

Note

## 분열효모에서 THO 복합체의 구성요소인 Tex1/THOC3가 생장 및 mRNA 방출에 미치는 영향

배수정 · 고은진 · 윤진호\*

성신여자대학교 생명과학·화학부

### Effect of Tex1/THOC3, a component of THO complex, on growth and mRNA export in fission yeast

Soo Jeong Bae, Eun-Jin Koh, and Jin Ho Yoon\*

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

(Received November 22, 2017; Revised December 11, 2017; Accepted December 12, 2017)

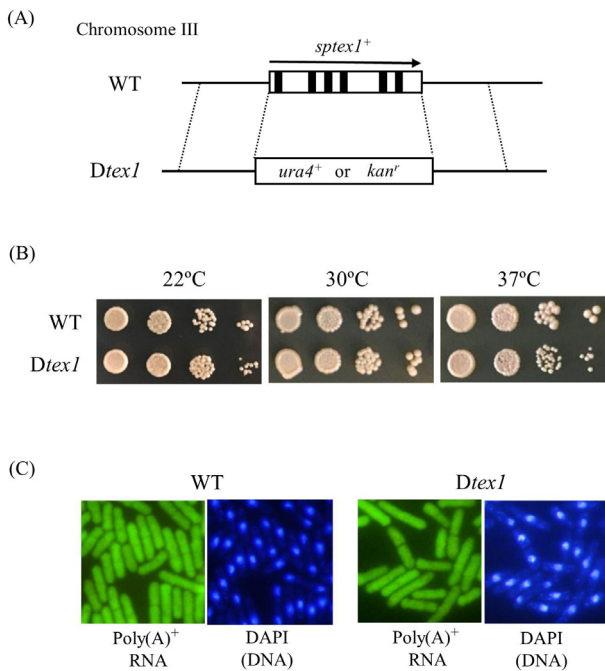
In eukaryote, THO/TREX complex plays a critical role in transcriptional elongation, pre-mRNA processing, and nuclear mRNA export. This complex is evolutionally well-conserved, but there are some differences in composition and function according to organisms. Here we showed that spTex1, a component of THO/TREX complex, is not essential for growth and mRNA export in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, which is more similar to higher eukaryote than budding yeast. Deletion and overexpression of the *spTex1* gene do not lead to any detectable growth phenotype and accumulation of poly(A)<sup>+</sup> RNA in the nucleus. And the spTex1-GFP protein is localized mainly in the nucleus. Yeast two-hybrid and Co-immunoprecipitation analysis showed that the spTex1 protein interacted with spHpr1 (THOC1) and spTho2 (THOC2), main subunits of THO complex. We conclude that the *S. pombe* Tex1 is a component of THO/TREX complex, but does not play important roles in growth and bulk mRNA export from the nucleus.

**Keywords:** *Schizosaccharomyces pombe*, mRNA export, Tex1/THOC3, THO/TREX complex

진핵생물에서 단백질을 암호화하고 있는 유전자는 RNA 중합효소 II에 의해 pre-mRNA로 전사되고 mRNA 가공(5' 캡핑, 스플라이싱, 3' 절단 및 폴리아데닐화) 과정을 거친 후 핵공 복합체(nuclear pore complex)를 통해 핵에서 세포질로 방출된다. mRNA는 핵 안에서 전사되는 순간부터 수많은 단백질들이 결합하여 mRNP (messenger ribonucleoprotein) 복합체를 형성하며, 결합 단백질들은 mRNA의 생성, 성숙, 방출 등에 관여한다(Stewart, 2010). 유전자 발현의 각 단계가 진행되면서 mRNA 분자의 변형과 함께 mRNA에 결합하는 특이적 단백질들의 조합도 달라지므로, mRNP는 고정된 것이 아니라 역동적으로 변하는 조성 및 구조를 가진다(Rodriguez-Navarro and Hurt, 2011; Katahira, 2015). 이렇게 복잡한 일련의 유전자 발현과정들은 조절되고 조직화되어 서로 영향을 주고 받는데, TREX (Transcription and Export)는 mRNA에 결합하는 다중 단백질 복합체로 유전자 발현과정에 핵심적인 역할을 담당한다(Heath, 2016).

