

Thèse présentée par

Anne Keriél

pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg I)
Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Implications de la kinase de TFIIH dans les
mécanismes de régulation de la transcription**

Soutenue publiquement le 28 Juin 2002 devant le jury composé de :

Rapporteurs Externes :	Louis-Marie HOUDEBINE, INRA, Jouy-en-Josas Pierre LEOPOLD, CNRS, Nice
Rapporteur Interne :	Bernard EHRESMANN, Professeur des Universités, Strasbourg
Examineur :	Pierre-Marie MARTIN, Marseille
Directeur de Thèse :	Jean-Marc EGLY, INSERM, Strasbourg

Je tiens avant tout à remercier Bernard Ehresmann, Louis-Marie Houdebine, Pierre Léopold et Pierre-Marie Martin pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant cette tâche laborieuse qu'est l'évaluation d'un travail de thèse.

Je remercie Jean-Marc Egly d'avoir choisi mon CV parmi tant d'autres et d'avoir cru avec tant d'enthousiasme aux différents projets qui ont jalonné mon passage dans son laboratoire. Merci également pour sa confiance et la grande liberté de travail qu'il m'a accordée.

Merci au Dr. Simon Wing et à son équipe qui, au cours d'une seule année à leur côté, ont ancré en moi un véritable enthousiasme pour la recherche.

Merci à Cécile Rochette-Egly, qui m'a beaucoup appris au cours de nos proches collaborations.

Merci à tous les membres de l'équipe présents et passés (Alex, Sandy, Jérôme, Etienne, Didier, Jean-Philippe, Annabel, Cathy, Bjoern, Kyong-Grim, Angels, Christophe, Thierry, Marc, Philippe, John, Arne, Thilo, Jean-Christophe, Fred, Pascal et Luca) pour leur sympathie, leurs conseils, et pour la bonne ambiance qu'ils ont su instaurer dans le labo. Je remercie en particulier Mireille, Franck et Emmanuel pour leurs conseils avisés et nos discussions fructueuses. Merci à mon ami Bertrand pour avoir accepté (malgré lui) d'être mon cobaye "pédagogique" pendant une année. Merci aux lecteurs de ce manuscrit (ils se reconnaîtront) pour les corrections et les critiques.

Je dois un grand "merci" à tous ceux qui, par leurs diverses compétences, leur savoir-faire, leur disponibilité ou simplement leur amitié, m'ont rendu la vie plus facile à l'IGBMC. Je tiens en particulier à remercier Manuela (qui m'a tout appris sur l'art et la manière de la biologie cellulaire), Claire, Fabrice, Valérie, Sandra, Jean-Marie, Maïté, Doris, Hélène, Isabelle, Jean-Luc, Betty, Noëlle, Karine, Malou, Zakirah et Stéphane.

Enfin et surtout, il est légitime de remercier les membres de ma famille et mes proches pour leur patience, leur réconfort et leur présence durant les années de paillasse et le dur moment de la rédaction. En plus d'un grand "merci" collectif à tous les membres de ma famille, je tiens à ajouter une pensée particulière à ma petite maman (pour son soutien et ses précieux conseils), à mon papa (pour toutes ses petites attentions qui remontent le moral) et à ma sœur Cécil (pour m'avoir fait voyager par procuration). Merci aussi à mes indispensables amis : Gaële (pour nos 10 années de belle amitié), Nadège (pour notre complicité), Alex et Blanche (pour leur amitié sincère malgré les kilomètres), Laurence (pour son inébranlable bonne humeur) et tout le troupeau des "ex-canadiens". Je n'oublie pas mes amis du monde du cheval : Angélique, Arianne, Nathalie, Lisa, Barbara, Edgard, Véro, Martin, Leslie, Jean-Marc, Marion, Aurélie, Pierre et Jérémie..... et bien sûr Scapin, mon âme sœur dans le règne animal, pour son soutien silencieux essentiel à mon équilibre.

Je finirais par une petite pensée à Patrice et Martine, mes compagnons de galères, avec qui se fut un plaisir de partager des discussions, des moments d'enthousiasme et d'angoisse pendant les derniers moments de cette thèse.

En espérant n'avoir oublié personne..... merci à tous !

SOMMAIRE

Liste des abréviations	1
Liste des tables et figures	3
CHAPITRE I. AVANT-PROPOS	5
CHAPITRE II. TRANSCRIPTION DES GENES CODANT POUR DES PROTEINES CHEZ LES EUCARYOTES	8
1- DES SEQUENCES REGULATRICES AU CŒUR DE L'ADN	8
1.1- Le promoteur minimal	8
1.2- Les éléments de régulation	9
a) Les séquences régulatrices proximales	9
b) Les séquences régulatrices distales	9
2- L'ARN POLYMERASE II	10
2.1- Le domaine carboxy-terminal (CTD)	10
2.2- Phosphorylation du CTD	11
2.3- CTD et maturation des ARN	12
3- L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION	13
3.1- L'assemblage du complexe de pré-initiation	13
a) Assemblage séquentiel	14
b) L'holoenzyme	16
3.2- L'initiation de la transcription	17
4- L'ELONGATION DE LA TRANSCRIPTION	19
CHAPITRE III. REGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LES RECEPTEURS NUCLEAIRES	21
1- LES RECEPTEURS NUCLEAIRES	22
1.1- Généralités	22
1.2- Structure des récepteurs nucléaires	23
1.3- Cas des récepteurs de l'acide rétinoïque	25
2- MODE D'ACTION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES DANS LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION	26
2.1- Chromatine et régulation de la transcription	27
2.1.1- Structure de la chromatine	27
2.1.2- Chromatine et transcription	29
2.1.3- Remodelage de la chromatine	30
a) Acétylation des histones	30
b) Phosphorylation des histones	31
c) Méthylation des histones	32
d) Ubiquitinylation des histones	33
e) Poly ADP-ribosylation des histones	33
f) Le "code histone"	34
2.2- Les co-activateurs des récepteurs nucléaires	34

2.2.1- Le complexe HAT	35
a) la famille p160 : SRC1, TIF2 et p/CIP	35
b) p300/CBP et p/CAF	37
c) CARM1	37
2.2.2- Le complexe SWI/SNF	38
2.2.3- Les complexes médiateurs TRAP/SMCC et ARC/DRIP	38
2.3- Répression de la transcription	40
3- REGULATION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES	41
3.1- Phosphorylation des récepteurs nucléaires	41
3.2- Dégradation des récepteurs nucléaires	43
CHAPITRE IV : REGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR DES PROTEINE-KINASES DEPENDANTES DES CYCLINES	45
1- LES PROTEINE-KINASES DEPENDANTES DES CYCLINES (CDK)	45
1.1- Structure des cdk	46
1.2- Régulation de l'activité des complexes cdk-cycline	47
1.2.1 - Activation par la liaison des cyclines	48
1.2.2- Régulation par phosphorylation	48
a) Phosphorylations activatrices	49
b) Phosphorylations inhibitrices	50
1.2.3- Régulation par les inhibiteurs de cdk (CKI)	51
1.2.4- Régulation par d'autres mécanismes	52
1.3- Conclusions	53
2- ROLE DES CDK DANS LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION	53
2.1- Le complexe cdk7-cycline H	54
2.2- Le complexe cdk9-cycline T	55
2.3- Le complexe cdk8-cycline C	56
2.4- Régulation concertée de la transcription par cdk7, cdk8 et cdk9	57
2.5- Détournement de cdk7 et cdk9 par le virus HIV	57
CHAPITRE V. TFIIH : UN FACTEUR MULTIFONCTIONNEL AU CŒUR DE PLUSIEURS PROCESSUS FONDAMENTAUX	59
1- LES SOUS-UNITES DU FACTEUR TFIIH	59
1.1- Les sous-unités du cœur de TFIIH	60
1.2- Les sous-unités du CAK	62
1.3- La sous-unité XPD	64
2- IMPLICATION DE TFIIH DANS L' APOPTOSE	65
3- LA REPARATION DE L' ADN PAR EXCISION-RESYNTHESE DE NUCLEOTIDES (NER)	66
3.1- Le système de réparation par NER	67
3.1.1- Mécanisme général de la NER	68
3.1.2- NER couplée à la transcription	69
3.2- Implications de TFIIH dans la NER	71
3.3- Les syndrômes liés à des mutations dans TFIIH	72
3.3.1- Le <i>Xeroderma pigmentosum</i>	72
3.3.2- Le Syndrome de Cockayne	75
3.3.3- La Trichothiodystrophie	77
4- FONCTIONS DU SOUS-COMPLEXE CAK DE TFIIH	78
Publication 1 : "CAK in TFIIH".	79

CHAPITRE VI. RESULTATS	94
Publication n°2 : Régulation de l'élongation de la transcription par l'autophosphorylation de TFIIF	94
Publication n°3 : Étude fonctionnelle de la sous-unité MAT1 du facteur de transcription-réparation TFIIH	97
Publication n°4 : Étude de l'effet de mutations dans la sous-unité XPD de TFIIH lors de l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires	99
Résultats non publiés	101
1- Effets d'une mutation dans la sous-unité cdk7 de TFIIH sur la progression du cycle cellulaire.	101
2- Effets d'une mutation dans sous-unité XPD de TFIIH sur la transactivation de la transcription par le récepteur de la vitamine D (VDR).	104
3- Effets d'une mutation à l'extrémité amino-terminale de la sous-unité XPD de TFIIH sur la transactivation de la transcription par le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR).	106
CHAPITRE VII. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	109
1- cdk7 contrôle t'elle le cycle cellulaire dans les cellules animales ?	109
2- Rôle de TFIIH dans la régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires.	114
Liste des publications	118
Références bibliographiques	119

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
AF :	fonction d'activation (<i>activation function</i>)
AR :	récepteur des androgènes
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	adénosine triphosphate
CAK :	kinase activant les cdk (<i>cdk-activating kinase</i>)
CAKAK :	kinase activant la CAK (<i>CAK activating kinase</i>)
cdk :	kinase dépendante des cyclines (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CKI :	inhibiteur des cdk (<i>cdk inhibitor</i>)
CS :	syndrome de Cockayne
CTD :	domaine carboxy-terminal (<i>carboxy-terminal domain</i>) de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II
DBD :	domaine de fixation à l'ADN (<i>DNA binding domain</i>)
ER :	récepteur des œstrogènes
GTF :	facteur général de transcription
GR :	récepteurs des glucocorticoïdes
HAT :	histone-acétyltransférase
Inr :	élément initiateur
kDa :	kiloDalton
MAT1 :	Ménage-à-trois 1
NER :	voie de réparation par excision-resynthèse de nucléotides (<i>nucleotide excision repair</i>)
p300/CBP :	<i>CREB-binding protein</i>
p/CAF :	facteur associé à p300/CBP (<i>p300/CBP associated factor</i>)
PCNA :	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PIC :	complexe de pré-initiation de la transcription (<i>pre-initiation complex</i>)
PPAR :	<i>peroxysomal proliferator -activated receptor</i>

P-TEFb :	facteur d'élongation de la transcription (<i>positive transcription elongation factor b</i>)
PR :	récepteur de la progestérone
RAR :	récepteur de l'acide rétinoïque
RE :	élément de réponse (<i>response element</i>)
RPA :	<i>replication protein A</i>
RXR :	récepteur de l'acide rétinoïque X
SAGA :	<i>Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase</i>
SNF :	réfère au mutant de <i>S. cerevisiae</i> déficient pour la fermentation du glucose (<i>sucrose non fermenting</i>)
Ssl1 :	<i>suppressor of stem loop-1</i>
SWI :	réfère au mutant de <i>S. cerevisiae</i> déficient dans le changement (<i>switch</i>) de type sexuel au locus MAT
SRB :	suppresseur de l'ARN polymérase B (<i>suppressor of RNA polymerase B</i>)
TAF _{II} :	facteur de classe II associé à la TBP (<i>TBP associated factor</i>)
TBP :	protéine de liaison à la boîte TATA (<i>TATA binding protein</i>)
TCR :	réparation couplée à la transcription (<i>transcription coupled repair</i>)
TFII :	facteur de transcription de classe II
TR :	récepteur de l'hormone thyroïdienne
TTD :	Trichothiodystrophie
UV :	ultra-violet
XP :	<i>Xeroderma pigmentosum</i>

LISTE DES TABLES ET FIGURES

Titre de la figure ou de la table	page
-----------------------------------	------

Chapitre II. Transcription des gènes codant pour des protéines chez les eucaryotes.

Figure 1 : Représentation schématique des différentes séquences d'ADN impliquées dans la régulation de la transcription.	8
Figure 2. Représentation schématique du modèle d'assemblage séquentiel du complexe de pré-initiation sur le promoteur.	14
Table 1. Composition et propriétés des facteurs généraux de transcription.	15
Figure 3 : Représentation schématique du modèle de recrutement du complexe de pré-initiation pré-assemblé au sein de l'holoenzyme.	16
Figure 4 : Les différentes étapes de l'initiation de la transcription.	18

Chapitre III. Régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires.

Table 2 : Règles définissant les fonctions respectives des activateurs et co-activateurs transcriptionnels.	21
Figure 5 : Les récepteurs nucléaires reconnaissent différents types d'éléments de réponse.	23
Figure 6 : Organisation structurale des récepteurs nucléaires en régions fonctionnelles.	24
Figure 7 : Structure du domaine de fixation du ligand (LBD) des récepteurs nucléaires.	24
Figure 8 : Représentation schématique et simplifiée du mode d'action des récepteurs nucléaires.	26
Figure 9 : Modification de la structure tri-dimensionnelle du LBD lors de la fixation du ligand.	27
Figure 10 : Le nucléosome.	27
Figure 11 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN au sein des chromosomes.	28
Figure 12 : Modifications covalentes des histones.	34
Figure 13 : Le complexe co-activateur HAT.	35
Table 3 : Principales protéines co-activatrices des récepteurs nucléaires.	36
Figure 14 : Interaction entre le LBD du récepteur ER α lié à son ligand et le motif LXXLL du co-activateur TIF2.	36
Figure 15 : Autres co-activateurs des récepteurs nucléaires.	38
Figure 16 : Modèle de contrôle de l'expression des gènes par les récepteurs nucléaires.	41

Chapitre IV : Régulation de la transcription par des protéine-kinases dépendantes des cyclines (cdk).

Table 4 : Fonctions et cycline(s) associée(s) des différentes cdk.	45
Table 5 : Rôle des résidus conservés dans le domaine catalytique des cdk.	46
Figure 17 : Organisation schématique du domaine catalytique des cdk.	46
Figure 18 : Structure tri-dimensionnelle du domaine catalytique de cdk2.	47
Figure 19. Changements conformationnels de la cdk induits par l'interaction avec la cycline.	48

Figure 20. Représentation schématique de la régulation des cdk par la fixation d'une cycline spécifique et leur phosphorylation.	49
Figure 21. Changement conformationnel de la cdk induit par la phosphorylation de sa boucle T.	49
Table 6. Protéine-kinases responsables de la phosphorylation inhibitrice des résidus Thr14 et Tyr15 de cdk1 (cdc2) chez différentes espèces.	50
Figure 22 : Différents modes de régulation de l'activité des cdk.	51
Figure 23. Représentation schématique du mode de régulation des cdk par les deux familles de CKI (cdk-inhibitor) : INK4 ou CIP/KIP.	52
Figure 24. Représentation schématique du rôle des trois kinases du CTD dans la régulation de la transcription.	57

Chapitre V. TFIIF : un facteur multifonctionnel au cœur de plusieurs processus fondamentaux

Figure 25 : Le facteur de transcription-réparation TFIIF.	60
Figure 26 : Organisation schématique de cdk7.	63
Figure 27 : Structure de la cycline H.	63
Figure 28 : Sous-domaines de MAT1.	64
Figure 29 : Les différents mécanismes de réparation des lésions sur l'ADN	67
Figure 30 : La voie de réparation par excision-resynthèse de nucléotides (NER).	68
Table 7 : Symptômes associés aux syndromes XP, TTD et CS.	73
Table 8 : Les différents groupes de complémentation des maladies associées à un défaut de réparation de l'ADN par NER.	74
Figure 31 : Mutations recensées dans la protéine XPD	75
Figure 32 : Mutations recensées dans la protéine XPB	75

Chapitre VI. Résultats

Figure 33 : Domaines fonctionnels de TFIIF α .	95
Figure 34 : Sites de phosphorylation identifiés dans TFIIF α .	95
Figure 35 : Analyse fonctionnelle des différents sous-domaines de MAT1.	97
Figure 36 : Structure tri-dimensionnelle du domaine RING-finger de MAT1.	98
Figure 37 : Effet du traitement au nocodazole sur des cellules sur-exprimant une forme mutée de cdk7.	102
Figure 38 : Effet du traitement à l'aphidicoline sur des cellules sur-exprimant une forme mutée de cdk7.	102
Figure 39 : Sur-expression de cdk7 dans les cellules HeLa.	103
Figure 40 : Conservation des différentes régions entre plusieurs récepteurs nucléaires.	104
Figure 41 : Sites de phosphorylation des récepteurs nucléaires par TFIIF.	105
Figure 42 : Activation de la transcription par VDR dans des cellules déficientes en TFIIF.	105
Figure 43 : Activation de la transcription par RAR dans différentes lignées cellulaires.	107

Chapitre VII. Discussion et perspectives

Table 9. Les sous-unités catalytiques du CAK de différentes espèces.	111
Figure 44 : Implications de cdk7 dans la régulation du cycle cellulaire.	113
Figure 45 : Modèle d'ancrage des deux sous-complexes de TFIIF par sa sous-unité XPD.	115

CHAPITRE I : AVANT-PROPOS

À chaque étape de sa vie (croissance, différenciation ou réponse à des stimuli), une cellule doit réguler de façon précise l'expression de son information génétique. La cellule doit également préserver l'intégrité de son génome. Pour cela, elle a développé différents mécanismes qui permettent de détecter et de réparer les lésions occasionnées à l'ADN, avant qu'il ne soit transcrit ou répliqué, afin que chaque cellule fille reçoive une copie saine du génome. Ces trois mécanismes : transcription, réparation, et progression du cycle cellulaire, agissent donc de façon concertée pour permettre à la cellule de vivre normalement. Il existe un complexe protéique qui peut agir à l'interface de ces trois processus. Il s'agit du facteur de transcription-réparation TFIIH qui présente des activités enzymatiques nécessaires à la transcription des gènes codant pour les protéines, à la réparation de l'ADN, et à la progression du cycle cellulaire.

Schématiquement, la transcription est composée d'une activité dite "de base", catalysée par l'ARN polymérase II (ARN polII) et 6 facteurs généraux de transcription (TFIIA, B, D, E, F et H), ainsi qu'une régulation positive ou négative. Les activateurs et répresseurs transcriptionnels régulent en effet l'activité basale en réponse à des stimuli, comme des signaux hormonaux, en interférant avec les activités enzymatiques de la machinerie de transcription. La transcription est donc finement orchestrée de sorte que chaque gène soit allumé ou éteint en un instant et un lieu appropriés, en fonction des conditions physiologiques, de la progression du cycle cellulaire ou, chez les eucaryotes supérieurs, de manière spécifique à chaque tissu.

Au cours de mes études doctorales, je me suis particulièrement intéressée aux événements de phosphorylation qui régulent la transcription. La phosphorylation réversible des protéines, catalysée par des protéine-kinases, peut modifier leurs fonctions par de nombreuses manières : en augmentant ou diminuant leur activité enzymatique; en les stabilisant ou, au contraire, les marquant pour leur dégradation; en facilitant ou inhibant leur mobilité entre les différents compartiments sub-cellulaires; ou en favorisant ou déstabilisant des interactions protéiques. La simplicité, la flexibilité et la réversibilité de la phosphorylation, en plus de la grande disponibilité d'ATP comme donneur de phosphate, justifient le choix de ce mode de régulation par les cellules

eucaryotes. L'importance des phosphorylations est illustrée par le fait qu'un tiers des protéines eucaryotes sont des phosphoprotéines et que des déficiences de phosphorylations sont à l'origine de nombreuses pathologies.

L'objet de mon travail de thèse a été d'étudier le(s) rôle(s) de la sous-unité kinase de TFIIH dans la régulation de la transcription. Avant d'aborder les résultats obtenus, je décrirai les connaissances actuelles sur le mécanisme très complexe qu'est la régulation de l'expression des gènes, en particulier par des activateurs transcriptionnels de la famille des récepteurs nucléaires. J'aborderai ensuite le rôle d'une famille de kinase, les kinases dépendantes des cyclines (cdk), dans la régulation de la transcription et, enfin, je présenterai le facteur de transcription-réparation TFIIH et discuterai ses implications dans différents processus cellulaires.

CHAPITRE II : TRANSCRIPTION DES GENES CODANT POUR DES PROTEINES CHEZ LES EUCARYOTES

Chez les organismes eucaryotes, il existe trois polymérases responsables de la transcription de l'ensemble des gènes d'une cellule. L'ARN polymérase I transcrit les gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr), à l'exception de l'ARNr 5S. La transcription des gènes codant pour les protéines et les petits ARN nucléaires (à l'exception de l'ARN U6) nécessite la machinerie de transcription de l'ARN polymérase II. Enfin, les ARN de transfert ainsi que l'ARNr 5S et l'ARN U6 sont synthétisés par l'ARN polymérase III. Chaque polymérase reconnaît un type de promoteur donné. Dans cette étude, nous nous limiterons à la description des protagonistes et des modes de régulation de la machinerie transcriptionnelle des gènes codant pour les protéines (ou gènes de classe II).

La transcription est divisée en trois grandes étapes : l'initiation (synthèse des premiers nucléotides), l'élongation (allongement de la chaîne d'ARN) et la terminaison (relâchement de l'ARN et départ de la machinerie de transcription de l'ADN). L'initiation de la transcription peut de nouveau être divisée en trois parties : l'ouverture de la double hélice d'ADN, la synthèse des premiers ribonucléotides et la libération de l'ARN polymérase II (ARN Pol II) de son ancrage au promoteur.

La transcription des gènes permet la synthèse d'ARN pré-messagers qui doivent subir une maturation. En effet, les gènes sont souvent morcelés : les régions codantes (exons) sont séparées par des régions non codantes (introns) (figure 1). Les exons sont donc raboutés les uns aux autres et les introns éliminés par un mécanisme "d'excision-épissage". Par ailleurs, l'ajout d'une coiffe en 5' et la polyadénylation en 3' achève la maturation des ARN messagers, qui sont alors exportés hors du noyau pour servir de matrice aux ribosomes et à la machinerie de traduction.

