. Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8241–8253.