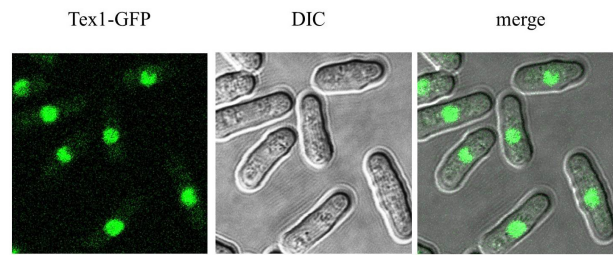
출아효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 초파리(*Drosophila*), 애기장대(*Arabidopsis*), 개구리(*Xenopus*), 사람 등 대부분의 진핵생물에 보존되어 있는 TREX는 THO 복합체와 추가적인 인자들로 나눌 수 있다. THO 복합체는 출아효모인 *S. cerevisiae*에서 전사 신장과정에 중요한 역할을 담당하는 것으로 처음 알려졌는데, RNA 중합효소 II의 인산화된 C-말단 영역(CTD)과 직접 결합함으로써 전사가 활성화된 유전자 부위에 모여든

\*For correspondence. E-mail: [jhoyoon@sungshin.ac.kr](mailto:jhoyoon@sungshin.ac.kr);  
Tel.: +82-2-920-7675; Fax: +82-2-920-2047



**Fig. 1. *S. pombe* Tex1/THOC3 (*sptex1*) is not essential for growth and mRNA export.** (A) A schematic diagram shows the wild-type *sptex1* allele and the knockout allele ( $\Delta sptex1$ ) in *S. pombe*. The entire *sptex1* (SPCC18B5.10c) coding region was substituted with the marker genes, *ura4<sup>+</sup>* or *kan<sup>r</sup>*, using one-step gene disruption method. The coding region is represented by an open box and six introns are indicated by vertical thick line in the open box. The arrow above the *sptex1* allele shows the direction of transcription. (B)  $\Delta sptex1$  deletion did not lead to any detectable growth defects. Wild type *sptex1<sup>+</sup>* (WT) cells and  $\Delta sptex1$  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 30°C, and 37°C, respectively. (C) The  $\Delta sptex1$  null mutant cells showed no defect of mRNA export. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium at 30°C and fixed. FISH for poly(A)<sup>+</sup> RNA were performed using Oligo-(dT)<sub>50</sub> labelled with an  $\alpha$ -digoxigenin at the 3' end as the hybridization probe, and using FITC-anti-digoxigenin Fab antibody for detecting the hybridization probe. DAPI staining are used to identify the nucleus in the right panels.

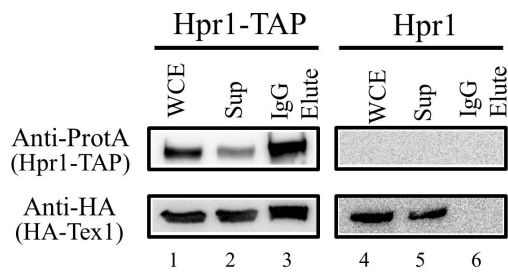
다(Chavez *et al.*, 2000; Meinel *et al.*, 2013). 그 후 THO는 mRNA 방출인자인 Yra1 (RNA-결합 단백질) 및 Sub2 (DEAD box RNA helicase)와 함께 TREX 복합체를 형성하여 mRNA에 결합하고, mRNA 방출운반체(export receptor)인 Mex67-Mtr2를 mRNP에 불러들여 성숙한 mRNA의 방출에 관여함이 밝혀졌다(Strasser *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002). TREX 복합체는 이외에도 mRNA의 가공과정에 관여하는 여러 단백질과도 결합하는 것이 알려짐으로써(Rougemille *et al.*, 2008; Chanarat *et al.*, 2011), TREX가 유전자 발현의 높은 정확도를 유지하도록 mRNA 생성, 가공, 방출 등의 각 단계들을 통합 조절하는 인터페이스로 작용하는 것으로 추정된다.