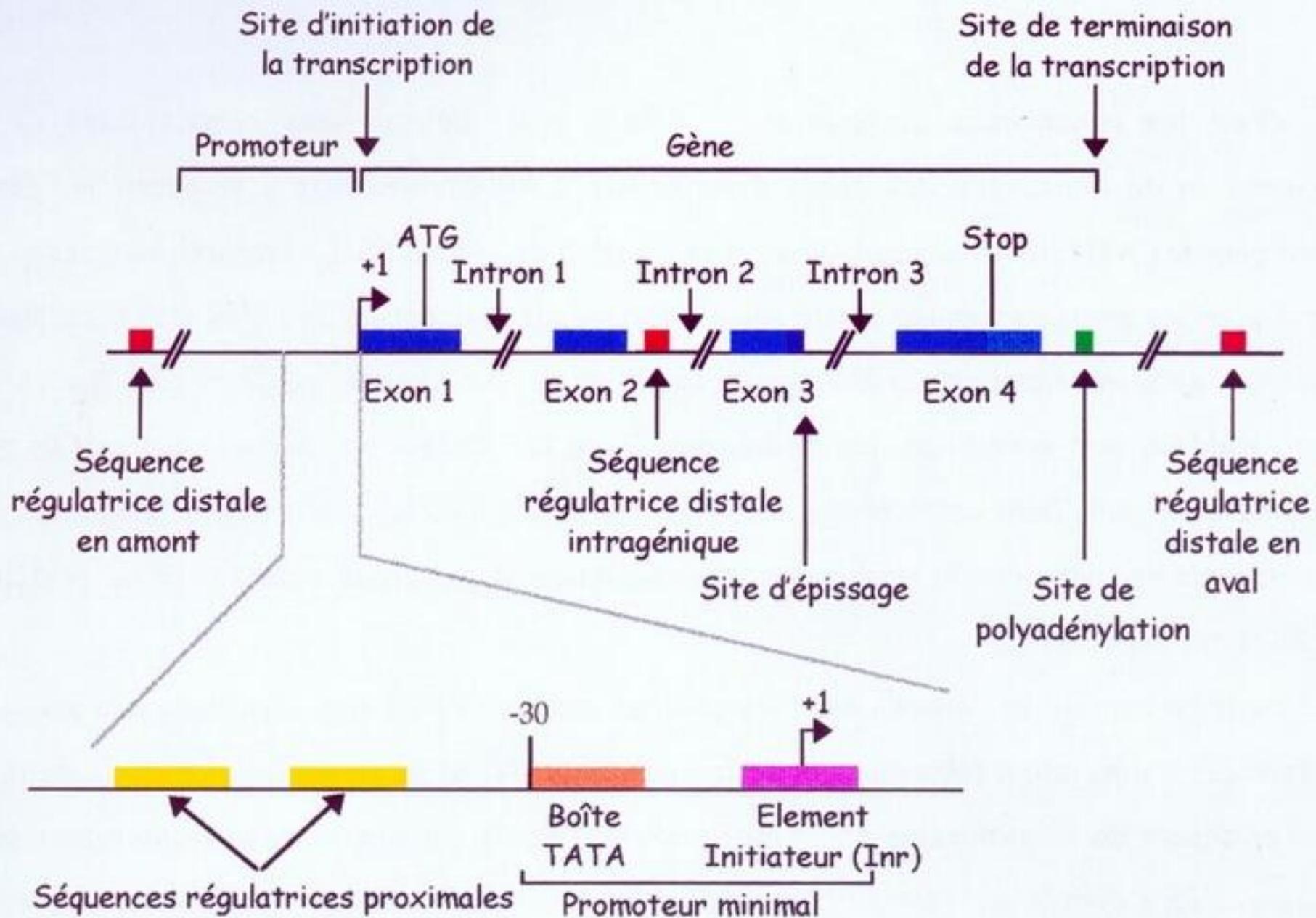


Figure 1 : Représentation schématique des différentes séquences d'ADN impliquées dans la régulation de la transcription (promoteur, séquences régulatrices proximales et distales) ou la maturation (sites d'épissage et de polyadénylation) des ARN. Les trinuécléotides "ATG" et "Stop" codent pour l'initiation et l'arrêt de la traduction de la protéine codée par un gène, respectivement.

1. DES SEQUENCES REGULATRICES AU COEUR DE L'ADN

Les gènes ne sont pas les seuls segments informatifs de l'ADN. Leur expression est contrôlée par de nombreuses protéines qui reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques, regroupées en une unité fonctionnelle appelée "promoteur" (figure 1). On peut décomposer les promoteurs des gènes de classe II en deux parties principales : le promoteur minimal, correspondant aux séquences reconnues par les facteurs généraux de transcription, et les éléments de régulation proximaux (situés près du site d'initiation) ou distaux (plus éloignés, en aval comme en amont du site d'initiation) sur lesquels viennent se fixer les régulateurs de la transcription.

1.1- Le promoteur minimal

Le promoteur minimal est défini comme la plus petite unité nécessaire et suffisante à l'initiation de la transcription *in vitro* par l'ARN Pol II et les facteurs généraux de transcription, à partir du site d'initiation (désigné +1; les chiffres négatifs désignent les nucléotides en amont de celui-ci alors que les chiffres positifs déterminent les bases situées en aval) (Weis et Reinberg, 1992).

L'élément principal est constitué par la boîte TATA (Gannon *et al.*, 1979; Moncollin *et al.*, 1994) et/ou par un élément initiateur (Inr). La boîte TATA, dont la séquence consensus est TATA(A/T)A(A/T), est localisée à environ une trentaine de paires de bases (jusqu'à 120 pb chez la levure) en amont du site d'initiation. Cette séquence est reconnue par la machinerie transcriptionnelle via la sous-unité TBP (*TATA Binding Protein*) du facteur de transcription TFIID, et pourrait également jouer un rôle dans la détermination du sens de transcription (O'Shea-Greenfield et Smale, 1992). L'élément Inr est situé autour du site d'initiation et est constitué d'une séquence riche en pyrimidines (PyPyCAPyPyPyPy ou PyPyAN(T/A)PyPy) moins conservée que la TATA. Il permet la transcription des gènes qui ne contiennent pas de boîte TATA, bien que l'on puisse également le retrouver en conjonction avec celle-ci et, dans ce cas, ces deux éléments pourraient agir en synergie (Emami *et al.*, 1997).

In vivo, le promoteur minimal pourrait être plus complexe puisque d'autres éléments peuvent être nécessaires. Ainsi, deux nouvelles séquences spécifiques ont été caractérisées. La séquence BRE (*TFIIB Responsive Element*), riche en guanine et située en amont de la boîte

TATA, est reconnue spécifiquement par le facteur général de transcription TFIIB et est présente dans environ 12% des promoteurs (Lagrange *et al.*, 1998). La séquence DPE (*Downstream Promoter Element*), faiblement conservée et située à environ trente paires de bases à l'intérieur de gènes dépourvus de boîte TATA, serait quant à elle reconnue par une des sous-unités de TFIID (Burke et Kadonaga, 1997).

1.2- Les éléments de régulation

Bien que toutes les cellules d'un organisme possèdent la même information génétique, le taux d'expression d'un gène donné n'est pas forcément similaire dans chaque tissu différencié. Ainsi, les gènes possèdent dans leur promoteur des séquences régulatrices qui leur sont propres et qui permettent le contrôle de leur expression par des protéines régulatrices. Ces séquences permettent d'adapter le niveau d'activité d'un gène aux besoins physiologiques et à l'état de différenciation de la cellule. Il existe deux types d'éléments de régulation, classés selon leur éloignement du site d'initiation de la transcription : les séquences proximales et les séquences distales.

a) Les séquences régulatrices proximales

Généralement situées entre 40 et 110 paires de bases en amont du site d'initiation et parfois présentes en plusieurs exemplaires, les séquences proximales peuvent avoir un effet activateur (UAS, pour *upstream activating sequence*) ou répresseur (URS, pour *upstream repressing sequence*) en fonction de l'activité de la protéine qui les reconnaît. Les deux séquences les mieux étudiées sont les boîtes CAAT et les motifs riches en GC. Ces séquences d'ADN sont en général reconnues par des protéines qui régulent la transcription par contacts directs avec la machinerie de transcription de base. C'est le cas de l'activateur transcriptionnel Sp1 qui se fixe sur les motifs riches en GC et y recrute à la fois la machinerie de transcription (Gill *et al.*, 1994) et la machinerie de remodelage de la chromatine (Doetzlhofer *et al.*, 1999).

b) Les séquences régulatrices distales

Les éléments distaux du promoteur peuvent être situés jusqu'à quelques milliers de paires de bases en amont ou en aval du site d'initiation (Ptashne, 1988). Ces éléments peuvent activer la

transcription, on les appellera alors "enhancers", ou la réprimer, on parlera de "silencers". Les séquences activatrices peuvent agir indépendamment de leur orientation en cis (c'est-à-dire en étant sur la même molécule d'ADN) ou en trans. Des études génétiques menées chez la drosophile ont en effet montré qu'un gène pouvait être activé par un enhancer situé sur le chromosome homologue (Goldsborough et Kornberg, 1996). Le mécanisme d'action par lequel des séquences éloignées régulent la transcription est encore assez mal connu. Une hypothèse séduisante propose qu'un repliement de l'ADN permettrait le rapprochement de ces séquences régulatrices du site d'initiation et, de ce fait, des interactions avec la machinerie de transcription, permettant ainsi de passer outre les séquences qui isolent les différents loci du génome appelées les insulateurs (Morris *et al.*, 1998).

2- L'ARN POLYMERASE II

L'ARN polymérase (ARN Pol II) est l'unité catalytique de la synthèse d'ARN. Elle est composée de 12 sous-unités nommées RPB1 (pour la plus grande, 170 KDa) à RPB12 (pour la plus petite, 67 KDa) et conservées de la levure à l'homme (pour une revue : Young, 1991). Six sous-unités de l'ARN Pol II humaine peuvent d'ailleurs fonctionnellement remplacer leur homologue chez la levure (McKune *et al.*, 1995). De plus, les sous-unités RPB1, RPB2 et RPB3 sont homologues à des sous-unités des ARN polymérases I et III, mais également aux sous-unités β' , β et α de l'ARN polymérase d'*E. coli*, respectivement. L'ARN polymérase peut donc être considérée comme un complexe multi-protéique universel.

2.1- Le domaine carboxy-terminal (CTD)

La plus grosse sous-unité de l'ARN Pol II eucaryote, RPB1, possède un domaine remarquable à son extrémité C-terminale (CTD, pour *carboxy-terminal domain*). Ce domaine consiste en une répétition de l'heptapeptide Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 (Allison *et al.*, 1985, Corden *et al.*, 1985). La séquence de ce peptide a été extrêmement conservée au cours de l'évolution, mais le nombre de ses répétitions varie d'une espèce à l'autre (de 26 fois chez la levure *S. cerevisiae* à 52 fois chez les mammifères). Alors qu'il n'est pas toujours indispensable pour la transcription *in vitro* (Zehring *et al.*, 1988; Kim et Dahmus, 1989), le CTD est essentiel pour l'activité de l'ARN Pol II *in vivo* (Nonet et Young, 1987; Allison *et al.*, 1988; Bartolomei *et*

al., 1988) et sa délétion est létale chez la souris (Bartolomei *et al.*, 1988), la drosophile (Zehring *et al.*, 1988) et la levure (Allison *et al.*, 1988).

2.2- Phosphorylation du CTD

L'heptapeptide répété du CTD comporte 5 cibles possibles de phosphorylation (Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7). Bien qu'il existe de nombreuses kinases capables de phosphoryler le CTD *in vitro* sur les résidus sérine ou thréonine de l'heptapeptide, seules cdk7 (associée au facteur général de transcription TFIIH), cdk8 (faisant partie du complexe médiateur), cdk9 (associée au facteur d'élongation P-TEFb) et une kinase de la famille des MAP kinases sont capables de le phosphoryler *in vivo* (Dubois *et al.*, 1994; Valay *et al.*, 1995; Dubois *et al.*, 1997; Trigon *et al.*, 1998; Hengartner *et al.*, 1998; Isel et Karn, 1999). Le rôle respectif de ces différentes kinases dans la régulation de la transcription seront abordés dans le chapitre IV.

L'état de phosphorylation du CTD module l'activité de l'ARN Pol II, à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'ARN Pol II existe sous deux formes : l'ARN Pol IIA (hypophosphorylée) et IIO (hyper-phosphorylée) (Dahmus, 1981). Ces deux formes jouent des rôles distincts dans le processus transcriptionnel : alors que l'ARN Pol IIA est présente lors de la formation du complexe de pré-initiation de la transcription (Laybourn et Dahmus, 1990; Lu *et al.*, 1991; Chesnut *et al.*, 1992 et voir page 13), l'ARN Pol IIO est impliquée dans la transition entre l'initiation et l'élongation ainsi que lors de l'élongation (Cadena et Dahmus, 1987; Laybourn et Dahmus, 1989; Zhang et Corden, 1991).

Comme la phosphorylation, la déphosphorylation du CTD joue un rôle important dans le processus transcriptionnel en permettant à l'ARN Pol II de revenir à sa forme hypophosphorylée (la seule capable d'intégrer le complexe de pré-initiation) et d'entamer un nouveau cycle de transcription. Une protéine phosphatase responsable de la déphosphorylation du CTD a été caractérisée chez la levure *S. cerevisiae* (Chambers et Kane, 1996; Kobor *et al.*, 1999) et isolée des cellules HeLa (Chambers et Dahmus, 1994; Cho *et al.*, 1999). Ainsi, FCP1 (*TFIIF interacting CTD Phosphatase*), qui est présente dans le complexe d'élongation (Archambault *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1999), pourrait jouer un rôle dans le recyclage de la polymérase bien qu'il ne soit pas connu si la déphosphorylation du CTD est une cause ou une conséquence de l'arrêt de la transcription.

2.3- CTD et maturation des ARN

La maturation des ARN pré-messager inclut la protection de l'extrémité 5' par ajout d'une coiffe 7-methyl-GTP (*capping*), le clivage et la polyadénylation de l'extrémité 3' et l'excision des régions correspondant aux introns des gènes (épissage, ou *splicing*). Ces modifications, qui sont cruciales pour la stabilité, le transport et la traduction des messagers, sont très intimement associées à la chronologie de la synthèse de ces ARN *in vivo*.

Une analyse en microscopie électronique permet effectivement d'observer que l'épissage a lieu simultanément à l'élongation de la transcription (Beyer, 1988) et que le clivage en 3' a lieu avant même l'étape de terminaison (Connelly, 1988). On sait maintenant que le couplage entre transcription et maturation des ARN fait intervenir des interactions physiques entre le domaine CTD de l'ARN Pol II et les enzymes responsables de l'addition de la coiffe (Yue *et al.*, 1997; McCracken *et al.*, 1997a; Cho *et al.*, 1997 et Ho *et al.*, 1998), du clivage et de la polyadénylation (McCracken *et al.*, 1997b et Hirose *et al.*, 1998). Le CTD sert également de plate-forme à la machinerie d'épissage, appelée "spliceosome" (Du et Warren, 1997 et Steinmetz, 1997). Le CTD ne se contente pas recruter ces enzymes, il régule également leur activité. L'association de l'enzyme du *capping* au CTD augmente son affinité pour le GTP et, de ce fait, son activité enzymatique (Ho *et al.*, 1999). Il en est de même pour le complexe CPSF, qui catalyse l'ajout de la queue polyA aux transcrits, mais le mécanisme de cette régulation est encore inconnu.

L'état de phosphorylation du domaine CTD est l'élément limitant de ce couplage. En effet, les interactions citées ci-dessus n'existent qu'avec la forme hyperphosphorylée du CTD (Kim *et al.*, 1997, McCracken *et al.*, 1997a, Ho *et al.*, 1998, Ho *et al.*, 1999 et Hirose *et al.*, 1999), démontrant que le couplage n'intervient que lorsque la polymérase est transcriptionnellement active (pour une revue : Bentley, 1999). En plus d'un gain de temps évident, un tel couplage présente l'avantage de maintenir les machineries de maturation et d'épissage des ARN "à portée de main" pendant le temps nécessaire à la transcription des gènes (dont la taille peut atteindre plusieurs millions de paires de bases) et plus particulièrement celle des introns (dont la taille peut atteindre 100 kb).

Il faut enfin noter que le CTD, sous sa forme non phosphorylée, sert également de site d'ancrage pour un complexe multi-protéique requis pour l'activation transcriptionnelle appelé "médiateur" (Kim *et al.*, 1994, voir page 38). Plus récemment, le CTD a été caractérisé comme

étant le site d'interaction d'un nouveau complexe impliqué dans l'élongation transcriptionnelle chez la levure et appelé "*Elongator*" (Otero *et al.*, 1999). Le CTD, par ses multiples répétitions et en fonction de son état de phosphorylation, peut donc servir de site d'interaction pour de nombreux complexes protéiques (médiateur, spliceosome et *Elongator*) permettant ainsi une régulation spatio-temporelle des différentes étapes de la transcription et un couplage entre la transcription et les réactions de maturation de l'ARN pré-messager. Le modèle actuel propose que l'interaction du complexe médiateur avec l'ARN Pol II précède l'initiation de la transcription et que la phosphorylation du domaine CTD, lors de la transition entre la phase de d'initiation et d'élongation, libère ce complexe pour laisser place aux complexes *Elongator* et spliceosome, qui accompagnent la polymérase au cours de l'élongation (Svejstrup *et al.*, 1997).

3- L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

L'ARN Pol II n'est pas capable de démarrer seule la synthèse d'ARN au niveau d'un promoteur. L'initiation de la transcription *in vitro* nécessite la présence de facteurs auxiliaires, appelés facteurs généraux de transcription (ou facteur de transcription de base), qui sont au nombre de 6 : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH (pour une revue : Orphanides *et al.*, 1996). L'ARN Pol II et les facteurs généraux de transcription constituent la machinerie transcriptionnelle de base, qui est la cible d'activateurs ou de répresseurs qui modulent le taux d'expression de chaque gène en réponse à divers signaux.

3.1- L'assemblage du complexe de pré-initiation

L'étape initiale de la formation du complexe de pré-initiation (PIC, pour *pre-initiation complex*) est la reconnaissance de la boîte TATA par TFIID, et plus particulièrement par la TBP (Davison *et al.*, 1983). TBP existe dans la cellule sous forme de dimères (Taggart et Pugh, 1996) et sa fixation sur le promoteur nécessite une dissociation de ces dimères (Coleman et Pugh, 1997; Jackson-Fisher *et al.*, 1999).

Outre TBP, TFIID contient un nombre de TAF (*TBP-associated protein*) variable d'une espèce à l'autre : entre 10 et 13 chez l'homme (de poids moléculaire allant de 18 à 250 KDa), 12 chez la levure et 9 chez la drosophile. TFIID humain contient au moins deux sous-populations. La première est un groupe central comprenant TAFII250, TAFII135, TAFII100 et TAFII28

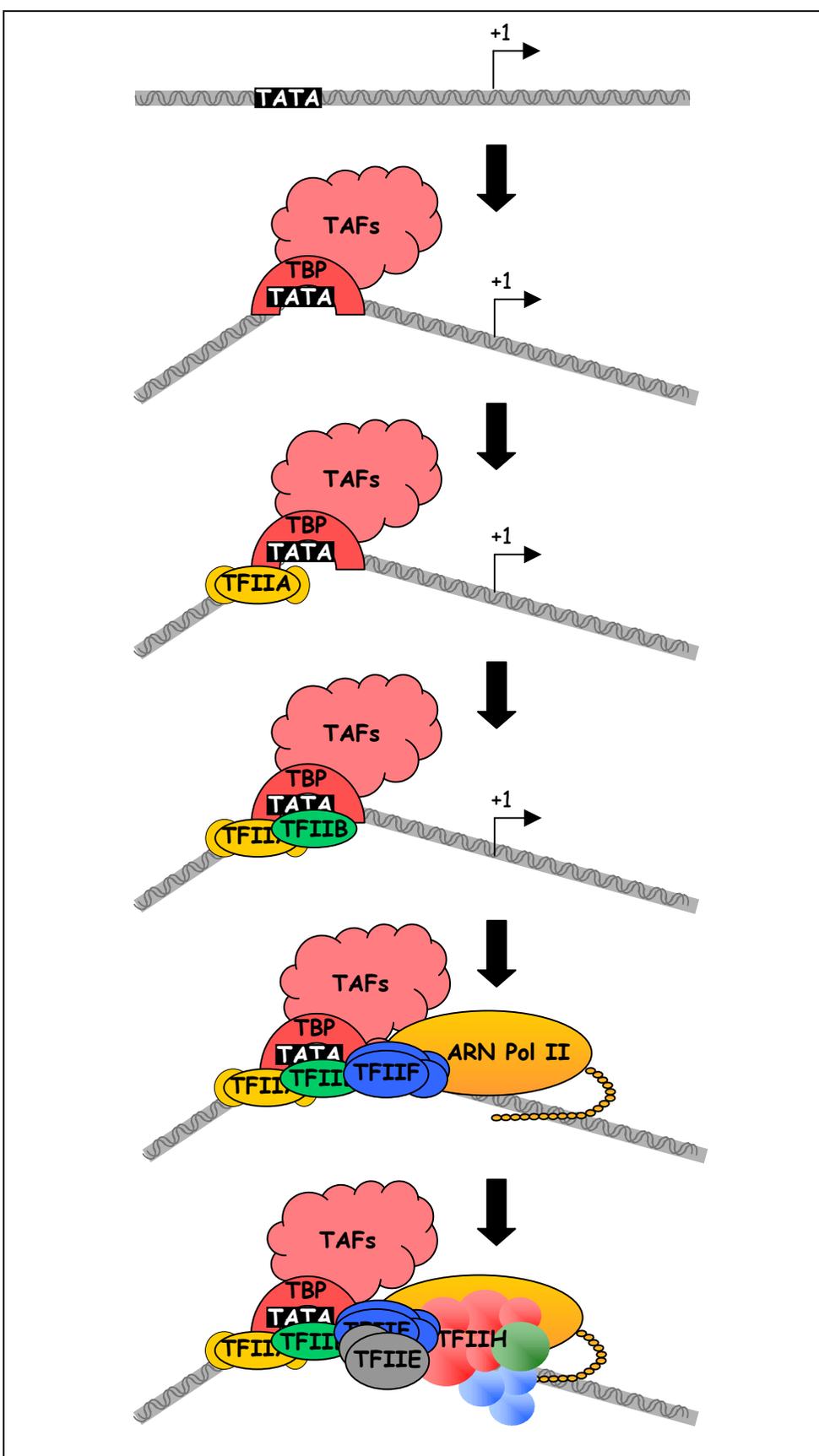


Figure 2 : Représentation schématique du modèle d'assemblage séquentiel du complexe de pré-initiation sur le promoteur.

présent dans tous les complexes TFIID. Le second groupe contient des TAFs spécifiques à certains promoteurs comme TAFII30, TAFII20 et TAFII18 (Jacq *et al.*, 1994; Mengus *et al.*, 1995). Les TAFs servent avant tout à stabiliser la liaison de TFIID sur le promoteur grâce à des contacts directs avec l'ADN, au niveau des éléments Inr et DPE (Chalkley et Verrijzer, 1999), permettant ainsi à TFIID de se lier aussi bien sur des promoteurs possédant une boîte TATA que sur ceux qui en sont dépourvus. Certains TAFs possèdent également des motifs structuraux de type histones qui leur permettraient, par des interactions protéine-protéine et protéine-ADN, de stabiliser le PIC (Burley et Roeder, 1996). Les TAFs servent par ailleurs d'adaptateurs entre la machinerie transcriptionnelle de base et certains régulateurs. En effet, certains TAFs sont aussi présents au sein de complexes impliqués dans la régulation de la transcription, comme le complexe SAGA chez la levure ou TFTC et PCAF chez les eucaryotes supérieurs, et sont donc considérés comme des co-activateurs requis pour l'activation de la transcription d'un certain groupe de gènes (pour une revue : Bell et Tora, 1999). TAFII250 est lui aussi impliqué dans la régulation de la transcription grâce à ses activités enzymatiques d'acétylation (Mizzen *et al.*, 1996) et d'ubiquitylation (Pham *et al.*, 2000) des histones, qui modifient la structure de la chromatine au niveau du promoteur et facilitent l'assemblage du complexe de pré-initiation (voir page 30).

En se fixant sur le promoteur, TFIID crée une courbure de l'ADN d'environ 90° (Burley et Roeder, 1996; Nikolov et Burley, 1997) qui permet d'une part le rapprochement des séquences situées en amont avec celles situées en aval de la TATA et d'autre part la nucléation de l'ouverture des deux brins d'ADN. Deux voies sont alors possibles : la voie de l'assemblage séquentiel, où les facteurs se fixent dans un ordre établi, et la voie de l'holoenzyme où tous les facteurs (à l'exception de TFIID) sont pré-assemblés au sein d'un gros complexe protéique et viennent se fixer ensemble au promoteur.

a) Assemblage séquentiel

Une fois TFIID associé au promoteur, il recrute les autres facteurs de transcription (figure 2). Ainsi, TFIIA, composé de trois sous-unités de poids moléculaires de 13, 19 et 37 KDa, vient stabiliser le complexe TFIID/TATA en interagissant directement avec l'ADN en amont de la TATA. Le rôle de ce facteur est multiple puisqu'il stimule également la liaison de TFIID à l'ADN sur des promoteurs contenant un Inr en plus de la boîte TATA (table 1). En effet, TFIIA est responsable de la séparation des dimères de TBP, accélérant ainsi la cinétique d'association

Facteur	Sous-unités	Propriétés
TFIIA	α (37 kDa)	- dissocie les dimères de TBP - requise pour l'activation de la transcription
	β (19 kDa)	requis pour l'activation et l'anti-répression de la transcription.
	γ (13 kDa)	
TFIIB	35 kDa	- stabilise le complexe TFIID-ADN - sélectionne le site d'initiation - recrute le complexe TFIIF-ARN polymérase II
TFIID	TBP (38 kDa)	interagit avec la boîte TATA
	TAF _{II} 250	activités histone acétyl-transférase, histone ubiquitine-ligase et kinase
	TAF _{II} 150	interagit avec l'élément DPE
	TAF _{II} 135	
	TAF _{II} 100	
	TAF _{II} 80/70	structure de type histone
	TAF _{II} 55	
	TAF _{II} 31/32	structure de type histone
	TAF _{II} 30	
	TAF _{II} 28	structure de type histone
	TAF _{II} 20/15	structure de type histone
	TAF _{II} 18	structure de type histone
TFIIE	α (56 kDa)	recrute et module les activités de TFIIH
	β (34 kDa)	
TFIIF	α /RAP7 (58 kDa)	- recrute l'ARN polymérase II,
	β /RAP30 (26 kDa)	- facteur d'élongation - activité kinase
TFIIH	voir chapitre V	activités hélicases, ATPases et kinase

Table 1. **Composition et propriétés des facteurs généraux de transcription.** Le nom des différents TAFIIs tient compte de leur poids moléculaire.

de celui-ci sur l'ADN (Coleman *et al.*, 1999). Néanmoins, TFIIA n'est pas indispensable à la formation du PIC *in vitro* : la dépendance en TFIIA dépend de la pureté des facteurs utilisés. Ainsi, plus le système de transcription est pur, moins TFIIA semble nécessaire, suggérant que ce facteur neutralise des répresseurs présents dans la réaction (Kaiser et Meisterernst, 1996). TFIIA semble également être la cible de certains activateurs transcriptionnels (Ozer *et al.*, 1994).

La structure formée par l'association ADN/TFIID/TFIIA est reconnue par une protéine de 35 KDa : TFIIB (Maldonado *et al.*, 1990). TFIIB ne peut se fixer au niveau du promoteur que si TBP est présent (Coulombe *et al.*, 1994). Il interagit aussi bien avec le domaine carboxy-terminal de TBP qu'avec des séquences d'ADN situées en aval et en amont de la boîte TATA, en se plaçant dans la zone concave formée par la courbure de l'ADN. La majeure partie de TFIIB se trouve en aval de la boîte TATA. Cette asymétrie pourrait être responsable de l'orientation de la transcription du côté du site d'initiation (Pinto *et al.*, 1992; Tsai et Sigler, 2000). De plus, chez la levure, des mutations dans le gène *TFIIB* entraînent un déplacement du site d'initiation de la transcription (Pinto *et al.*, 1994). Ce facteur est certainement responsable du recrutement de la polymérase ainsi que de TFIIF grâce à de multiples interactions avec ceux-ci (Roeder, 1996).

L'ARN Pol II s'associe alors au complexe conjointement à TFIIF. En effet, ces deux complexes se s'associent l'un à l'autre pour rejoindre le PIC en formation (Zawel *et al.*, 1995). TFIIF, hétérotétramère ($\alpha 2\beta 2$) composé de deux sous-unités de 30 et 74 KDa, serait responsable du positionnement correct de la polymérase en réduisant les interactions non-spécifiques de celle-ci avec l'ADN (Conaway et Conaway, 1993). TFIIF favorise l'enroulement de l'ADN, sur près d'un tour, autour de l'ARN Pol II (Robert *et al.*, 1998). TFIIF interagit avec l'ADN, entre la boîte TATA et le site d'initiation (Coulombe *et al.*, 1994). Il interagit également avec de nombreux partenaires dont TFIIB, TFIIE, TBP, TAFII250 ainsi qu'avec TAFII100. Cette dernière interaction semble indispensable à l'initiation de la transcription (Dubrovskaya *et al.*, 1996). Outre son rôle dans l'initiation de la transcription, TFIIF est impliqué dans la transition initiation-élongation en inhibant un arrêt prématuré de la polymérase (Yan *et al.*, 1999) ainsi que dans l'élongation de la transcription où il stabiliserait la polymérase (Lei *et al.*, 1999). L'activité de TFIIF peut être régulée par de nombreuses modifications. En effet, ce facteur peut être acétylé (Imhof *et al.*, 1997), ADP-ribosylé (Rawling et Alvarez-Gonzalez, 1997), phosphorylé par la kinase associée à TFIIF (Yankulov et Bentley, 1997) ou par TAFII250 (Dikstein *et al.*, 1996), et peut également s'autophosphoryler (voir Publication 2). L'ARN polymérase interagit quant à elle avec TBP via son domaine CTD (Buratowski *et al.*, 1991).

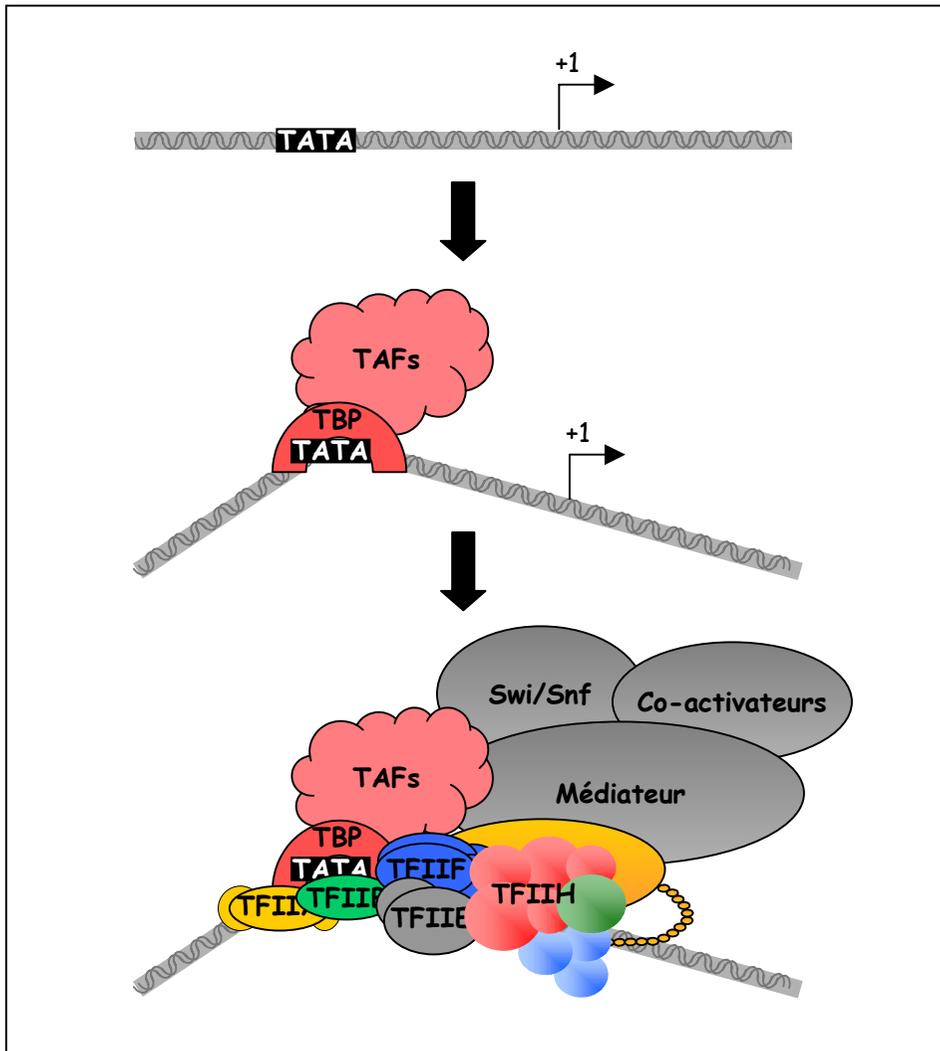


Figure 3 : Représentation schématique du modèle de recrutement du complexe de pré-initiation pré-assemblé au sein de l'holoenzyme.

La liaison directe de TFIIE avec la polymérase, la grande sous-unité de TFIIF et TBP/TFIID, constitue l'étape suivante de la formation du PIC (Zawel et Reinberg, 1995; Orphanides *et al.*, 1996). Cet hétérotétramère, composé de deux sous-unités de 34 et 56Kda, recrute également le complexe TFIIH via deux de ces sous-unités avec lesquelles interagit (Maxon *et al.*, 1994). La petite sous-unité de TFIIE, présente légèrement en amont du site d'initiation de la transcription, possède un motif en doigt de zinc indispensable à l'association de TFIIE avec l'ADN. Elle est supposée jouer un rôle dans l'ouverture de la double hélice d'ADN, en partenariat avec TFIIH. TFIIH est un complexe multiprotéique composé de neuf sous-unités (voir chapitre V). Il est responsable de l'ouverture locale de l'ADN autour du site d'initiation et de la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II, qui est stimulée par TFIIE (Ohkuma et Roeder, 1994; Ohkuma *et al.*, 1995). Il est à noter que la transcription à partir d'une matrice super-enroulée ne nécessite ni TFIIE ni TFIIH (Parvin *et al.*, 1994; Timmers, 1994).

Ce modèle de formation du PIC, qui suppose un assemblage séquentiel des différents composants de la machinerie transcriptionnelle sur le promoteur, est basé sur des observations faites lors de la reconstitution de la réaction de transcription *in vitro* permettant l'ajout successif de chacun de ces facteurs. Si ces expériences ont permis de comprendre la fonction précise de chaque facteur de transcription dans cette réaction basale, il semble cependant que le modèle d'assemblage séquentiel ne reflète pas la réalité. En effet, de nombreux laboratoires indépendants ont mis en évidence l'existence de très gros complexes, appelés "holoenzyme", au sein desquels tous les facteurs de transcription et l'ARN Pol II sont pré-assemblés et y sont associés à des co-régulateurs de la transcription (Koleske et Young, 1994; Chao *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 1996; pour une revue : Lemon et Tjian, 2000).

b) L'holoenzyme

Une fois TFIID mis en place, un complexe macromoléculaire appelé holoenzyme contenant non seulement la machinerie transcriptionnelle (ARN Pol II et facteurs de transcription) mais aussi des protéines régulatrices de la transcription (co-activateurs, complexe médiateur), peut se positionner autour du promoteur (figure 3).

La composition de l'holoenzyme varie selon l'organisme étudié et selon la méthode de purification. Chez la levure, un complexe comprenant l'ARN Pol II, les facteurs de transcription TFIIB, TFIIF et TFIIH et des protéines faisant partie du complexe médiateur (voir page 38) et appelées SRB (*Suppressor of RNA polymerase B*), a été caractérisé (Koleske et Young, 1994;

Koleske et Young, 1995). Simultanément, un complexe très similaire, mais purifié de manière différente, s'est révélé contenir, en plus des SRB, de l'ARN Pol II et de TFIIF, des co-activateurs (SUG1) et d'autres protéines pouvant également faire partie du complexe médiateur (SIN4), mais ne contenant ni TFIIB ni TFIIH (Kim *et al.*, 1994). Chez les mammifères, des expériences d'immunopurification à partir de cellules de foie de rat ont permis d'isoler un complexe macromoléculaire contenant tous les facteurs généraux de transcription, à l'exception de TFIIA, mais ne contenant pas de SRB (Ossipow *et al.*, 1995). Au contraire, des approches similaires ont abouti à la purification d'une holoenzyme, à partir de cellules de Thymus ou de cellules HeLa, contenant l'ARN Pol II, TFIIE, TFIIF et TFIIH, les homologues humains des protéines SRB ainsi que certaines protéines de la réparation de l'ADN (Chao *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 1996; Neish *et al.*, 1998). L'holoenzyme pourrait également contenir le complexe SWI/SNF (Wilson *et al.*, 1996), qui possède une des activités de remodelage de la chromatine indispensables à l'initiation de la transcription (voir page 38).

Il apparaît donc, à la vue de ces observations, qu'il n'existe pas un holoenzyme commun à tous les organismes, ni même à différents tissus d'un même organisme donné à un instant T. Cette hypothèse est en accord avec le fait qu'il semble improbable qu'il existe un seul et unique holoenzyme, au vu de la très grande diversité des activateurs transcriptionnels. Par ailleurs, si l'existence d'un complexe contenant toutes les activités enzymatiques nécessaires à la transcription et permettant le recrutement de celles-ci en une seule étape facilite vraisemblablement la rapidité de la réponse de la machinerie transcriptionnelle, ce modèle ne satisfait pas le besoin de flexibilité nécessaire à la spécificité de sa réponse aux différents régulateurs. Un modèle alternatif serait l'existence de sous-complexes modulaires et interchangeables, recrutés spécifiquement par les différents régulateurs transcriptionnels.

3.2- L'initiation de la transcription

Tous les facteurs d'initiation de la transcription étant correctement assemblés au niveau du promoteur, le complexe de pré-initiation est alors prêt à entrer dans la phase d'initiation de la transcription proprement dite. Il est maintenant établi que l'initiation se déroule en trois étapes distinctes : l'ouverture de l'ADN au niveau du site d'initiation (appelée "bulle" de transcription), l'allongement de la bulle et le relargage des facteurs d'initiation, simultanément au recrutement des facteurs d'élongation (Jiang *et al.*, 1996; Holstege *et al.*, 1997; Yan et Gralla, 1997) (figure 4).

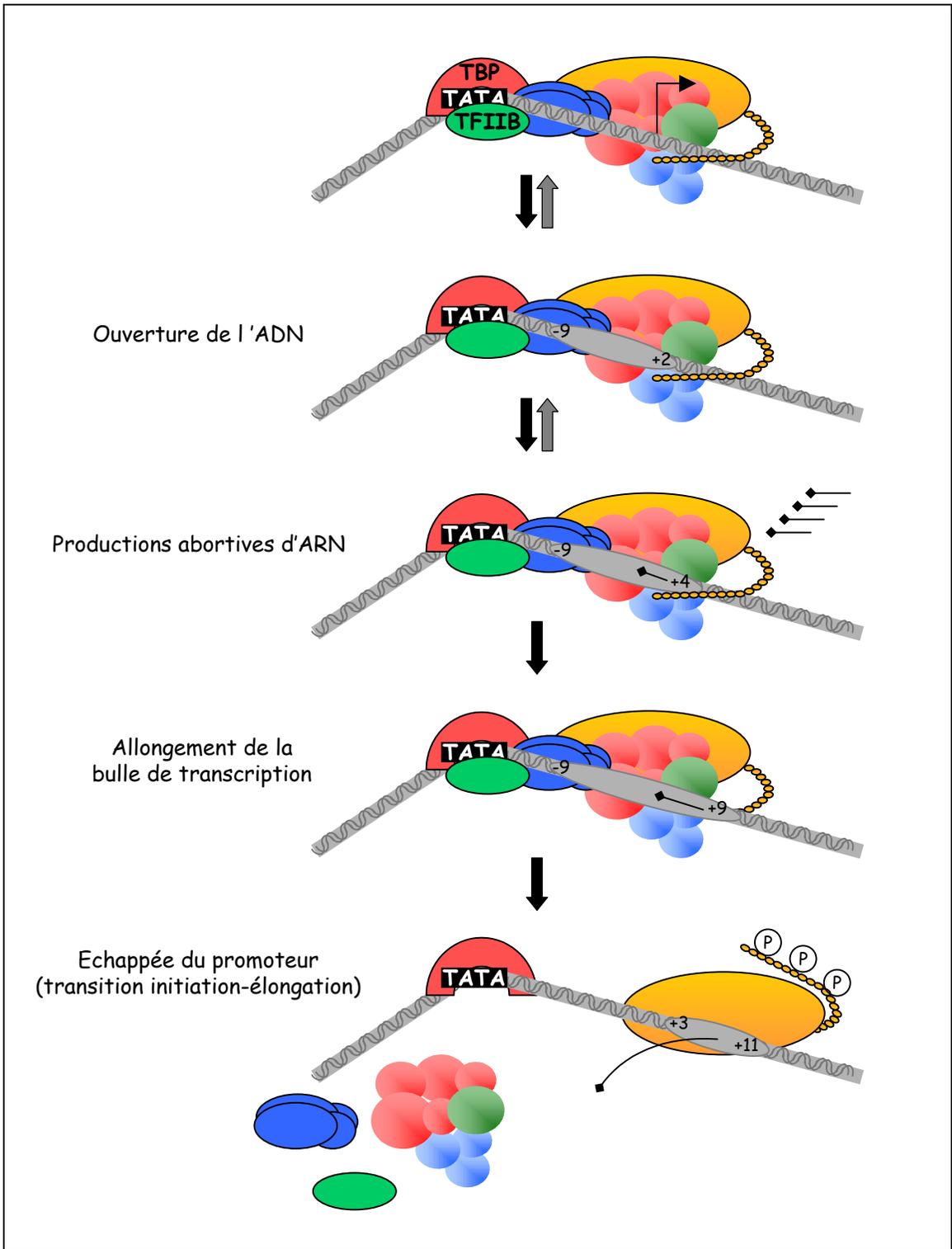


Figure 4 : Les différentes étapes de l'initiation de la transcription.

Au moment de l'association des facteurs d'initiation à l'ADN, celui-ci se trouve dans une conformation double-brin. Après l'assemblage des différents facteurs, l'ADN est ouvert entre les positions -9 et +2. Cette ouverture fait intervenir les activités hélicases de TFIIH (Holstege *et al.*, 1996).

L'initiation de la synthèse de la chaîne d'ARN, par la formation de la première liaison phosphodiester, aboutit à la formation d'un dinucléotide. A ce moment, les facteurs de transcriptions ne sont pas encore amarrés de manière stable à l'ADN puisque l'on peut observer de nombreuses synthèses avortées, s'arrêtant après la formation de cette première liaison (Holstege *et al.*, 1997). Un complexe de transcription stable n'est obtenu qu'après la formation du produit de 4 nucléotides (Holstege *et al.*, 1996).

Il s'en suit alors un allongement de la bulle, au fur et à mesure de l'allongement de l'ARN, jusqu'à la position +9 (Holstege *et al.*, 1997). La troisième transition prend place lorsque la bulle se déplace pour atteindre le nucléotide situé en position +11. Ce passage de l'initiation à élancement est appelé "échappée du promoteur" (*promoteur escape*) car le complexe situé en +11 est incapable de ré-initier la transcription et que la région -9/+2 de l'ADN ré-adopte la conformation double-brin. La phosphorylation du CTD par TFIIH semble être l'évènement clef de cette étape de la transcription (Yan et Gralla, 1999). Cette phosphorylation pourrait déstabiliser les interactions entre l'ARN Pol II et les facteurs d'initiation. En effet, TBP et TFIIIE interagissent préférentiellement avec la forme non phosphorylée de l'ARN Pol II, suggérant que lorsque celle-ci est hyperphosphorylée, TBP et TFIIIE s'en désolidarisent (Usheva *et al.*, 1992; Maxon *et al.*, 1994).