**Fig. 2. Localization of spTex1 protein fused to GFP.** spTex1 was tagged with GFP at its carboxyl-terminus (spTex1-GFP). The *sptex1-gfp::kan<sup>r</sup>* DNA fragment was integrated at the *sptex1* gene locus, and the localization of the fusion protein was determined by confocal microscope. Green fluorescent image (GFP) and coincident differential interference contrast image (DIC), and the merged image of both are shown.

흥미롭게도 진화적으로 보존된 TREX 복합체는 연구된 생명체에서 모두 유전자 발현에 중요한 역할을 담당하지만, 출아효모와 고등생물체의 TREX는 조성과 기능에서 차이를 보인다. THO 구성요소 중에서 핵심 소단위의 이종상동체(ortholog)인 Hpr1(출아효모)/THOC1(고등생물체)와 Tho2/THOC2, 그리고 Tex1/THOC3는 대부분의 진핵생물에서 잘 보존되어 있지만, Mft1와 Thp2는 출아효모에만 특이적이고 고등생물체는 대신 THOC5, THOC6, THOC7가 특이적으로 존재한다(Strasser *et al.*, 2002; Rehwinkel *et al.*, 2004). THO 이외에 TREX를 구성하는 인자도 Yra1/ALY (REF, THOC4), Sub2/UAP56 (DDX39B), Tho1/SARNP 등은 공통적이지만, 고등생물에서 발견되는 CHTOP, POLDIP3와 ZC3H11A 등은 출아효모에서는 발견되지 않는다(Heath, 2016). 또한 RNA 중합효소 II와 직접적인 결합을 통해 mRNA로 결합하는 출아효모와는 다르게, 고등생물의 THO/TREX는 RNA 중합효소 II와는 상호작용이 없고 대신 스플라이싱과 연관된 Exon junction complex와 캡-결합 단백질(CBC20과 CBC80)과의 상호작용을 통해 pre-mRNA에 결합한다(Masuda *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006).

분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*의 유전체 데이터베이스인 PomBase ([www.pombase.org](http://www.pombase.org))에서 THO 복합체의 구성인자를 찾아보면, 진화적으로 보존된 Hpr1/THOC 1, Tho2/THOC2, Tex1/THOC3 등은 역시 존재하지만 출아효모 특이적인 Mft1과 Thp2의 이종상동체는 존재하지 않고 고등생물 특이적인 THOC5와 THOC7 이종상동체가 존재하였다(Koh and Yoon, 2015). 본 연구에서는 THO 복합체의 구성인자 중 아직 연구하지 않은 Tex1/THOC3의 분열효모 이종상동체(spTex1으로 명명)를 암호화하는 SPCC18B5.10c 유전자가 생장 및 mRNA 방출에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 spTex1 단백질이 세포 어디에 위치하는지, 그리고 실제로 THO/TREX



**Fig. 3. Association of spTex1 with spHrp1 in *S. pombe* extracts.** The spHrp1-Tap and spHrp1 (control) cells were transformed with HA-spTex1 plasmid. Whole cell extracts from the strains expressing spHrp1-Tap fusion (lane 1) or spHrp1 (lane 4) are denoted. The spHrp1-Tap associated proteins were captured on IgG-Sepharose beads and separated on SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane. Western blot were performed 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.

복합체의 구성인자인지 조사하였다. *S. pombe*의 3번 염색체에 존재하는 SPCC18B5.10c 유전자는 인트론이 6개 있으며 (Fig. 1A), 예상 분자량 35.04 kDa, 등전점이 pH5.21인 단백질을 암호화하고 있다. 309개 아미노산으로 이루어진 이 단백질은 대부분 영역이 여러 단백질과의 결합에 관여하는 것으로 알려진 WD40 도메인을 형성하고 있다. NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 다중서열정렬 (multiple sequence alignment) 도구인 COBALT를 사용하여 분석하면, spTex1는 출아효모의 Tex1보다 고등생물의 THOC3 단백질과 더 유사하다.