La réaction d'initiation s'achève enfin par le départ des facteurs d'initiation de la bulle de transcription. TFIIIB, partirait le premier, suivi de TFIIIE, de TFIIIF (bien que faisant également partie des facteurs d'élancement, il peut se dissocier lors de l'initiation puis se ré-associer lors de l'élancement) et TFIIH (Zawel *et al.*, 1995). Certains facteurs de transcription (en particulier TFIIID, TFIIH et TFIIIE) peuvent cependant être maintenus sur le promoteur par un activateur transcriptionnel (Yudkovsky *et al.*, 2000). Ils forment ainsi un squelette "prêt à l'emploi" pour ré-initier la transcription, permettant ainsi un mode de régulation où un gène donné est transcrit à plusieurs reprises, en réponse à un stimulus soutenu par exemple.

4- L'ÉLONGATION DE LA TRANSCRIPTION

La vitesse d'élongation de l'ARN Pol II *in vitro* (100-300 nucléotides/minute) est bien inférieure à celle observée *in vivo* (1200-2000 nucléotides/minute) (Ucker et Yamamoto, 1984; Tennyson *et al.*, 1995). Ceci est dû, entre autres, au fait que l'ARN Pol II est fréquemment arrêtée sur des sites de pause, au niveau desquels la transcription et la translocation de la bulle ne se font plus de manière synchrone. En effet, lorsqu'elle est arrêtée, la polymérase peut revenir en arrière, entraînant avec elle la bulle de transcription. Bien que ce retour en arrière stabilise l'hybride ARN/ADN, la polymérase est alors incapable de reprendre la transcription par elle-même (Komissarova et Kashlev, 1997). Le rôle des facteurs d'élongation est donc d'empêcher l'ARN Pol II de s'arrêter, augmentant ainsi la vitesse de polymérisation.

L'élongation de la transcription débute quand les facteurs d'élongation prennent place aux côtés de la polymérase, chassant ainsi les facteurs d'initiation. On peut classer les facteurs d'élongation en plusieurs catégories : 1) TFIIF, l'élongine et ELL augmentent le taux global d'élongation de la chaîne d'ARN; 2) TFIIS permet à l'ARN Pol II de repartir lorsqu'elle est arrêtée; 3) P-TEFb stimule l'élongation par phosphorylation du CTD; 4) DSIF, NELF et le Facteur 2 favorisent l'arrêt de la polymérase; et enfin, 5) FACT régule le taux d'élongation à travers les nucléosomes (voir page 29).

TFIIF s'associe directement à l'ARN Pol II. Cette association induit un changement de conformation de l'enzyme, empêchant l'arrêt de la polymérase au niveau de sites de pauses transitoires (Aso *et al.*, 1995 et Lei *et al.*, 1999). L'élongine (ou facteur SIII), constituée de trois protéines de 110 (sous-unité A), 18 (B) et 15 KDa (C), augmente la vitesse de polymérisation de l'ARN (Reines *et al.*, 1996) et supprime les pauses (Bradsher *et al.*, 1993). ELL est un polypeptide de 80 KDa qui augmente également la vitesse de synthèse de l'ARN (Reines *et al.*, 1996). ELL peut également faire partie d'un complexe nommé Holo-ELL qui contient au moins trois autres protéines de poids moléculaires de 20, 30 et 45 KDa (Shilatifard *et al.*, 1996) et qui, par opposition à ELL, n'est pas capable de réguler positivement l'élongation de la transcription dans un test *in vitro*.

La protéine de 38 KDa TFIIS (ou SII) interagit avec la grande sous-unité de l'ARN Pol II et permet à celle-ci de reprendre l'élongation, par un mécanisme impliquant le clivage de l'ARN synthétisé puis une resynthèse de l'ARN (Nudler *et al.*, 1994; Rudd *et al.*, 1994).

L'hétérodimère P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*), formé de la kinase cdk9 et de la cycline T, permet l'allongement des transcrits grâce à la phosphorylation du

domaine CTD de l'ARN Pol II (Marshall *et al.*, 1996). L'élongation peut d'ailleurs être bloquée par le DRB (5,6-dichloro-ribofuranosylbenzimidazole), un analogue de nucléosides connu pour inhiber les kinases dépendante de cyclines (pour une revue : Jones, 1997). En l'absence de P-TEFb, deux facteurs négatifs d'élongation, DSIF (*DRB Sensitivity Inducing Factor*) et NELF (*Negative Elongation Factor*), s'associent à l'ARN Pol II et s'opposent à sa progression au delà de quelques dizaines de nucléotides après le site d'initiation (Yamaguchi *et al.*, 1999a et Yamaguchi *et al.*, 1999b). La phosphorylation du CTD par P-TEFb favorise la dissociation de DSIF et NELF de l'ARN Pol II. Le rôle de la kinase de P-TEFb dans la transcription sera discuté plus en détail dans le chapitre IV.

Enfin, le Facteur 2 inhibe l'élongation mais n'agit pas sur la phosphorylation de la polymérase. Par contre, ce facteur pourrait provoquer une terminaison prématurée de la transcription (Xie et Price, 1997). Le facteur 2 contient un domaine ATPasique et possède la capacité à lier l'ADN simple ou double brin. Ainsi, cette protéine est capable de provoquer le relâchement du transcrit par la polymérase d'une manière ATP dépendante. Ce facteur pourrait déstabiliser le complexe ADN-ARN Pol II.

Il faut enfin noter que les facteurs d'élongation peuvent également être la cible d'activateurs. Ainsi, on peut citer en exemple le gène *hsp70* où l'ARN Pol II en élongation est arrêtée à environ 30 nucléotides en aval du site d'initiation. C'est un choc thermique qui est responsable de la reprise de l'élongation (McKnight, 1996). Ce mécanisme pourrait ainsi permettre une synthèse protéique en réponse immédiate à un stimulus.

CHAPITRE III : REGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LES RECEPTEURS NUCLEAIRES

Chacune des 200 à 300 protéines qui composent la machinerie transcriptionnelle est essentielle à la survie d'un organisme, mais le choix fondamental qui est celui du site d'initiation de la transcription est dévolu à une autre classe de protéines : celle des activateurs transcriptionnels (2000 à 3000 protéines chez les mammifères). La différenciation des cellules se caractérise par la sélection d'un contingent restreint de ces protéines, de manière à réguler de manière cellule-spécifique l'expression des gènes utiles à celle-ci. On sait par exemple que seulement 6 à 8 protéines spécifiques contribuent à la régulation de l'expression d'un gène donné (Thanos et Maniatis, 1995). Ceci est vrai pour les gènes les mieux étudiés chez les vertébrés, mais il est probable que cela soit le cas pour la majorité des gènes. L'utilisation combinatoire des activateurs transcriptionnels permet donc un mode de régulation unique pour l'expression d'un gène donné (ou d'une catégorie fonctionnelle de gènes) en temps et en lieu adéquat.

Les activateurs transcriptionnels contiennent deux domaines fonctionnels autonomes : un domaine de liaison à l'ADN (DBD, pour *DNA binding domain*) et un domaine d'activation de la transcription (AD, pour *activation domain*). Le domaine DBD permet à l'activateur de lier l'ADN sur des séquences spécifiques et le domaine AD constitue une plate-forme pour l'interaction de nombreux co-activateurs. Ces deux propriétés confèrent donc aux activateurs transcriptionnels la capacité de recruter des co-activateurs au niveau de promoteurs spécifiques. Les co-activateurs sont des composants essentiels du mécanisme d'activation de la transcription. Certains agissent en facilitant l'accès à l'ADN et d'autres en recrutant et en modulant l'activité de la machinerie transcriptionnelle (voir paragraphe 2.2). Il faut donc distinguer les activateurs (qui lient l'ADN) des co-activateurs transcriptionnels, dont la table ci-dessous définit en quelques règles les fonctions respectives (table 2).

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. Un activateur donné recrute son co-activateur au niveau de tous les gènes qu'il régule.2. Le co-activateur n'est recruté que dans des conditions physiologiques et un environnement génétique où le domaine AD de l'activateur est fonctionnel et/ou activé.3. Les mutations qui détruisent ou altèrent le domaine AD de l'activateur n'affectent que le recrutement du co-activateur (et pas sa capacité à lier l'ADN). |
|---|

- | |
|---|
| <p>4. La fusion du DBD de l'activateur avec un AD d'un autre activateur permet de recrutement du co-activateur.</p> <p>5. Les co-activateurs sont localisés au niveau du site de fixation à l'ADN des activateurs.</p> <p>6. La fixation des activateurs à l'ADN n'est pas affectée par la présence des co-activateurs ou de la machinerie transcriptionnelle.</p> <p>7. L'arrivée de l'activateur sur le promoteur précède celle du co-activateur.</p> |
|---|

Table 2 : **Règles définissant les fonctions respectives des activateurs et co-activateurs transcriptionnels.** Abréviations : AD, *activation domain* (de l'activateur); DBD, *DNA binding domain* (de l'activateur). Traduit de Featherstone, 2002.

Parmi les activateurs transcriptionnels, certains sont constitutivement actifs, c'est-à-dire que leur activité est présente dans chaque cellule et à tout moment. Ceux-ci jouent probablement un rôle de facilitation dans l'expression de gènes ubiquitairement exprimés et qui codent pour des protéines structurales (actine, tubuline,...) ou des enzymes métaboliques ubiquitaires. A l'opposé, d'autres activateurs sont synthétisés sous forme peu ou pas active et ne sont activés qu'en présence d'un signal approprié, qui peut être la transduction d'un signal extracellulaire (Jun-Fos, CREBs pour *cAMP-response element binding protein*, ou Nf- κ B), une molécule intracellulaire (SREBP, pour *sterol response element binding protein*), l'endommagement du génome (p53), ou encore la fixation d'un ligand spécifique (récepteurs nucléaires). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux activateurs transcriptionnels de la famille des récepteurs nucléaires.

1- LES RECEPTEURS NUCLEAIRES

1.1- Généralités

Les récepteurs nucléaires sont des activateurs transcriptionnels, parfois spécifiques à des tissus ou des types cellulaires donnés, qui régulent les programmes d'expression de gènes cibles en se liant à des éléments de réponse spécifiques situés dans les régions promotrices de ceux-ci. Ils transmettent les effets des hormones stéroïdiennes (œstrogènes, progestérones, androgènes, glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes), des hormones thyroïdiennes, des rétinoïdes, de la vitamine D3 et des activateurs de proliférateurs de péroxisomes sur des

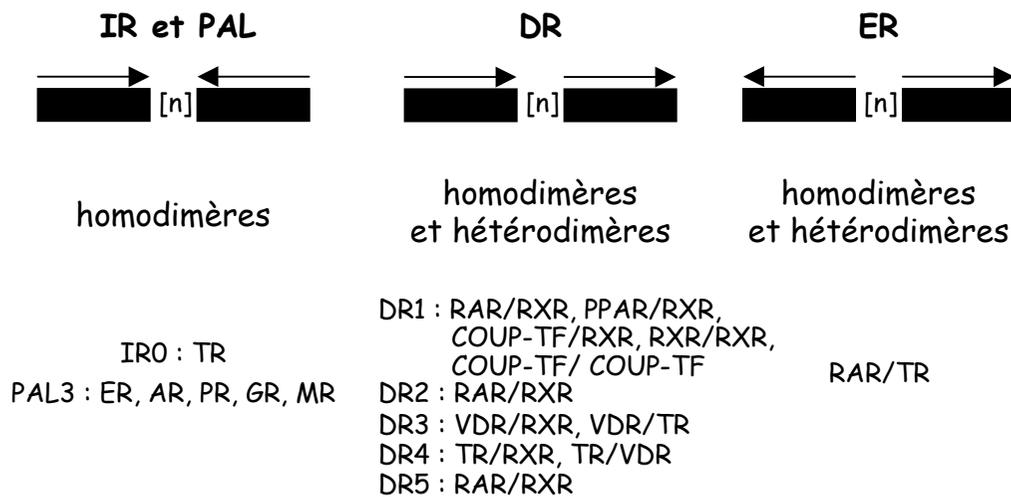
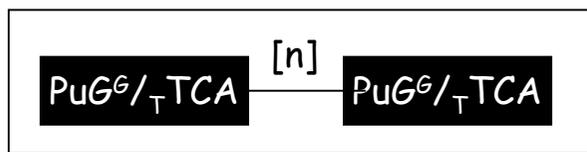
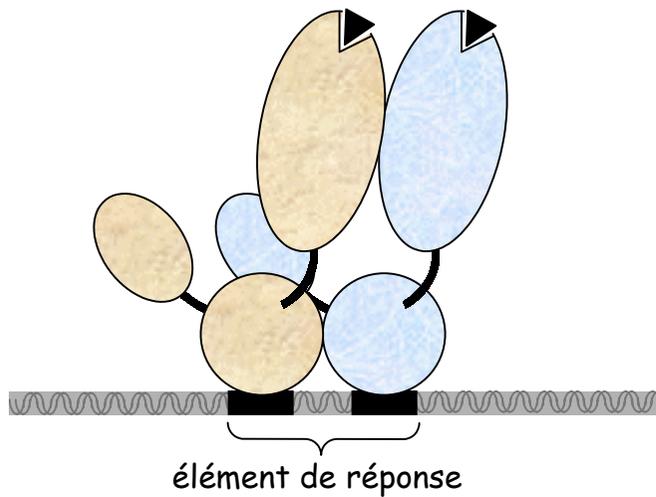


Figure 5 : Les récepteurs nucléaires reconnaissent différents types d'éléments de réponse. Chaque rectangle noir schématise un demi-élément de réponse dont la séquence consensus est indiquée (n représente le nombre de nucléotides séparant les deux répétitions). Les flèches indiquent l'orientation de la séquence de chaque demi-élément. Les IR (Inverted Repeat) et PAL (Palindromic Repeat) ne peuvent fixer que les homodimères, tandis que les DR (Direct Repeat) peuvent fixer les homodimères et les hétérodimères. La plupart des récepteurs nucléaires fixent des DR, dont la valeur de n varie en fonction de la nature de l'hétérodimère. Enfin, les ER (Everted Repeat) peuvent constituer des éléments de réponse pour des hétérodimères RAR/TR (d'après Gronemeyer et Laudet, 1995).

activités biologiques aussi variées que la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement et l'homéostasie.

La majorité des récepteurs nucléaires agissent sous la forme de dimères. Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (ER, pour *estrogen receptor*; AR, pour *androgen receptor*; PR, pour *progesterone receptor*; GR, pour *glucocorticoid receptor* et MR, pour *mineralocorticoid receptor*) forment des homodimères. D'autres récepteurs nucléaires peuvent former soit des homo- soit des hétérodimères, ce qui complique cette voie de signalisation. A titre d'exemple, le récepteur RXR (*retinoid X acid receptor*) peut soit former des homodimères, soit être le partenaire d'hétérodimérisation des récepteurs RAR (*retinoic acid receptor*), TR (*thyroid hormone receptor*), VDR (*vitamin D receptor*), PPAR (*peroxysome proliferator-activated receptor*) ou de récepteurs orphelins comme COUP-TF (*chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor*) ou LXR (*liver X receptor*).

Les dimères de récepteurs nucléaires régulent l'expression de gènes cibles en se liant à l'ADN au niveau de séquences régulatrices appelées élément de réponse (RE, pour *response element*) qui peuvent se situer à plusieurs kilobases du gène cible. Ces éléments de réponse sont, en général, constitués de deux copies d'une séquence consensus 5'(PuG(G/A/T)(T/A)CA)3' ou de séquences apparentées (Glass, 1994) (figure 5). Ils peuvent contenir ces deux motifs en répétition directe (DR, pour *direct repeat*), en répétition indirecte (IR, pour *inverted repeat*), en répétition inversée (ER, pour *everted repeat*) ou en arrangement palindromique (PAL), espacés par un nombre variable de nucléotides.

1.2- Structure des récepteurs nucléaires

L'analyse des séquences peptidiques des différents récepteurs nucléaires a permis de définir des régions fonctionnelles présentes chez tous les membres de cette superfamille : les régions A/B, C, D et E ainsi qu'une région F qui est absente chez certains récepteurs (Gronemeyer et Moras, 1995 et Beckett, 2001) (figure 6).

La région A/B est peu conservée au sein de la famille des récepteurs nucléaires, tant en séquence qu'en taille. Elle contient une fonction activatrice indépendante du ligand (AF-1, pour activation fonction 1) qui est spécifique à certains promoteurs et types cellulaires (Bocquel *et al.*, 1989 et Tora *et al.*, 1989).

La région C, relativement bien conservée, définit l'appartenance à la famille des récepteurs nucléaires (Schwabe, 1990; Zechel *et al.*, 1994a; Zechel *et al.*, 1994b). Elle compte entre 66 et

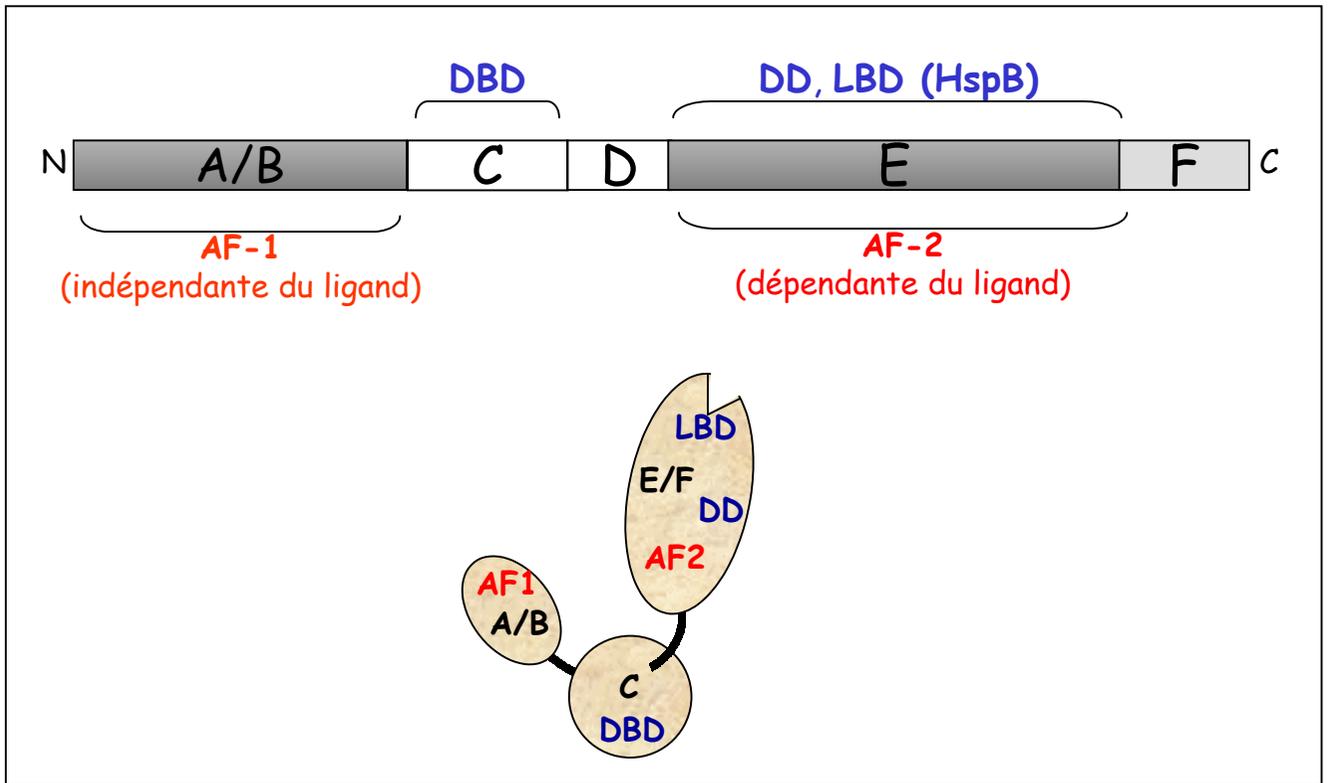


Figure 6 : **Organisation structurale des récepteurs nucléaires en régions fonctionnelles.** Les récepteurs nucléaires sont organisés en 6 régions fonctionnelles (A à F), déterminées sur la base d'homologies de séquence et de fonction. DBD : DNA Binding Domain; LBD : Ligand Binding Domain; DD : Dimerization Domain, HspB : Hsp Binding; AF : activation function.

68 acides aminés et correspond au domaine de fixation à l'ADN (DBD, pour *DNA binding domain*). Cette fixation est permise par deux régions en doigts de zinc formée chacune par 4 cystéines.

La région D est faiblement conservée et correspond à une région charnière entre les régions C et E. Elle peut être impliquée dans la fixation à l'ADN, dans le cas du récepteur RXR (Lee *et al.*, 1993), et dans la localisation nucléaire du récepteur (Ylikomi *et al.*, 1992).

La région E, qui présente également une très forte conservation intra- et inter-espèces (Laudet *et al.*, 1992), comprend environ 250 résidus avec un caractère général hydrophobe et correspond au domaine de liaison du ligand (LBD, pour *Ligand binding domain*). En plus de cette fonction, la région E contient une fonction activatrice de la transcription dépendante du ligand (AF-2, pour *activation function 2*), une interface de dimérisation (DD, pour *dimerization domain*), (Gronemeyer *et al.*, 1995), un domaine d'interaction pour les protéines hsp dans le cas des récepteurs stéroïdiens (Housley *et al.*, 1990) et parfois un signal de localisation nucléaire (Picard et Yamamoto, 1987 et Zhou *et al.*, 1994). La fonction activatrice AF-2 est dite dépendante du ligand car son rôle est de recruter les co-régulateurs (co-activateurs ou co-répresseurs, selon la présence ou l'absence du ligand) des récepteurs nucléaires (voir page 34).

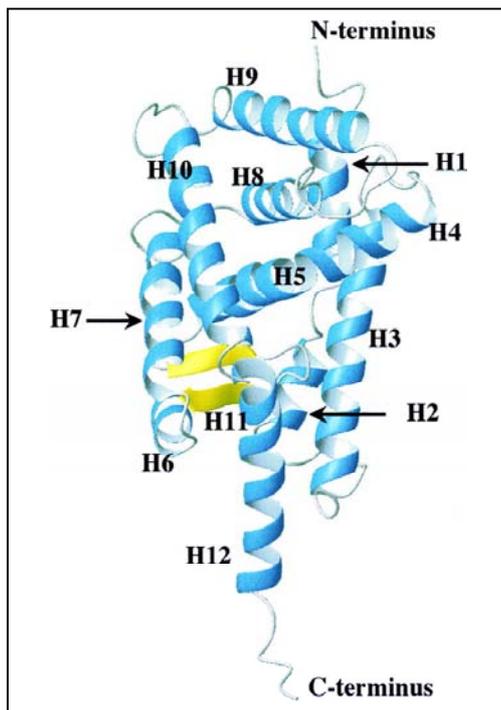


Figure 7 : **Structure du domaine de fixation du ligand (LBD) des récepteurs nucléaires.** Structure tri-dimensionnelle du LBD de RXR en absence de son ligand. La représentation en ruban montre l'organisation du LBD en 12 hélices α et deux feuillets β (en jaune). Les hélices sont numérotés de H1 (à l'extrémité amino-terminale) à H12 (à l'extrémité carboxy-terminale) (Beckett, 2001).

Le domaine LBD des récepteurs nucléaires adopte un repliement communément appelé "sandwich d'hélices". Le LBD de RXR est en effet composé de 12 hélices α (H1 à H12) arrangées en trois couches (figure 7). Les hélices H4, H5, H8, H9 et l'extrémité amino-terminale de l'hélice H11 sont prises en sandwich entre les hélices H1, H2 et H3 d'un côté, et les hélices H6, H7, et H10 de l'autre. Les seules structures non hélicoïdales de ce domaine sont deux courts

feuillet β qui forment une épingle à cheveux. Le site de liaison du ligand est une poche hydrophobe délimitée par cette épingle à cheveux, les hélices H3, H5, H7 et H11, et la boucle L11-12. L'hélice H12, à l'extrémité carboxy-terminale, pointe vers l'extérieur du "cœur" du LBD, formé par les 11 autres hélices et les feuillets β .

Enfin, la région F est absente chez certains récepteurs et son taux de conservation est faible. Dans le cas du récepteur à l'acide rétinoïque α (RAR α), la présence de cette région semble indispensable à l'activité de sa fonction AF-2 (Tate *et al.*, 1996).

1.3- Cas des récepteurs de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque agit par l'intermédiaire de deux familles de récepteurs : les RAR et les RXR. Chaque famille se compose de 3 isotypes génétiques (α , β et γ) et chaque isotype comporte 2 isoformes majeures, engendrées par utilisation de 2 promoteurs et/ou par épissage alternatif, qui se distinguent par leurs séquences amino-terminales. La forte conservation entre espèces de ces régions amino-terminales suggère que chacune de ces isoformes remplit une fonction bien spécifique (pour une revue : Leid *et al.*, 1992).

Les récepteurs RAR sont capables de lier à la fois l'acide rétinoïque tout-trans (t-RA) et 9-cis alors que les RXR ne lient que l'acide rétinoïque 9-cis. Un effet synergique des ligands spécifiques des RAR et des RXR a été démontré sur l'activation de gènes cibles, la prolifération, l'apoptose, la différenciation de nombreux types cellulaires (Apfel *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1995; Joseph *et al.*, 1998) ainsi que sur le développement embryonnaire du poulet (Lu *et al.*, 1997) et de la souris (Elmazar *et al.*, 1997). Cependant, la fonction activatrice de RXR est subordonnée à la liaison du ligand de RAR, c'est-à-dire que RAR/RXR est transcriptionnellement inactif tant que RAR n'a pas fixé son ligand (Vivat *et al.*, 1997). En effet, lorsqu'il se trouve au sein de l'hétérodimère RAR/RXR, le récepteur RXR est incapable de fixer son ligand (Kurokawa *et al.*, 1994 et Forman *et al.*, 1995). Cette subordination n'est pas observée dans le cas des hétérodimères PPAR/RXR et LXR/RXR (Forman *et al.*, 1995; et Mukherjee *et al.*, 1997).

En l'absence de son ligand, RXR forme des tétramères stabilisés grâce à l'interaction de l'hélice 12 d'un RXR (qui pointe vers l'extérieur du LBD) et le LBD de son "voisin" (Kersten *et al.*, 1995 et Gampe *et al.*, 2000). Cet arrangement exclu toute possibilité d'hétérodimérisation avec RAR ou d'interaction avec ses co-activateurs, ce qui est certainement à l'origine de l'auto-répression de son activité transcriptionnelle observée lors de cette oligomérisation (Kertsen *et al.*, 1998).

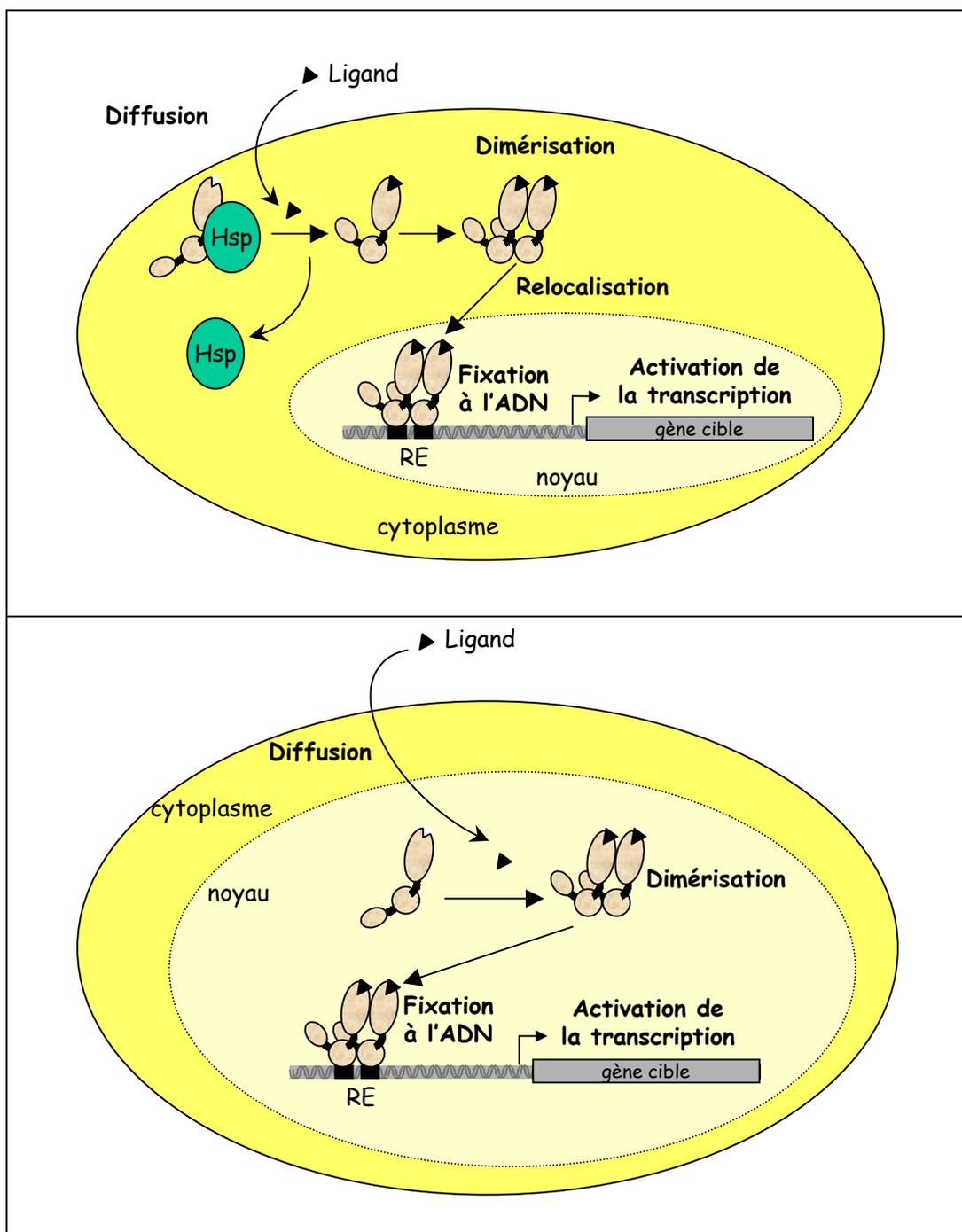


Figure 8 : Représentation schématique et simplifiée du mode d'action des récepteurs nucléaires. En haut : cas des récepteurs aux hormones stéroïdienne, dont l'activation par la liaison de l'hormone (lipophile) implique un relargage des protéines chaperonnes Hsp, qui permet leur homodimérisation et leur relocalisation vers le noyau. En bas : cas des autres récepteurs nucléaires, dont certains sont liés à l'ADN même en absence de ligand (cas non représenté). RE : response element.

La majorité des RARE (*retinoic acid response element*) naturels sont des répétitions directes avec un espacement de 5 nucléotides (DR5, pour *direct repeat 5*), mais il existe aussi des DR1 et des DR2 (Naar *et al.*, 1991; Leid *et al.*, 1992; Mangelsdorf, 1994). La présence d'un RARE dans la région régulatrice d'un gène n'implique pas nécessairement que ce gène soit une cible physiologique des rétinoïdes. Ceci est particulièrement vrai pour les DR1, auxquels peuvent se fixer aussi bien des homodimères (RXR/RXR et COUP-TF/COUP-TF) que des hétérodimères (RAR/RXR, PPAR/RXR, COUP-TF/RXR) (Nakshatri *et al.*, 1994; DiRenzo *et al.*, 1997) (figure 5).

2- MODE D'ACTION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES DANS LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Le ligand des récepteurs nucléaires entre librement dans la cellule, par dissolution dans les couches phospholipidiques (diffusion passive). Certains ligands doivent ensuite être métabolisés, comme la vitamine A qui est transformée en acide rétinoïque tout-trans ou 9-cis (voir plus bas). La fixation du ligand sur son récepteur aboutit alors à son activation, qui se traduit par (selon la nature du récepteur) la dissociation de protéines chaperones de type hsp (dans le cas des récepteurs stéroïdiens), une relocalisation vers le noyau (dans le cas des récepteurs stéroïdiens (Htun *et al.*, 1996)), la dimérisation du récepteur et sa fixation sur son élément de réponse (figure 8).

A l'échelle moléculaire, l'activation des récepteurs nucléaires induite par la fixation du ligand sur le LBD se caractérise par des modifications conformationnelles de ce domaine (figure 9). Lorsque le ligand pénètre dans la poche hydrophobe du LBD, l'hélice H12, qui pointe vers l'extérieur en absence de ligand, se replie et referme la cavité en établissant des ponts salins avec d'autres hélices (Bourguet *et al.*, 1995 et Renaud *et al.*, 1995). Ce réarrangement est accompagné d'une compaction générale du LBD, entraînant la stabilisation des dimères sur leur élément de réponse, et rend accessibles certains sites de phosphorylation (Wurtz *et al.*, 1996). Enfin et surtout, ces modifications conformationnelles créent une nouvelle surface de fixation pour des co-activateurs transcriptionnels, après un éventuel relargage de co-répresseurs (voir page 40) (Moras et Gronemeyer, 1998 et Xu *et al.*, 1999). Après avoir abordé le rôle de la structure chromatinienne dans la régulation de la transcription, nous étudierons comment certains co-activateurs permettent la transcription des gènes cibles des activateurs en modifiant localement la chromatine.

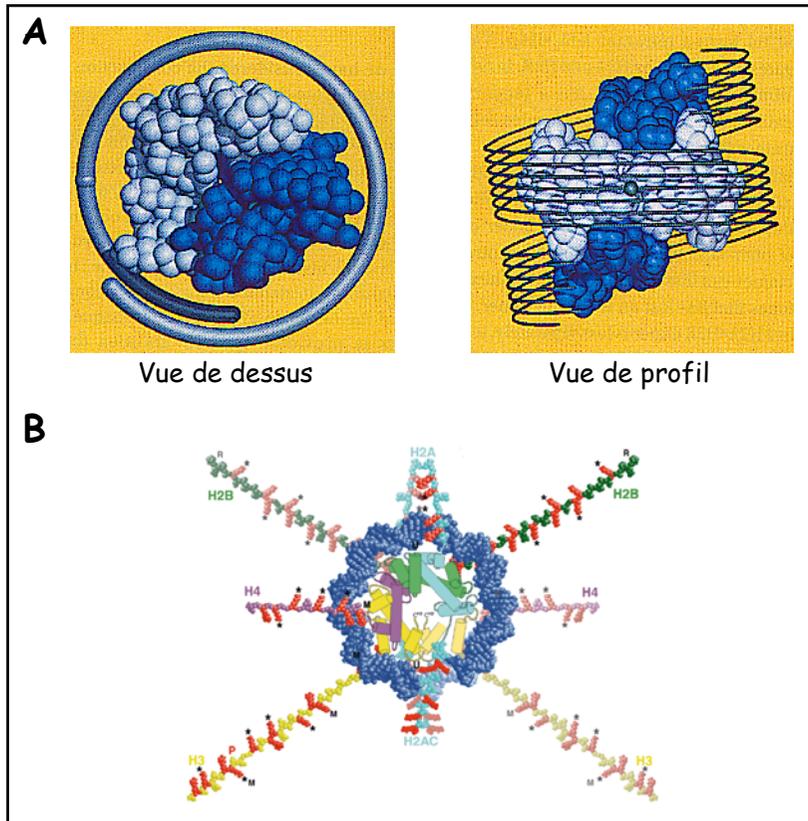


Figure 10 : **Le nucléosome**. **A** : Représentation schématique d'un nucléosome, montrant les deux hétérotétramères H2A-H2B en bleu foncé, les deux hétérodimères H3-H4 en bleu clair et l'ADN enroulé sur 1,65 tours autour du cœur de l'octamère d'histones. **B** : Représentation d'un nucléosome mettant en évidence que les extrémités amino-terminales (queues) des histones pointent vers l'extérieur du nucléosome (l'hélice bleue représentant l'ADN). Les modifications de la queue des histones sont également représentées (* = acétylation, M = méthylation, P = phosphorylation).

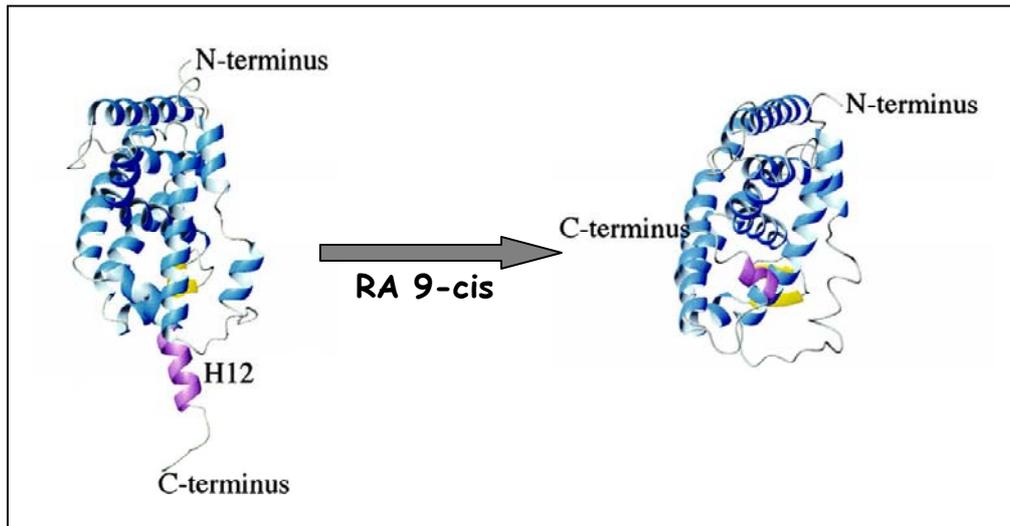


Figure 9 : **Modification de la structure tri-dimensionnelle du LDB lors de la fixation du ligand.** La représentation en ruban du LBD de RXR lié (à droite), ou non (à gauche), à son ligand met en évidence le mouvement de l'hélice 12 (représentée en violet) vers le cœur du domaine (en bleu). Le ligand (l'acide rétinoïque 9-cis) n'est pas représenté sur ce diagramme (d'après Beckett D, 2001).

2.1- Chromatine et régulation de la transcription

2.1.1- Structure de la chromatine

Chez les eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines au sein d'une structure appelée chromatine. Les principales protéines de la chromatine sont les histones, des protéines très conservées et chargées positivement (basiques) qui s'associent très étroitement avec l'ADN (grâce à des charges négatives). En microscopie électronique, la chromatine donne l'image d'un chapelet de perles où des segments d'ADN nu séparent des repliements globulaires composés d'ADN et d'histones : les nucléosomes. Chaque nucléosome, d'un diamètre de 10 nm, est constitué de deux hétérodimères d'histones H2A-H2B et d'un tétramère d'histones H3-H4 autour desquels l'ADN s'enroule en faisant 1,65 tour sur une longueur totale de 146 paires de bases (Arents *et al.*, 1991) (figure 10). Si les régions des histones qui forment le cœur globulaire de l'octamère sont responsables des interactions entre histones et ADN, les régions aminoterminales de ces histones, riches en lysine, pointent vers l'extérieur des nucléosomes et sont la cible de nombreuses modifications covalentes (voir page 30). Cet assemblage nucléoprotéique est verrouillé par les histones H1 et H5 ("linker histones") qui interagissent avec l'ADN. Deux nucléosomes sont séparés par environ 20 à 90 paires de bases. Le chapelet de nucléosomes est

enroulé sur lui-même selon une hélice régulière (solénoïde) comprenant 6 nucléosomes par tour (pour une revue : van Holde et Zlatanova, 1996) (figure 11). La structure en solénoïde d'un diamètre de 30 nm est ancrée de façon transitoire sur la matrice nucléaire, formant ainsi des boucles d'ADN ayant une taille de 60 kb. Enfin, des protéines non-histone du groupe HMG (*high-mobility group*) ou SIR (*silent information regulator*) participent à un empaquetage encore plus complexe de l'ADN, allant de l'euchromatine, où des régions activement transcrites sont décondensées, à l'hétérochromatine, la structure la plus dense qui caractérise les régions silencieuses du génome.

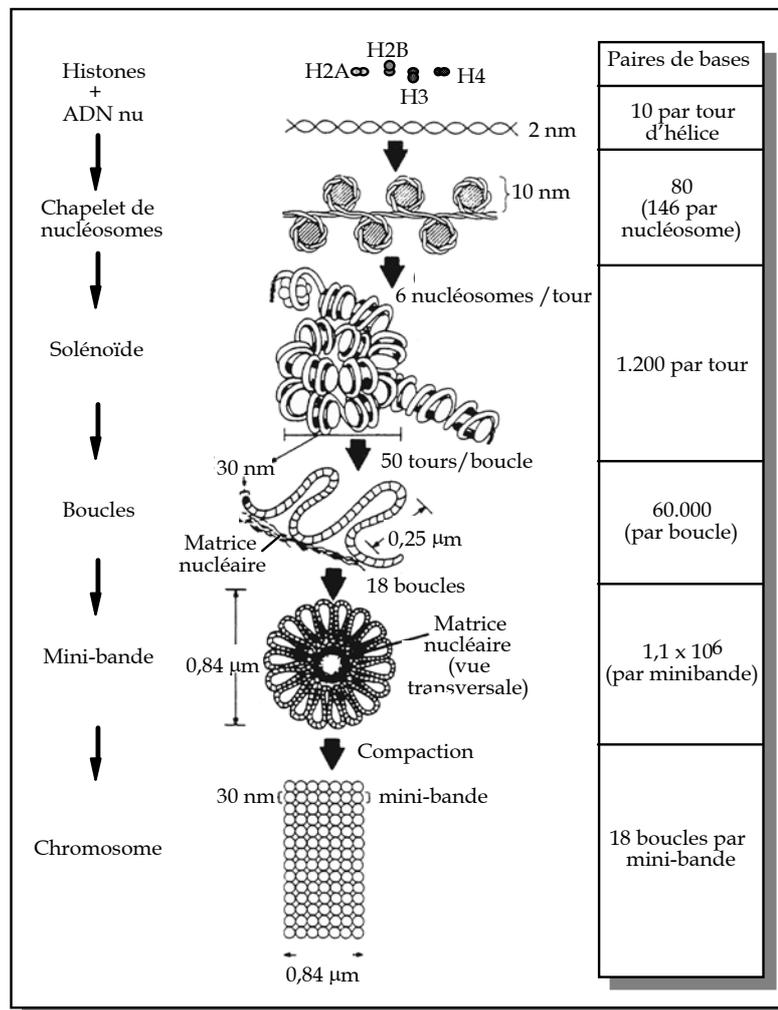


Figure 11 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN au sein des chromosomes.

La chromatine est assemblée lors de la réplication grâce à des complexes spécialisés appelé ACF (*ATP-utilizing Chromatine assembly and remodeling Factor*) contenant entre autres les facteurs CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) et NAP-1 (*Nucleosome Assembly Protein 1*). La

protéine NAP-1 peut stimuler l'association des facteurs de transcription sur un mononucléosome par un mécanisme impliquant un déplacement des histones H2A et H2B (Walter *et al.*, 1995).

2.1.2- Chromatine et transcription

La chromatine est une structure dense qui limite l'accès à l'ADN pour les protéines du métabolisme de l'ADN (dont la machinerie transcriptionnelle) et réprime ainsi l'expression des gènes. La capacité des nucléosomes à réprimer la transcription a été montrée *in vitro* (Kornberg et Lorch, 1999) et *in vivo* (Grunstein, 1990). La déplétion en nucléosomes, due à une absence de synthèse d'histone H4, mène en effet à l'activation de tous les promoteurs contenant une boîte TATA analysés, et cela en l'absence des protéines permettant leur activation dans un contexte normal (Grunstein, 1990). Par ailleurs, la présence des histones H1 et H5, dans un test de transcription *in vitro* utilisant pour matrice un ADN contenant deux nucléosomes, inhibe fortement la transcription (Ura *et al.*, 1997).