먼저 SPCC18B5.10c 유전자가 성장 및 mRNA 방출에 미치는 영향을 알아보기 위해,  $\Delta sptex1$  결실돌연변이 균주를 제작하였다. 반수체 야생형 균주인 AY217 (*h leu1-32 ura4-d18*)에 선별유전자로 *ura4<sup>+</sup>* 또는 *kan<sup>r</sup>* 유전자를 사용하여  $\Delta sptex1::ura4<sup>+</sup>$  또는  $\Delta sptex1::kan<sup>r</sup>$  결실돌연변이를 제작하여 선별하였다 (Fig. 1A). 이렇게 별개의 반수체  $\Delta sptex1$  결실돌연변이를 모두 얻음으로써, *sptex1* 유전자가 성장에 필수적이지 않다는 것을 확인하였다. 다양한 온도에서  $\Delta sptex1$  결실돌연변이의 성장을 spot assay로 확인한 결과, 측정된 모든 온도(22, 34, 37°C)에서 대조균인 야생형(WT)과 비슷하게 정상적인 성장 속도를 보였다(Fig. 1B). 다음으로 fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 방법을 사용하여(Yoon et al., 2000), spTex1 단백질이 mRNA의 핵에서 세포질로의 방출에 관여하는지 알아보았다. 야생형(WT) 균주의 poly(A)<sup>+</sup> RNA의 분포는 세포 전체에 거의 균일하게 퍼져 있는데,  $\Delta sptex1$  결실돌연변이 균주에서도 비슷한 양상이 관찰되었다(Fig. 1C). 즉,  $\Delta sptex1$  결실돌연변이 균주도 bulk mRNA의 방출에는 이상이 없다는 것을 의미

**Table 1. Yeast two-hybrid analysis**

AD-	BD-	His3 expression	AD-	BD-	His3 expression
<sup>a</sup> X	Tex1	-	Tex1	X	-
Hrp1	Tex1	+	Tex1	Hrp1	+
Tho2	Tex1	+	Tex1	Tho2	+
THOC5	Tex1	-	Tex1	THOC5	-
THOC7	Tex1	-	Tex1	THOC7	+
Uap56	Tex1	-	Tex1	Uap56	-
Mlo3	Tex1	-	Tex1	Mlo3	-
Mex67	Tex1	-	Tex1	Mex67	-
Rae1	Tex1	-	Tex1	Rae1	+
Sac3	Tex1	-	Tex1	Sac3	-
Pci2	Tex1	-	Tex1	Pci2	-
Dss1	Tex1	-	Tex1	Dss1	+
Cdc31	Tex1	-	Tex1	Cdc31	-
Sus1	Tex1	-	Tex1	Sus1	+

<sup>a</sup>X indicates the empty vector.

한다. 이전 연구에서 *S. pombe* THO 복합체의 구성요소 중 진화적으로 잘 보존된 *hrp1*와 *tho2* 유전자는 생존과 bulk mRNA의 방출에 필수적이고(Lee and Yoon, 2012; Koh and Yoon, 2015), *thoc5*와 *thoc7*는 필수적이지 않지만 결실되면 성장과 mRNA의 방출에 영향을 미친다는 것을 관찰하였다(Koh and Yoon, 2014). 이러한 결과들은 *S. pombe* THO 복합체의 다른 구성요소들과는 다르게 Tex1/THOC3 상동체는 성장과 bulk mRNA의 방출에 별다른 영향을 미치지 않는 것을 보여준다. 또한 분열효모의 THO 복합체는 모든 구성요소들이 항상 하나의 복합체로 작용하지 않거나 복합체 내에서 역할이 다르다는 것도 암시한다. *sptex1* 유전자의 결실이 성장과 mRNA 방출에 영향을 주지 않았으므로, 반대로 *sptex1*를 과발현(over-expression)시키면 표현형에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 강력한 야생형 *nmt1* 프로모터를 가진 pREP3X 벡터를 이용하여, spTex1 단백질을 정상적인 상황보다 훨씬 많이 과발현하는 균주를 제작하였다. 하지만 *sptex1* 유전자가 과발현되더라도 성장 및 mRNA 방출은 야생형 균주와 별다른 차이가 없이 정상적이었다(자료 미제시).

spTex1 단백질의 세포 내 위치를 알아보기 위하여 GFP 유전자를 *sptex1*의 ORF의 3' 말단에 붙인 *sptex1-gfp::kan<sup>r</sup>* DNA 절편을 제작한 후 반수체인 야생형 균주인 AY217에 형질전환하여 *sptex1* 유전자 위치에 삽입된 균주를 선별하였다. 공초점 현미경으로 spTex1-GFP가 발현되는 균주를 관찰한 결과, spTex1-GFP 단백질은 대부분 핵 안에서 존재하였다(Fig. 2).

전사, mRNA 가공 및 방출에 관여하는 THO/TREX 복합체의 역할은 핵 안에 한정된다는 것을 고려하면, spTex1가 THO/TREX 복합체의 구성요소라는 가정을 지지하는 결과이다.

Tex1/THOC3의 출아효모 상동체가 정상적인 생장과 mRNA 방출에 직접적으로 관여하지 않는 것으로 보이므로, 실제로 다른 THO/TREX 및 TREX-2 구성요소와 상호결합하는지를 알아보기 위해 yeast two-hybrid (Y2H) 분석을 하였다. 이를 위해 이 유전자들의 cDNA를 각각 *lexA* 작동자의 DNA 결합 영역(BD)을 가진 pTlexA4 벡터, 그리고 GAL4 활성화 영역(AD)을 가진 pGAD424 벡터(Clontech Laboratories, Inc.)에 클로닝하였다. 이렇게 제작된 벡터들은 DNA 염기서열 분석을 통해 이상이 없음을 확인하였다. 제작한 벡터들을 L40 균주(*MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS::4lexAop-HIS3 URA3::8lexAop-LacZ GAL4*)에 형질전환하였다. 먼저 GAL4 활성화 영역과 융합된 spTex1 (AD-*Tex1*) 또는 *lexA* 작동자의 DNA 결합 영역(BD)과 융합된 spTex1 (BD-*Tex1*)이 홀로 존재할 때, 리포터인 *His3* 유전자를 발현시키지 못하는 것을 확인하였다. AD-*Tex1*과 BD-X (DNA 결합 영역을 가진 빈 pTlexA4 벡터)를 함께 가진 형질전환체, 그리고 AD-X (활성화 영역을 가진 빈 pGAD424 벡터)와 BD-*Tex1*를 함께 가진 경우 기대한 바와 같이 모두 *His3* 유전자가 발현되지 않았다 (Table 1). Y2H 분석 결과는 Tex1이 THO/TREX 구성인자 중 Hpr1/THOC1과 Tho2/THOC2에 각각 상호작용하는 것으로 나타났다. 다른 THO/TREX 및 TREX-2 구성인자들과는 상호작용하지 않는다는 것을 확인하였다. AD-*Tex1*과 BD-THOC7, BD-Rae1, BD-Dss1, BD-Sus1의 조합에서 각각 *His3* 유전자가 발현되었지만, THOC7, Rae1, Dss1, Sus1은 DNA 결합 영역에 융합되었을 때, AD-*Tex1* 없이도 홀로 *His3* 유전자를 발현시킬 수 있었으므로(Bae and Yoon, 2017), Tex1과의 상호작용의 결과로 해석할 수 없었다. Tex1과 Hpr1/THOC1와의 상호결합을 더 확인하기 위해, 공동침전(co-immunoprecipitation, Co-IP) 실험을 수행하였다. 이를 위해 *spHpr1* cDNA의 3' 말단에 TAP tag를 붙인 *spHpr1-tap::kan<sup>r</sup>* DNA 절편이 *sphpr1* 유전자 위치에 삽입된 Hpr1-TAP 균주를 사용하였다(Koh and Yoon, 2015). 한편 spTex1 단백질의 N' 말단에는 HA tag를 붙이기 위해 pSLF273 벡터에 이 유전자의 cDNA를 클로닝하였다(Forsburg and Sherman, 1997). 이 벡터를 Hpr1-TAP 균주 그리고 spHpr1-Tap 단백질이 발현되지 않은 대조균 균주(Hpr1)에 각각 형질전환하였다. 형질전환된 두 균주에서 세포 추출물을 추출하여 spHpr1-Tap 단백질을 IgG-Sepharose beads로 포획하였다. 대조균에는 spHpr1-Tap 단백질이 발현되지 않으므로, HA로 표지된 spTex1 단백질이 정상적으로 발