La chromatine n'est pas seulement un obstacle à l'initiation de la transcription, elle est également un frein à l'élongation. Il existe des facteurs qui aident l'ARN Pol II à transcrire à travers les nucléosomes. La purification de la polymérase en élongation a en effet permis l'identification du facteur FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription*) qui permet à une ARN Pol II arrêtée au niveau d'un nucléosome de reprendre la transcription indépendamment de l'hydrolyse d'ATP et des facteurs TFIIF ou TFIIS (Orphanides *et al.*, 1998). La fonction de FACT implique probablement la fixation directe des dimères H2A/H2B et la dissociation des octamères d'histone (Orphanides *et al.*, 1999). Chez la levure, le complexe *Elongator*, identifié chez la levure (Otero *et al.*, 1999) et chez l'Homme (Hawkes *et al.*, 2002 et Kim *et al.*, 2002), semble jouer un rôle similaire. Le complexe DSIF (formé des protéines Spt4 et Spt5) participe également à l'élongation de la transcription *in vivo* (Andrulis *et al.*, 2000 et Kaplan *et al.*, 2000), probablement par un mécanisme impliquant le remodelage de la chromatine (Winston et Sudarsanam, 1998). Enfin, il faut noter que la transcription ne requiert pas le relargage complet des nucléosomes puisque la machinerie de transcription semble pouvoir tourner autour du nucléosome déplaçant ainsi la bulle de transcription autour de lui (Studitsky *et al.*, 1997).

Nous ne nous intéresserons désormais qu'au remodelage de la chromatine nécessaire à l'initiation de la transcription lors de son activation par les récepteurs nucléaires.

2.1.3- Remodelage de la chromatine

Afin de pouvoir accéder à un espace suffisant pour que les facteurs d'initiation puissent prendre place au niveau du promoteur et permettre l'ouverture du double brin d'ADN, la chromatine doit être remodelée. Ce remodelage fait intervenir une machinerie cellulaire spécialisée comportant des enzymes capables de modifier covalamment les histones par acétylation, phosphorylation ou méthylation, rompant ainsi les liaisons ADN-histones et permettant la translocation des nucléosomes (pour une revue : Berger, 2002).

a) Acétylation des histones

Les histones H3 et H4 peuvent être acétylés au niveau de résidus lysine situés dans leur partie amino-terminale, qui s'étend en dehors de la structure globulaire de l'octamère d'histone (Kuo *et al.*, 1996). La stabilité des interactions ADN-histones semble être réduite par cette neutralisation des charges basiques portées par les lysines. Cette acétylation conduit donc à une forme moins condensée de la chromatine, où les nucléosomes ne sont néanmoins que partiellement déstructurés (Oliva *et al.*, 1990; van Holde *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993; Vettese-Dadey *et al.*, 1996).

L'acétylation des histones est un processus réversible catalysé par les enzymes appelées HAT (*histone acetyl-transferase*). De nombreux co-activateurs transcriptionnels se sont avérés posséder une telle activité enzymatique. On peut citer par exemple p300/CBP, p/CAF ou TAFII250 (pour des revues : Brownell et Allis, 1996 et Grant et Berger, 1999). Chez la levure, l'enzyme HAT la mieux caractérisée est l'homologue de p/CAF : GCN5, (Kuo *et al.*, 1996). Ces deux protéines homologues semblent jouer un rôle important puisqu'elles sont présentes dans des complexes macromoléculaires qui contiennent un ensemble de TAFs plus ou moins conservés et sont intimement liés à la transcription. Il s'agit du complexe SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase complex*) chez la levure et PCAF chez l'humain (Grant *et al.*, 1998; Wieczorek *et al.*, 1998, Ogryzko *et al.*, 1998; pour une revue : Naar, 2001).

Il existe par ailleurs des régulateurs transcriptionnels, comme les membres de la famille protéique Rpd3 (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC3A ou encore HDAC3B), qui possèdent une activité désacétylase (HDAC, pour *histone de-acetylase*) qui permet à la chromatine de revenir à un état plus condensé (Taunton *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; pour une revue : Johnson et Turner, 1999). Ces observations ont permis d'établir un modèle dans lequel les activités

d'acétylation sont ciblées vers les régions promotrices des gènes qui doivent être exprimés, rendant ainsi l'ADN accessible aux facteurs de transcription. L'activité transcriptionnelle peut également être contrôlée par le biais des régulateurs qui désacétylent les histones et qui, en conséquence, influencent négativement la liaison des facteurs de transcription à l'ADN (Hendzel *et al.*, 1994; Wade *et al.*, 1997, Kuo et Allis, 1998, Wolffe et Hayes, 1999).

En plus de modifier la structure chromatinienne, l'acétylation des histones pourrait constituer un marquage pour le recrutement d'autres protéines. Les résidus Lys acétylés peuvent en effet être reconnus par un motif d'environ 110 résidus appelé "bromodomaine" et présent dans p/CAF, p300/CBP et TAFII250 (Dhalluin *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 2000; Jacobson RH, 2000 et Manning *et al.*, 2001). TAFII250 a la particularité de posséder deux bromodomains en tandem qui interagissent fortement avec l'histone H4 doublement acétylé sur des résidus lysine (Jacobson *et al.*, 2000). Cette double acétylation pourrait donc constituer un signal, reconnu par TAFII250, qui permettrait le recrutement de TFIID et l'assemblage et/ou la stabilisation du complexe de pré-initiation autour du promoteur ainsi marqué (Naar, 2001). Les bromodomains de p/CAF et de son homologue GCN5 permettent également une interaction avec les Lys acétylées des histones (Dhalluin *et al.*, 1999). Cette interaction stimule le taux d'acétylation observé au cours de l'activation de la transcription, suggérant que l'acétylation préalable des histones par p300/CBP permette le recrutement de p/CAF via son bromodomaine.

b) Phosphorylation des histones

La phosphorylation du résidu sérine en position 10 (Ser10) de l'histone H3 est associée à l'activation de la transcription chez la levure, la drosophile et les mammifères (Mahadevan *et al.*, 1991; Kogel *et al.*, 1998; DaManno *et al.*, 1999; Chadee *et al.*, 1999 et Nowak *et al.*, 2000). Ce résidu peut être la cible de la kinase Snf1 chez la levure (Lo *et al.*, 2001) ou de deux kinases, appartenant à la famille des Rsk (Sassone-Corsi *et al.*, 1999) ou des Msk (Thomson *et al.*, 1999) chez les mammifères.

Il semble exister une intime connexion entre la phosphorylation de la Ser10 et l'acétylation des résidus Lys adjacents. En effet, l'histone H3 présent au niveau des loci transcriptionnellement actifs est doublement modifié : en plus de la phosphorylation de la Ser10, il est acétylé sur la Lys9 et/ou 14 (Clayton *et al.*, 2000 et Cheung *et al.*, 2000). Par ailleurs, chez la levure, la mutation de la Ser10 inhibe l'activation du gène *INO1*, dont la régulation implique l'histone acétyl-transférase GCN5 (Lo *et al.*, 2000). Il a été montré que la phosphorylation de la

Ser10 par Snf1 favorise l'acétylation de la Lys14 par GCN5 (Cheung *et al.*, 2000 et Lo *et al.*, 2001), suggérant une coopération entre des modifications survenant sur des résidus adjacents (voir plus bas).

La phosphorylation de l'histone H1 semble également être couplée au déroulement de la transcription (Chadee *et al.*, 1997). L'histone H1 ne peut être phosphorylé que lorsqu'il est dissocié de la chromatine (Jerzmanowski et Cole, 1992) et, bien qu'il ne soit pas clairement établi si cette phosphorylation a lieu avant ou après l'initiation de la transcription, elle semble maintenir la chromatine dans un état décondensé afin de permettre à la transcription d'avoir lieu (Roth et Allis, 1992).

c) Méthylation des histones

Il existe deux types de HMT (histone methyl-transferase), selon qu'elles ciblent des résidus lysine ou arginine. La première HMT identifiée fut SUV39H1 (Rea *et al.*, 2000), une protéine dont les homologues chez la levure et la drosophile furent initialement localisés dans des régions transcriptionnellement inactives que sont l'hétérochromatine (Tschiersch *et al.*, 1994). SUV39H1 est capable de méthyler *in vitro* la lysine en position 9 (Lys9) de l'histone H3 mais cette méthylation est inhibée par la phosphorylation préalable de la Ser10 adjacente (Rea *et al.*, 2000) (figure 12). *In vivo*, cette modification permet le recrutement de la protéine HP1, dont la fonction de répresseur transcriptionnel est bien connue, au niveau de l'hétérochromatine (Bannister *et al.*, 2001).

Il existe par ailleurs deux familles de HMT (*histone methyl transferase*) modifiant les histones sur des résidus arginine : CARM1 (*co-activator-associated arginine methyltransferase 1*, voir plus bas) et PRMT1 (*protein arginine methyltransferase 1*). CARM1 est un co-activateur capable de méthyler *in vitro* les histones H3 et H2B sur plusieurs résidus arginine (Chen *et al.*, 1999 et Schurter *et al.*, 2001), et son activité enzymatique est essentielle à l'activation de gènes cibles (Chen *et al.*, 1999). PRMT1 pour sa part est une méthyl-transférase spécifique au résidu arginine en position 3 (Arg3) de l'histone H4, à la fois *in vitro* et *in vivo*, démontrant ainsi la réalité physiologique d'une telle modification (Wang *et al.*, 2001a et Wang *et al.*, 2001b). La méthylation de l'Arg3 facilite l'acétylation de la lysine en position 8 (Lys8) de l'histone H4 par p300/CBP, mais à l'inverse l'acétylation de H4 inhibe sa méthylation par PRMT1 (Wang *et al.*, 2001b) (figure 12).

d) Ubiquitylation des histones

L'ubiquitylation des histones est une autre forme de modification de la chromatine, qui pourrait affecter à la fois la ségrégation des chromosomes et la transcription. Les formes ubiquitylées des histones H2B et H2A sont effectivement associées à la fraction transcriptionnellement active de la chromatine (Davie et Murphy, 1990 et Davie et Murphy, 1994). La modification de l'histone H2A, qui consiste en l'ajout d'une chaîne poly-Ub, a lieu sur son résidu Lys119 (Nickel *et al.*, 1989). L'ubiquitylation de H2B a quant à elle lieu sur le résidu Lys123 et est catalysée par Ubc2 (Robzyk *et al.*, 2000). L'ubiquitylation de l'histone H2B diminue à la fois son affinité de liaison à l'ADN, l'association des histones H2A et H2B au nucléosome et la liaison de l'histone H1, favorisant la transcription en maintenant la chromatine dans un état accessible (Robzyk *et al.*, 2000).

Par ailleurs, le facteur de transcription TAFII250 possède, en plus de son activité HAT, une activité d'ubiquitylation envers l'histone H1 *in vitro*, et l'abolition de cette activité chez l'embryon de *Drosophila* aboutit à une réduction de l'expression des gènes régulés par l'activateur transcriptionnel Dorsal (Pham *et al.*, 2000). TAFII250 étant recruté au niveau du promoteur, l'ubiquitylation de l'histone H1 chez les mammifères pourrait donc s'avérer être un moyen supplémentaire de réguler l'activité des gènes au niveau de promoteurs spécifiques. L'ubiquitylation des histones pourrait par exemple empêcher le ré-empaquetage des nucléosomes.

e) Poly ADP-ribosylation des histones

L'ADP-ribosylation des histones H1 et H2B peut conduire également à une décondensation locale de la chromatine. La synthèse de longues chaînes d'ADP-ribose chargées négativement pourrait faciliter l'ouverture des nucléosomes par un échange, au niveau des histones, entre le compétiteur polyanionique (chaîne d'ADP-ribose) et l'ADN, éloignant ainsi de façon transitoire les histones de l'ADN (Althaus, 1992; Althaus *et al.*, 1994). La dégradation ultérieure des polymères d'ADP-ribose par la poly(ADP-ribose)glycohydrolase permettrait aux histones de se ré-associer à l'ADN (Meijer et Smerdon, 1999).

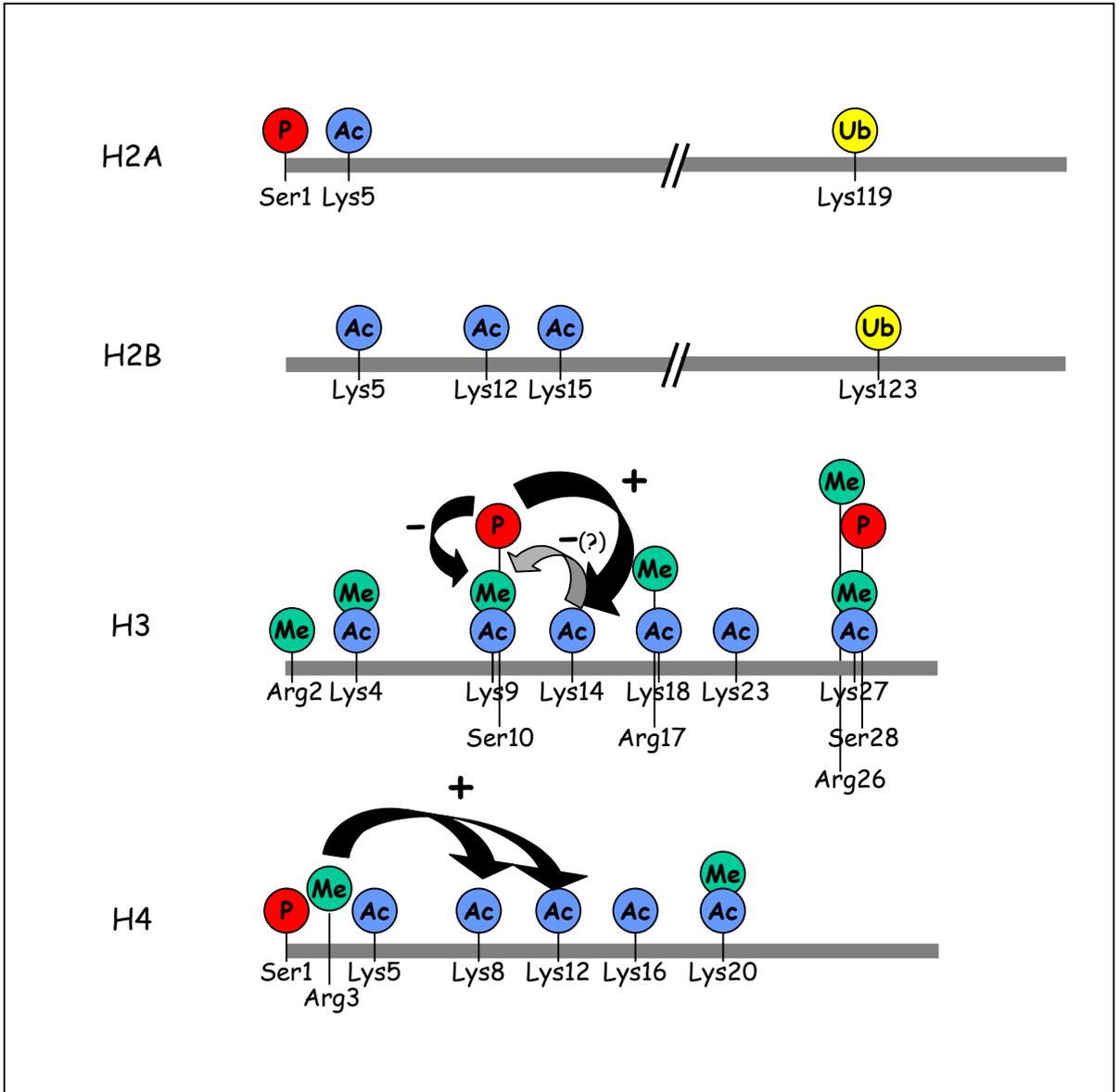


Figure 12 : **Modifications covalentes des histones.** Représentation schématique des sites possibles d'acétylation (Ac), de phosphorylation (P), de méthylation (Me) ou d'ubiquitination (Ub) des histones in vitro. Les connexions identifiées entre différentes modifications sont représentées par des flèches, qui indiquent à la fois les résidus et le type de modification concernés, et la chronologie de la coopération (la flèche en gris indique une connexion supposée mais non démontrée).

f) Le "code histone"

Il existe une interdépendance entre les différentes modifications covalentes qui ont lieu sur des résidus spécifiques et adjacents des histones. Le cas de l'histone H3 est en effet éloquent. Ses résidus potentiellement modifiés sont les Lys4, 9, 14, 18, 23 et 27, la Ser10 et les Arg2, 17 et 26 (figure 12). L'acétylation de la Lys14 (qui caractérise un état transcriptionnellement inactif) précède la méthylation de la Lys9, mais est elle-même précédée par (et dépendante de) la phosphorylation de la Ser10. Au contraire, la méthylation de la Lys9 est inhibée par la phosphorylation préalable de la Ser10 adjacente. Ceci suggère que la reconnaissance du résidu Ser10 phosphorylé par l'HAT puisse guider et stabiliser son interaction avec la queue de l'histone, menant ainsi à l'acétylation d'un résidu Lys spécifique. Un autre exemple est la méthylation de l'Arg3 de l'histone H4 qui précède et favorise l'acétylation des Lys8 et Lys12 mais qui est inhibée par l'acétylation préalable de l'histone H4.

Ces connexions définissent un code, appelé "code histone", qui tient compte à la fois de la nature de ces modifications et de leur chronologie (pour une revue : Berger, 2002). Ce code émerge comme faisant partie intégrante de la voie de régulation de la transcription qui assure le remodelage de la chromatine autour d'un promoteur spécifique en réponse à un besoin.

Il faut enfin noter que l'ensemble de ces modifications décrites ci-dessus ne sont qu'une des étapes préparant la chromatine à accueillir le complexe de pré-initiation au niveau des promoteurs. En effet, l'obtention d'un statut chromatinien compatible avec l'initiation de la transcription nécessite l'intervention de nombreuses autres protéines, comme les complexes de remodelage de la chromatine RSC (chez la levure), SWI/SNF (voir page 38) et les complexes de la famille ISWI. Par des modifications non-covalentes nécessitant l'hydrolyse d'ATP, ces complexes repositionnent les nucléosomes par translocation le long de la molécule d'ADN (Whitehouse *et al.*, 1999 et Hamiche *et al.*, 1999).

2.2- Les co-activateurs des récepteurs nucléaires

Les co-activateurs peuvent grossièrement être divisés en deux catégories : 1) les co-activateurs qui modifient ou remodelent la structure chromatinienne et 2) ceux qui servent d'adaptateurs entre les activateurs et la machinerie transcriptionnelle. Les récepteurs nucléaires recrutent trois complexes co-activateurs majeurs : le complexe HAT, le complexe

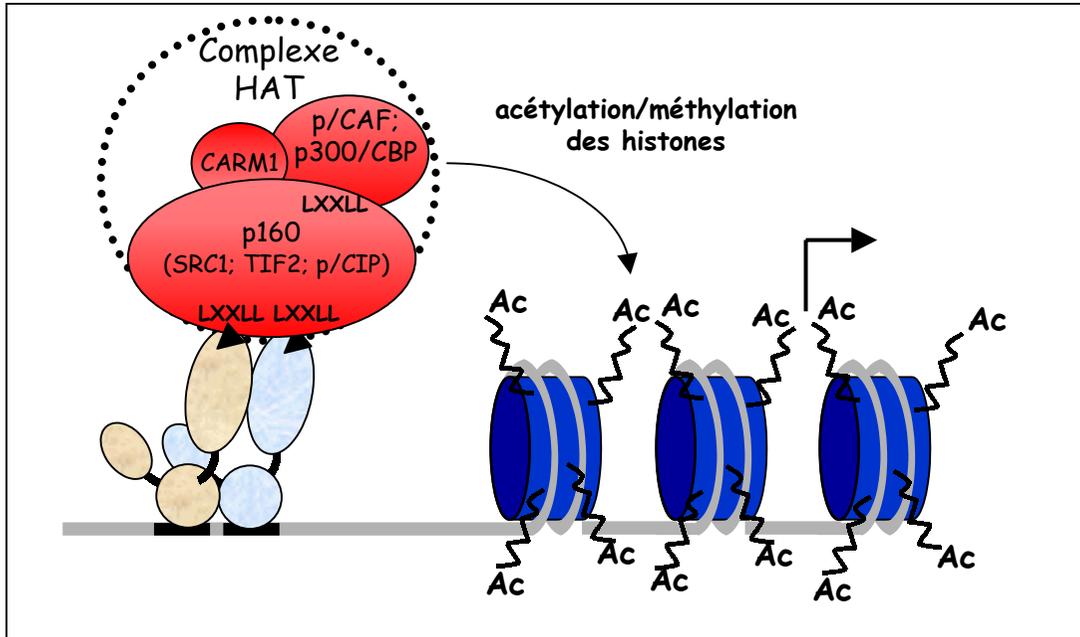


Figure 13 : **Le complexe co-activateur HAT.** Par l'intermédiaire des protéines de la famille p160 (SRC-1, TIF2 ou p/CIP), les récepteurs nucléaires recrutent des co-activateurs qui possèdent une activité histone acétyl-tranféroase (HAT : p300/CBP ou p/CAF) ou histone méthyl-tranféroase (HMT : CARM1). L'acétylation et la méthylation des histones contrôlent le degré de décompaction local de la chromatine et l'accès à l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle. LXXLL : motifs présents au sein des co-activateurs de la famille p160 et impliqués dans leur interaction avec les récepteurs nucléaires d'une part, et les co-activateurs p/CAF ou p300/CBP d'autre part.

SWI/SNF et un complexe médiateur TRAP/SMCC ou ARC/DRIP. Le complexe HAT possède des activités enzymatiques modifiant les histones, SWI/SNF est capable de déplacer les nucléosomes et les complexes médiateurs recrutent et modulent les activités de la machinerie transcriptionnelle.