현되더라도(Fig. 3, Lane 4), IgG-Sepharose beads로 포획되지 않았다(Fig. 3, Lane 6). 반면, spHpr1-Tap 단백질이 IgG beads에 포획된 경우, HA-spTex1은 같이 포획되었다(Fig. 3, Lanes 1~3). 이 결과는 분열효모의 spTex1 단백질이 spHpr1 단백질과 강하게 결합한다는 것을 의미한다. Y2H와 Co-IP 결과들을 종합하면 spTex1도 분열효모에서 THO/TREX 복합체의 구성요소임을 강력히 시사한다.

## 적 요

진핵생물에서 THO/TREX 복합체는 전사 신장, pre-mRNA 가공 및 mRNA의 핵에서 방출에 중요한 역할을 담당한다. 이 복합체는 진화적으로 잘 보존되어 있지만, 생명체에 따라 구성성과 기능에 차이가 존재한다. 이 논문에서는 출아효모보다는 고등생물과 더 유사한 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에서 THO/TREX 복합체의 한 구성요소인 spTex1가 생장과 mRNA의 방출에 필수적이지 않다는 것을 보였다. *spTex1* 유전자의 결실과 과발현 어느 것도 생장의 결함과 poly(A)<sup>+</sup> RNA가 핵 안에 축적되는 현상을 거의 보이지 않았다. 또한 spTex1-GFP 단백질은 주로 핵 안에 위치하였다. Yeast two-hybrid와 Co-immunoprecipitation 분석에서 *S. pombe* Tex1은 THO/TREX 복합체의 주요 구성인자인 spHpr1 (THOC1), spTho2 (THOC2)과 상호작용을 하였다. 이와 같은 결과들은 *S. pombe*의 Tex1도 THO/TREX 복합체의 구성인자이지만, 생장과 mRNA 방출에는 중요한 역할을 하지 않음을 의미한다.

## 감사의 말

이 논문은 2015년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

## References

- Bae, S.J. and Yoon, J.H. 2017. Effects of Sus1, a component of TREX-2 complex, on growth and mRNA export in fission yeast. *Korean J. Microbiol.* **53**, 49-54.
- 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., Svejstrup, 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.
- Heath, C.G., Viphakone, N., and Wilson, S.A.** 2016. The role of TREX in gene expression and disease. *Biochem. J.* **473**, 2911–2935.
- Katahira, J.** 2015. Nuclear export of messenger RNA. *Gene* **6**, 163–184.
- 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.
- 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-Kautzsch, 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.
- Rehwinkel, J., Herold, A., Gari, K., Köcher, T., Rode, M., Ciccarelli, F.L., Wilm, M., and Izaurralde, E.** 2004. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the THO complex in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 558–566.
- Rodríguez-Navarro, S. and Hurt, E.** 2011. Linking gene regulation to mRNA production and export. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 302–309.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.C., and Stutz, F.** 2002. Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8241–8253.