2.2.1- Le complexe HAT

Les protéines de la famille p160 (SRC1, TIF2 et p/CIP) sont les principaux co-activateurs intermédiaires des récepteurs nucléaires. Leur propriété d'activation de la transcription est liée, en partie du moins, à leur capacité à recruter d'autres co-activateurs (ou intégrateurs) : d'une part les activités HAT portées par p300/CBP et p/CAF (Glass *et al.*, 1997, Kingston and Narlikar, 1999), et d'autre part l'activité HMT de CARM1 (table 3 et figure 13). Ces deux types d'activités enzymatiques pourraient entrer en jeu de manière promoteur spécifique ou coopérer pour remodeler la chromatine et faciliter l'accès au promoteur du complexe de pré-initiation.

a) La famille p160 : SRC1, TIF2 et p/CIP

SRC1. Le co-activateur SRC1 (*steroid receptors co-activator 1*) interagit par son extrémité carboxy-terminale avec PR, GR, ER, TR, RXR, et PPAR γ de manière dépendante du ligand (Onate *et al.*, 1995, Zhu *et al.*, 1996 et Wang *et al.*, 1998) et participe à l'activation de la transcription par ces récepteurs nucléaires *in vivo* (Onate *et al.*, 1995) et *in vitro* (Jenster *et al.*, 1997). Il faut noter que SRC1 est également capable de jouer le rôle de co-activateur pour d'autres activateurs transcriptionnels tels que AP1 (Lee *et al.*, 1998), NF- κ B (Na *et al.*, 1998), ou SMAD3 (Yanagisawa *et al.*, 1999) mais dans une moindre mesure que pour les récepteurs nucléaires.

TIF2/GRIP1/SRC2/NCoA-1. TIF2 (*Transcription Intermediary Factor 1*), également appelée GRIP1 (*Glucocorticoid Receptor Interacting Proteine 1*) chez la souris, SRC2 ou NCoA-1 selon les nomenclatures, a été identifiée comme une protéine de 160 kDa qui interagit *in vivo* avec ER, PR et RAR α de manière dépendante du ligand (Voegel *et al.*, 1996). TIF2 lie également les LBDs de nombreux récepteurs nucléaires *in vitro*. TIF2 est capable de stimuler la transcription chez la levure (Hong *et al.*, 1996) et dans les cellules des mammifères (Voegel *et al.*, 1998) lorsqu'il est fusionné au DBD de Gal4.

Protéine	Récepteur Nucléaire	Commentaires	Références
Les co-activateurs intermédiaires (interaction directe avec le récepteur nucléaire)			
SRC1	ER, GR, PR, TR, RXR, PPAR γ	Membre des co-activateurs de la famille p160. Se lie aux récepteurs nucléaires et à p300/CBP. Possède une activité HAT et peut lier des facteurs généraux de transcription.	Onoto <i>et al.</i> , 1995 Wang <i>et al.</i> , 1998
TIF2/GRIP1	ER, RAR α , PR, GR, AR	Membre des co-activateurs de la famille p160.	Voegel <i>et al.</i> , 1996 Hong <i>et al.</i> , 1996
p/CIP/ACTR/ AIB1/RAC3/ TRAM1	ER β , PR, TR, GR, RAR, RXR, VDR	Membre des co-activateurs de la famille p160.	Chen <i>et al.</i> , 1997 Anzick <i>et al.</i> , 1997 Li <i>et al.</i> , 1997 Takeshita <i>et al.</i> , 1997 Torchia <i>et al.</i> , 1997 Suen <i>et al.</i> , 1998
Les co-activateurs secondaires (pas d'interaction directe avec les récepteurs nucléaires)			
p300/CBP	ER, TR, RAR, RXR	Co-intégrateurs de plusieurs voies de signalisation des récepteurs nucléaires. Interagit avec p/CAF, SRC1, TIF2 et p/CIP. Possède une activité HAT et un bromodomaine.	Kamei <i>et al.</i> , 1996 Torchia <i>et al.</i> , 1996 Manning <i>et al.</i> , 2001
p/CAF	RAR/RXR	Co-intégrateurs de plusieurs voies de signalisation des récepteurs nucléaires. Interagit avec p300/CBP, SR1 et p/CIP. Possède une activité HAT et un bromodomaine.	Blanco <i>et al.</i> , 1998
CARM1	ER, AR, TR	Interagit avec les co-activateurs de la famille p160. Possède une activité HMT.	Chen <i>et al.</i> , 1999
Protéines se liant aux récepteurs et faisant partie d'un complexe médiateur (TRAP/SMCC ou DRIP)			
TRAP220/ DRIP205	TR	Sous-unité du complexe médiateur qui interagit avec TR et VDR lorsqu'ils sont liés à leur ligand.	Yuan <i>et al.</i> , 1998 Rachez <i>et al.</i> , 1998 Rachez <i>et al.</i> , 1999 Ito <i>et al.</i> , 1999
TRAP100/ DRIP100	?	Isolé en même temps que TRAP220. Pas de liaison directe avec VDR.	Rachez <i>et al.</i> , 1998 Zhang <i>et al.</i> , 1999
TRAP170/ DRIP150	GR	DRIP150 interagit et co-active l'AF-1 de GR et pourrait agir de concert avec TRAP220 (qui co-active l'AF-2 de GR).	
Protéines se liant aux récepteurs et faisant partie du complexe SWI/SNF			
hSNF2 α hSNF2 β	ER, GR, RAR	L'interaction avec ER est dépendante du ligand. Possèdent un bromodomaine.	Muchardt and Yaniv, 1993

Table 3 : Principales protéines co-activatrices des récepteurs nucléaires.

Ta ble 3 : Principales protéines co-activatrices des récepteurs nucléaires

p/CIP/ACTR/RAC3/AIB1/TRAM1/SRC3. Le troisième membre de la famille p160 a été identifié indépendamment dans plusieurs laboratoires, d'où une grande diversité de noms pour le même gène : p/CIP [*p300/CBP cointegrator-associated protein*] identifié chez la souris comme une protéine interagissant avec CBP (*CREB-binding protein*, (Torchia *et al.*, 1997)), ACTR (*activator of thyroid receptor* (Chen *et al.*, 1997)), RAC3 (*receptor associated coactivator 3* (Li *et al.*, 1997)), AIB1 (*amplified in breast cancer-1* (Anzick *et al.*, 1997)), TRAM1 (*thyroid receptor activator molecule 1* (Takeshita *et al.*, 1997)) et SRC3 (Suen *et al.*, 1998). p/CIP interagit et stimule la transcription de manière dépendante du ligand pour de nombreux récepteurs nucléaires : RAR, RXR, TR, GR (Chen *et al.*, 1997), PR (Li *et al.*, 1997) et ER β (Anzick *et al.*, 1997 et Suen *et al.*, 1998). p/CIP participe également à la régulation de la transcription par plusieurs activateurs dont la protéine CREB (*cAMP-regulated enhancer binding protein*), connue jusque-là pour recruter un autre co-activateur transcriptionnel : p300/CBP (voir plus bas).

Le mécanisme d'interaction des protéines de la famille p160 avec les récepteurs nucléaires fait intervenir un motif LXXLL (où L représente une Leucine et X n'importe quel acide aminé) présent en plusieurs exemplaires chez ces co-activateurs. Ce peptide forme une hélice α qui se lie à un sillon hydrophobe du domaine LBD (figure 14). Le peptide est maintenu dans ce sillon, d'une part grâce à des interactions entre les leucines du motif LXXLL et les constituants hydrophobes du sillon et, d'autre part, grâce à des ponts hydrogène formés avec deux résidus du LBD très conservés au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires (K362 et E542 dans le cas de ER α , (Shiau *et al.*, 1998).

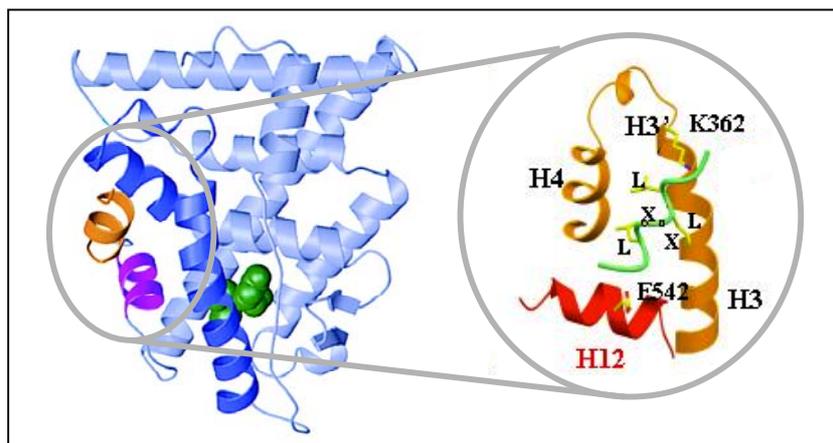


Figure 14 : Interaction entre le LBD du récepteur ER α lié à son ligand et le motif LXXLL du co-activateur TIF2. A gauche : l'hélice 12 est représentée en violet, le ligand en vert et le motif LXXLL en orange. A droite : vue rapprochée de l'interaction entre les hélices H3, H4 et H12 du récepteur ER α et le motif LXXLL de TIF2 (représenté en vert). Les deux résidus de ER α (K362 et E542) qui définissent la pince électrostatique sont représentés. Par soucis de clarté, les résidus hydrophobes du sillon qui interagissent avec le co-activateur ne sont pas mis en évidence (d'après Shiau *et al.*, 1998).

b) p300/CBP et p/CAF

Les co-activateurs p300/CBP (*CREB-binding protein*) et p/CAF (*p300/CBP-associated factor*) peuvent être recrutés au sein du complexe HAT par le biais d'interactions avec les membres de la famille p160. En effet, p300/CBP interagit avec SRC1, TIF2 et SRC3 et p/CAF interagit avec SRC1 et SRC3 (Yao *et al.*, 1996 et Kamei *et al.*, 1996; Torchia *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Voegel *et al.*, 1998). Ces interactions font de nouveau intervenir les motifs LXXLL des co-activateurs p160 et des modélisations du site d'interaction mettent en évidence une poche de liaison hydrophobe, comme dans le cas de leur interaction avec les récepteurs nucléaires.

p300/CBP et p/CAF sont deux puissantes HAT capables d'acétyler les histones (H2A, H2B, H3 et H4 pour p300/CBP, ou H3 et H4 pour p/CAF) (Bannister *et al.*, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1997). Si ces deux activités HAT peuvent sembler redondantes au premier abord, il semble qu'elles aient des fonctions bien spécifiques dans l'activation de la transcription par différents récepteurs nucléaires. A titre d'exemple, seule l'activité HAT de p/CAF est nécessaire à la transactivation par RAR alors que seule p300/CBP est indispensable à la fonction régulatrice de CREB sur la transcription (Korzus *et al.*, 1998). Ces divergences pourraient trouver leur explication dans le fait que p300/CBP et p/CAF sont capables d'acétyler différemment d'autres protéines, non-histones, impliquées dans la régulation de la transcription comme TFIIE, TFIIIF ou p53 (Imhof *et al.*, 1997; Gu W, Cell, 1997). Par ailleurs, SRC3 peut également servir de substrat à l'activité HAT de p300/CBP. Cette acétylation neutralise les charges positives adjacentes au motif LXXLL et déstabilise l'interaction entre le complexe co-activateur HAT et le récepteur nucléaire, aboutissant au relargage de ce complexe et à l'atténuation de l'activité des récepteurs nucléaires (Chen *et al.*, 1999). Par ailleurs, le rôle des récepteurs nucléaires ne se semble pas se résumer à un simple recrutement des HAT puisqu'il a été démontré que HNF-1 α (*hepatocyte nuclear factor 1 α*) pouvait stimuler l'activité de p300/CBP (Soutoglou, EMBO, 2001).

c) CARM1

Cette méthyl-transférase est également recrutée par les membres de la famille des co-activateurs p160 (Chen *et al.*, 1999). *In vitro*, CARM1 présente une activité méthyl-transférase en présence de l'histone H3. *In vivo*, CARM1 renforce l'activation par les récepteurs ER, AR et TR et cette fonction nécessite son activité enzymatique.

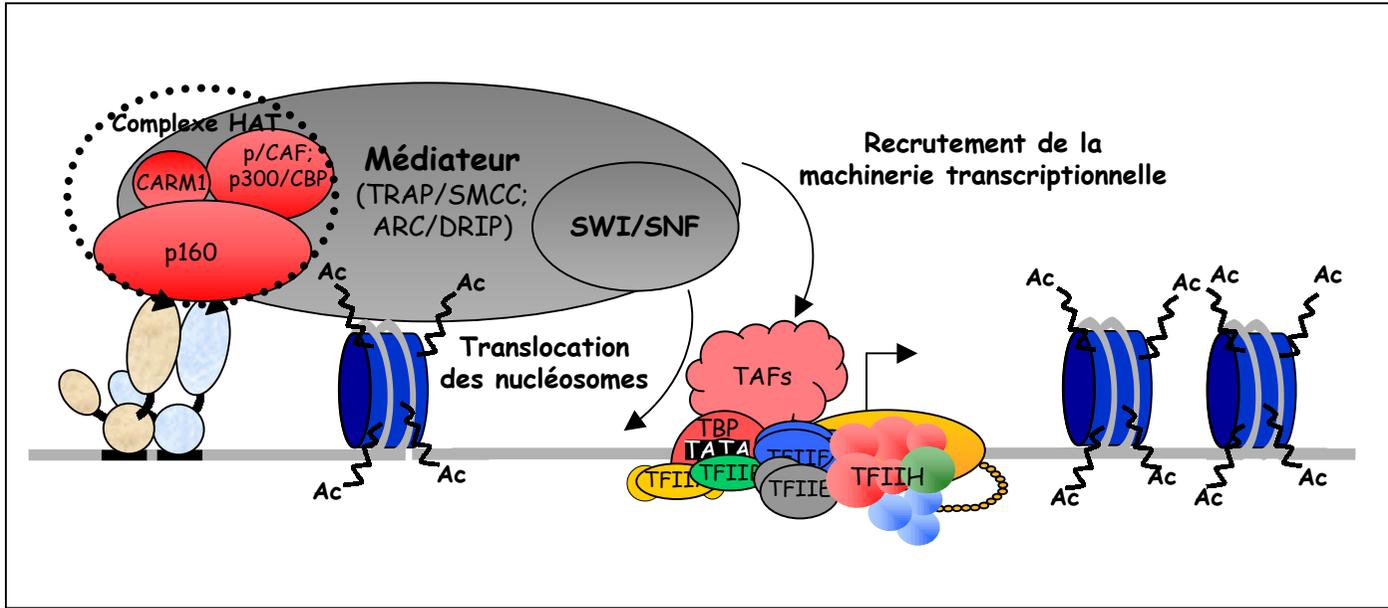


Figure 15 : **Autres co-activateurs des récepteurs nucléaires.** Outre le complexe HAT, les complexes SWI/SNF et médiateur (TRAP/SMCC ou ARC/DRIP) sont également nécessaires à l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires. Le complexe SWI/SNF participe au remodelage de la chromatine en faisant glisser les nucléosomes le long de l'ADN, et le complexe médiateur sert d'adaptateur entre les récepteurs nucléaires, liés à l'ADN, et la machinerie transcriptionnelle.

2.2.2- Le complexe SWI/SNF

Le complexe SWI/SNF (*switching mating type/sucrose non fermenting*) interagit physiquement avec plusieurs récepteurs nucléaires (Muchardt *et al.*, 1993; Yoshinaga *et al.*, 1992 et Wallberg *et al.*, 2000). Il est composé d'une douzaine de polypeptides (masse moléculaire : environ 2 Mda) et pourrait faire partie de l'holoenzyme (Wilson *et al.*, 1996). Il participe au remodelage de la chromatine, nécessaire à l'initiation de la transcription, par des modifications non covalentes (figure 15). Le complexe SWI/SNF est en effet capable de repositionner les nucléosomes en cis, en les faisant glisser le long de l'ADN (Whitehouse *et al.*, 1999). Ce complexe contient un facteur faisant partie de la famille des protéines liant les ribonucléosides triphosphate (NTP), suggérant l'utilisation de l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour la dissociation des interactions ADN-histones (Pazin *et al.*, 1997; Pazin et Kadonaga, 1997).

Une question se pose quant à la chronologie de l'arrivée des différents co-activateurs qui modifient ou remodelent la chromatine. En effet, on ne sait pas si l'acétylation des histones prépare l'ADN à l'action du complexe SWI/SNF ou si, au contraire, la translocation des chromosomes rend les queues des histones accessibles aux HAT. La reconstitution de l'activation de la transcription *in vitro* a permis de montrer que la fonction des HAT précède celle du complexe SWI/SNF, suggérant que l'acétylation des histones favorise l'entrée du complexe SWI/SNF dans la machinerie d'activation de la transcription (Dilworth *et al.*, 2000, Hassan *et al.*, 2001 et Aoyagi *et al.*, 2002). Cette hypothèse est en accord avec le fait que le complexe SWI/SNF contienne un bromodomaine qui lui permettrait d'être spécifiquement recruté sur des régions chromatiniennes dont les histones ont préalablement été acétylés. Il existe cependant plusieurs exemples, où l'arrivée de SWI/SNF précède celle du complexe co-activateur HAT, et qui vont donc à l'encontre de ce modèle (Zhang *al.*, 2001 et Gavin *et al.*, 2001). Il semble donc que les deux cas soient possibles, en fonction du contexte cellulaire et/ou moléculaire étudié.

2.2.3- Les complexes médiateurs TRAP/SMCC et ARC/DRIP

Dans une cellule, la majorité des ARN Pol II transcriptionnellement actives se trouve au sein de l'holoenzyme, associée (entre autres) à un complexe "médiateur" (Rachez et Freedman, 2001). Les médiateurs sont des gros complexes multi-protéique (de l'ordre du mégadalton) qui servent d'adaptateur entre les activateurs transcriptionnels et la machinerie transcriptionnelle

(pour une revue : Rachez et Freedman, 2001). Chez l'Humain, les complexes médiateurs sont TRAP (*Thyroid hormone Receptor-Associated Proteins* (Fondell *et al.*, 1996)), NAT (*Negative Regulator of Activated Transcription* (Sun *et al.*, 1998)), ARC (*Activator-Recruited Co-factor* (Naar *et al.*, 1998)), DRIP (*vitaminD-Receptor Interacting Proteins* (Rachez *et al.*, 1999)), SMCC (*SRB/mediator containing complex* (Gu *et al.*, 1999)), CRSP (*cofactor required for Sp1* (Ryu *et al.*, 1999)) et PC2 (*positive component 2* (Malik *et al.*, 2000)). Ils diffèrent entre eux par leur nombre de composants (de 7 pour CRSP à plus de 18 pour SMCC) et leur composition. L'identification et le clonage des différentes sous-unités de ces complexes a révélé qu'ils partagent un grand nombre de constituants et que, au contraire, d'autres semblent spécifiques à chaque complexe. Il a ainsi été mis en évidence que les complexes ARC et DRIP ont non seulement la même composition mais également la même fonction dans la régulation de la transcription, suggérant qu'il s'agit d'un seul et même complexe (Fondell *et al.*, 1996 et Naar *et al.*, 1999). Il en est vraisemblablement de même pour les complexes TRAP et SMCC (Ito *et al.*, 1999) et CRSP et PC2 (Malik *et al.*, 2000). Ces analyses ont également mis en évidence que les 7 sous-unités de CRSP sont présentes au sein du complexe ARC/DRIP, suggérant que CRSP pourrait être un sous-complexe de ARC/DRIP. Si les différences de composition de ces complexes ont à l'origine été attribuées à des protocoles de purification différents, il paraît maintenant vraisemblable qu'elles traduisent le fait qu'il existe dans le noyau plusieurs complexes médiateurs différents, probablement impliqués dans la régulation de la transcription par des activateurs qui leur sont spécifiques. Le rôle des complexes médiateurs dans l'activation de la transcription ne se résume d'ailleurs pas à un simple recrutement de la machinerie transcriptionnelle; ils contiennent des sous-unités ayant des fonctions activatrices ou inhibitrices sur l'activité de l'ARN Pol II, par exemple la kinase cdk8 (voir page 56), et leur interaction avec la machinerie transcriptionnelle stimule la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II par la kinase de TFIIF.

Les complexes médiateurs qui servent de co-activateurs pour les récepteurs nucléaires sont TRAP/SMCC et ARC/DRIP (Fondell *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 1999 et Rachez 1999). Du fait de leur capacité à interagir à la fois avec les récepteurs nucléaires (uniquement en présence de leur ligand) et l'ARN Pol II, ils serviraient d'interface entre les activateurs, liés à l'ADN au niveau des éléments de réponse, et la machinerie de transcription (Rachez et Freedman, 2001) (figure 15). La double possibilité d'interaction entre les récepteurs nucléaires et d'une part les co-activateurs de la famille p160, et d'autre part le complexe TRAP/SMCC, pose cependant un dilemme quant à la chronologie des événements qui mènent à l'activation des gènes cibles. Les déterminants structuraux de l'interaction des récepteurs nucléaires avec ces

deux classes de co-activateurs sont en effet identiques (Rachez *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2000). Il n'est donc pas surprenant que les protéines p160 et TRAP220 soient en compétition pour l'interaction avec les récepteurs nucléaires *in vitro* (Treuter *et al.*, 1999). Ces résultats argumentent en faveur d'un recrutement séquentiel des deux complexes : dans le cas de récepteurs dimériques, chaque monomère contacterait simultanément l'un des deux complexes. Cette hypothèse est étayée par les résultats obtenus avec l'hétérodimère PPAR γ -RXR lié à l'ADN, où les ligands spécifiques de PPAR γ ou de RXR induisent des interactions sélectives avec le complexe TRAP/SMCC et les protéines p160, respectivement (Yang *et al.*, 2000). On peut également imaginer que deux dimères de récepteurs nucléaires, liés simultanément à deux éléments de réponse distincts au sein d'un même promoteur, pourraient recruter séparément mais de manière concomitante les deux types de complexes (Glass *et al.*, 2000).

Il faut enfin noter que certains récepteurs nucléaires semblent interagir directement avec des facteurs généraux de transcription. En effet, la TBP interagit avec des récepteurs RXR (Schulman *et al.*, 1995) et ER (Sadovsky *et al.*, 1995). Il en est de même pour TAFII110 qui interagit avec PR (Schwerk *et al.*, 1995), TFIIF qui interagit avec AR (McEwan *et al.*, 1997), TFIIB qui interagit avec VDR (Blanco *et al.*, 1995), et TFIID qui interagit avec RAR (Rochette-Egly *et al.*, 1997 et Bastien *et al.*, 2000), ER α (Chen *et al.*, 2000) et AR (Lee *et al.*, 2000).

En résumé, la fonction activatrice des récepteurs nucléaires implique le recrutement, d'une part, de co-activateurs qui créent un environnement transcriptionnellement permissif au niveau du promoteur pour la machinerie transcriptionnelle qui est recrutée, d'autre part, par le biais d'un complexe médiateur et vraisemblablement stabilisée par les interactions directes entre les récepteurs nucléaires et les membres de cette machinerie (figure 15).

2.3- Répression de la transcription

La répression transcriptionnelle, ou "*silencing*", renvoie à la capacité de certains récepteurs nucléaires à inhiber l'activité de base du promoteur sur lequel ils sont fixés en absence de ligand (Johnson, 1995). Deux types de mécanismes sont envisagés pour parvenir à ce résultat. La répression passive implique une compétition par gêne stérique pour l'interaction avec un récepteur nucléaire entre un répresseur et soit l'ADN soit son partenaire de dimérisation. Dans le cas d'une répression active, en absence de ligand, le récepteur recrute des facteurs (co-répresseurs) qui créent un environnement incompatible avec l'initiation de la transcription.

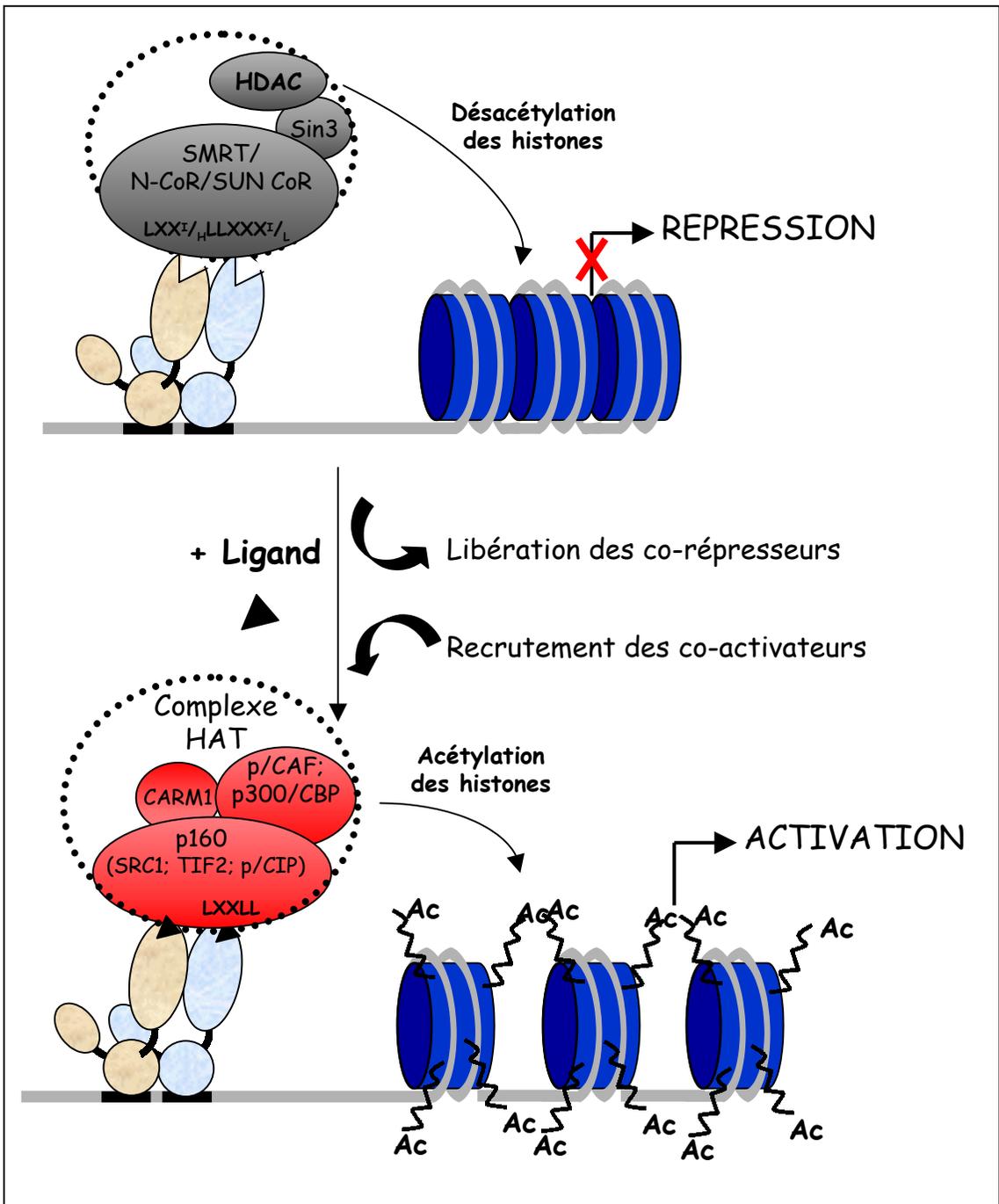


Figure 16 : **Modèle de contrôle de l'expression des gènes par les récepteurs nucléaires.** En absence de ligand, les récepteurs dimérisés sur un élément de réponse (RE) s'associent à des co-répresseurs (SMRT, NCoR ou SUN-CoR) qui recrutent, par l'intermédiaire du complexe Sin3, des protéines dotées d'une activité histone-désacétylase (HDAC). La désacétylation des queues d'histones est l'une des étapes qui aboutit à la répression transcriptionnelle. La fixation du ligand déstabilise le complexe répresseur et favorise l'association avec les co-activateurs (complexe HAT) qui, par leur action sur les histones, permettent la décompaction de la chromatine et l'initiation de la transcription (d'après Robyr et al, 2000).

Certains hétérodimères de récepteurs nucléaires, comme RAR/RXR et TR/RXR, sont ainsi capables de réprimer la transcription en absence de ligand grâce à un domaine de répression présent dans leur région F (Shen *et al.*, 1993). Il existe d'ailleurs un homologue viral de TR (v-erbA) qui est incapable de lier de ligand et se comporte comme un répresseur constitutif de la transcription des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes (pour une revue : Rietveld *et al.*, 2001).

En absence de ligand, certains récepteurs nucléaires recrutent les co-répresseurs SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor* (Chen *et al.*, 1995)), N-CoR (*nuclear receptor corepressor* (Kurokawa *et al.*, 1994)) et SUN-CoR (*small ubiquitous nuclear co-repressor* (Zamir *et al.*, 1997)). Ces co-répresseurs recrutent à leur tour des protéines associées à Sin3 et ayant une activité histone désacétylase (HDAC) (Alland *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1997), suggérant qu'au moins une partie de l'effet répressif implique la compaction de la chromatine du fait de la désacétylation des histones (figure 16).

Les co-répresseurs interagissent avec le domaine LDB des récepteurs nucléaires par un mécanisme similaire à celui des co-activateurs. Il faut en effet intervenir un motif LXX^I/HLLXXX^I/L qui interagit également avec le sillon hydrophobe du LBD des récepteurs nucléaires (Perissi *et al.*, 1999). Ce motif, présent en deux exemplaires dans la partie carboxy-terminale des co-répresseurs, forme une hélice plus longue que le motif LXXLL des co-activateurs. Il semble donc que le mouvement de l'hélice 12 du LDB, qui a lieu lors de la liaison du ligand, diminue la taille du sillon hydrophobe et n'autorise ainsi une interaction qu'avec la plus petite hélice, c'est-à-dire celle des co-activateurs. La liaison du ligand au récepteur nucléaire permet donc le relargage des co-répresseurs, la liaison des co-activateurs et, par conséquent, l'activation de la transcription.

3- REGULATION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES

3.1- Phosphorylation des récepteurs nucléaires

La majorité des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires sont des phosphoprotéines (Rochette-Egly *et al.*, 1991; Gaub *et al.*, 1992; Ali *et al.*, 1993; Weigel, 1996). En effet, les récepteurs nucléaires peuvent être phosphorylés sur différents résidus par plusieurs kinases, dont la MAP-kinase (Kato *et al.*, 1995), la protéine kinase A (Rochette-Egly *et*

al., 1995; Chen *et al.*, 1999), la protéine kinase C (Delmotte *et al.*, 1999) ou la kinase dépendante des cyclines cdk7, une sous-unité du facteur général de transcription TFIIH (voir ci-dessous).

La phosphorylation des récepteurs nucléaires constitue très probablement un niveau supplémentaire de contrôle de l'activité transcriptionnelle. En effet, l'activation de la transcription par le récepteur ER peut être stimulée par EGF (*epidermal growth factor*) (Bunone *et al.*, 1996) qui, par l'intermédiaire de son récepteur membranaire, active la cascade Ras-Raf-MAP kinase ce qui aboutit à la phosphorylation de ER au niveau de sa Ser118 (Kato *et al.*, 1995). Par ailleurs, la phosphorylation des domaines AF-1 et AF-2 de RAR α est impliquée dans le processus de différenciation des cellules F9 induit par l'acide rétinoïque (Taneja *et al.*, 1997). Par ailleurs, la phosphorylation du résidu Ser77 (situé dans le domaine d'activation dépendant du ligand AF-1) par cdk7 stimule l'activité transactivatrice de RAR α en présence de son ligand (Rochette-Egly *et al.*, 1997). Il en est de même pour les résidus Ser65 et Ser68 de RAR γ (Bastien *et al.*, 2000) et pour la Ser118 de ER α (Chen *et al.*, 2000).

Le(s) mécanisme(s) précis par lequel la phosphorylation régule l'activité des récepteurs nucléaires et l'importance physiologique de cette phosphorylation ne sont pas encore clairs. Certains sites sont constitutivement phosphorylés alors que la phosphorylation d'autres sites est induite par la présence du ligand. On peut imaginer que certaines phosphorylations régulent la liaison du récepteur à son élément de réponse. En effet, la phosphorylation de la Ser389 de RAR α influence la capacité des complexes RAR/RXR à fixer l'ADN (Rochette-Egly *et al.*, 1995). A l'opposé, il est improbable que la phosphorylation de la région A/B par cdk7 influence la liaison du ligand ou la dimérisation des récepteurs car aucune de ces étapes ne requière la présence de cette région (Bourguet *et al.*, 2000). On peut également imaginer que les phosphorylations régulent le recrutement des co-activateurs et/ou le relargage des co-répresseurs et participent ainsi au remodelage de la chromatine (Dilworth *et al.*, 2000). En effet, l'état de phosphorylation de ER α (Hammer *et al.*, 1999) et de SF-1 (Tremblay *et al.*, 1999) influence leur interaction avec leurs co-activateurs SRC1 ou GRIP1, respectivement. Il a enfin été montré que la phosphorylation des récepteurs RAR, ER et PPAR joue un rôle déterminant dans leur dégradation par la voie dépendante de l'ubiquitine (Kopf *et al.*, 2000; Nawaz *et al.*, 1999 et Floyd *et al.*, 2002) (voir ci-dessous). La phosphorylation des récepteurs nucléaires permettrait donc de réguler l'amplitude ainsi que la durée des effets provenant de l'activation des récepteurs par leur ligand.

3.2- Dégradation des récepteurs nucléaires

Chez les eucaryotes, la principale voie de dégradation des protéines est la protéolyse ciblée par une petite protéine de 8kDa, l'ubiquitine (Ub). Les substrats de cette dégradation sont marqués par la fixation covalente d'Ub sur des résidus Lys (le plus souvent sous forme de chaînes poly-Ub) par une famille d'enzymes appelées Ubc (ubiquitin conjugating enzymes). Cette fixation constitue un signal qui permet sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome 26S. Cette voie de dégradation régule l'activité de protéines qui contrôlent le cycle cellulaire, la transduction de signaux extra-cellulaires ou la transcription.

L'observation initiale qui mena à la découverte que les récepteurs nucléaires peuvent être dégradés en présence de leur ligand fut le fait que, dans des cellules traitées aux glucocorticoïdes, le GR est dégradé par une voie protéolytique pressentie pour être la voie dépendante de l'Ub (Vedeckis *et al.*, 1983). Ce n'est que 10 ans plus tard qu'il fut effectivement démontré que le récepteur ER est ubiquitinylé, à la fois *in vitro* et *in vivo*, en présence d'œstradiol (Nirmala *et al.*, 1995) et que le GR interagit avec une enzyme Ubc (Gottlicher *et al.*, 1996). Les récepteurs PR (Syvala *et al.*, 1998), RAR (Kopf *et al.*, 2000 et Boudjelal *et al.*, 2000), RXR (Osburn *et al.*, 2001) et AR (Sheflin *et al.*, 2000) rejoignirent ensuite la liste des récepteurs nucléaires ubiquitinylés et dégradés en présence de leur ligand respectif. Ce n'est qu'en 1999 qu'il fut effectivement prouvé que le récepteur ER était directement dégradé par le protéasome (Nawaz *et al.*, 1999).

Le lien entre la dégradation dépendante de l'Ub des récepteurs nucléaires et leur fonction de régulateur transcriptionnel fut ensuite établi dans le cas des récepteurs ER (Lonard *et al.*, 2000), TR (Dace *et al.*, 2000) et GR (Wallace *et al.*, 2001). Si la dégradation des récepteurs ER et TR est nécessaire à leur activité d'activateur transcriptionnels, dans le cas de GR, elle semble au contraire inhiber cette activation. Un nouveau niveau de régulation vient s'ajouter en 2000, lorsqu'il fut démontré que la dégradation dépendante du ligand de RAR, RXR et ER dépend également de l'état de phosphorylation de leur domaine AF-1 (Nawaz *et al.*, 1999 et Kopf *et al.*, 2000). Enfin, au début de l'année 2002, Floyd et ses collaborateurs ont démontré que la présence du ligand des récepteurs PPAR stimule l'activation de gènes cibles et induit la dégradation dépendante de l'Ub d'au moins deux de ses isoformes par le protéasome, et que cette dégradation dépend de l'état de phosphorylation du récepteur (Floyd *et al.*, 2002).

Il est paradoxal que la dégradation d'un activateur transcriptionnel soit nécessaire à l'activation de la transcription de gènes cibles. Il existe pourtant des modèles qui se proposent d'expliquer ce paradoxe. La protéolyse des récepteurs nucléaires, liés à leur élément de réponse, serait un moyen de dissocier l'holoenzyme du promoteur et permettre l'élongation de la

transcription (Thomas et Tyers, 2000). On peut également imaginer que cette dégradation permette le recyclage des co-activateurs (qui sont en quantité limitante dans une cellule) et de la machinerie transcriptionnelle vers d'autres gènes cibles (Dennis *et al.*, 2001).

CHAPITRE IV : REGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR DES PROTEINE-KINASES DEPENDANTES DES CYCLINES

1- LES PROTEINE-KINASES DEPENDANTES DES CYCLINES (CDK)

Les protéine-kinases dépendantes des cyclines (cdk, pour *cyclin dependent kinases*) font partie de la famille des enzymes qui catalysent le transfert du groupement phosphate γ de l'ATP sur le groupe hydroxyl d'un résidu sérine ou thréonine du substrat protéique (sérine/thréonine kinases). Dans les cellules humaines, les cdk sont nommées cdk1 à cdk9 et s'associent à une ou des cycline(s) spécifique(s) (table 4). Chacun des couples ainsi formé possède une fonction spécifique dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire à travers ses principales transitions et de l'entrée en mitose (cdk1, cdk2, cdk3, cdk4 et cdk6), dans la différenciation neuronale (cdk5) ou dans la régulation de l'expression des gènes (cdk7, cdk8 et cdk9). On ne connaît pas la cycline associée à cdk3 (van den Heuvel et Harlow, 1993) et, à l'opposé, on ne connaît pas de partenaires aux cyclines F, G et I (Grana et Reddy, 1995).

cdk	Cycline(s) associée(s)	Fonction
cdk1	cyclines A et B	Contrôle du cycle cellulaire (transition G2/M)
<i>cdc2 (S. pombe)</i>	<i>puc1, cdc13, cig1, cig2</i>	Contrôle du cycle cellulaire (multiples transitions)
<i>cdc28 (S. cerevisiae)</i>	CLN1-3, CLB1-6	Contrôle du cycle cellulaire (multiples transitions)
cdk2	cyclines A, E et D	Contrôle du cycle cellulaire (transition G1/S et phase S)
cdk3	?	Contrôle du cycle cellulaire (transition G1/S)
cdk4	cycline D	Contrôle du cycle cellulaire (transition G1/S)
cdk5	cycline D, p35/p25	Contrôle de la différenciation neuronale
cdk6	cycline D	Contrôle du cycle cellulaire (transition G1/S)
cdk7	cycline H	Activité activatrice des cdk (CAK) et régulation de la transcription (kinase associée à TFIIH).
<i>Mcs6/Mop1/Crk1 (S. pombe)</i>	<i>Mcs2</i>	Activité activatrice des cdk (CAK) et régulation de la transcription.
<i>Kin28 (S. cerevisiae)</i>	<i>Ccl1</i>	Régulation de la transcription (kinase associée à TFIIH).
cdk8	cycline C	Régulation de la transcription (sous-unité du complexe médiateur).

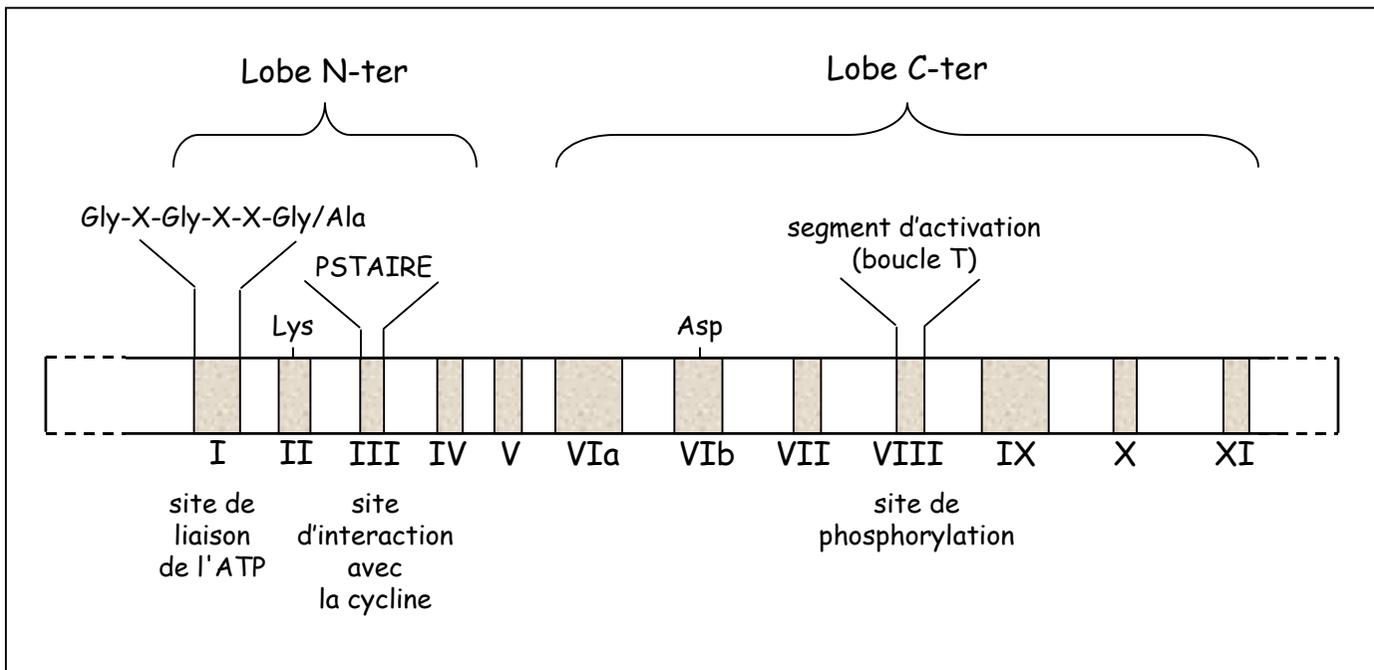


Figure 17 : Organisation schématique du domaine catalytique des cdk.

cdk	Cycline(s) associée(s)	Fonction
Srb10 (<i>S. cerevisiae</i>)	Srb11	Régulation de la transcription (sous-unité du complexe médiateur).
cdk9	cycline T	Régulation de la transcription (sous-unité du facteur d'élongation P-TEFb).

Table 4 : **Fonctions et cycline(s) associée(s) des différentes cdk.** Les cdk humaines sont indiquées en gras. La kinase cdk7 est capable de phosphoryler et d'activer d'autres complexes cdk-cycline (activité CAK, pour *cdk-activating kinase*).

1.1- Structure des cdk

Les cdk sont des petites protéines ubiquitaires de 35 à 40 kDa. L'alignement multiple de leurs séquences primaires (qui présentent plus de 40 % d'identité entre elles) indique qu'elles possèdent une organisation commune (Shuttelworth, 1995). Leur domaine catalytique comprend environ 250-300 résidus et se compose de douze motifs conservés, séparés par des régions de taille et de séquence variables (figure 17). Le motif I présente la séquence consensus Gly-X-Gly-X-X-Gly/Ala (où X représente un résidu peu conservé) impliquée dans la fixation de l'ATP. Le motif II présente une Lys invariante, essentielle à l'activité de l'enzyme, qui permet à l'ATP d'être maintenu et correctement orienté. Le motif III contient une séquence particulière (PSTAIRE, en code à une lettre) qui intervient dans l'interaction avec les cyclines. Le motif VIb présente un résidu Asp invariant impliqué dans la catalyse. Les autres résidus conservés et impliqués dans la réaction enzymatique se répartissent principalement entre les motifs VIb à IX (table 5). Enfin, le motif VIII contient un résidu (généralement une thréonine) pouvant être phosphorylé situé dans une boucle d'une dizaine de résidus appelée "segment d'activation" (ou "boucle T").

Domaine	Position	Fonction
I	Gly11	fixe le phosphate β
I	Gly13	fixe le phosphate β
I	Gly16	fixe le phosphate β
	Val18	aligne la poche de fixation de l'adénine
II	Lys33	forme une paire d'ions avec les phosphates α et β
III	Glu51	forme une paire d'ions avec la Lys72
VIb	Asp127	résidu catalytique
VIb	Lys129	interagit avec le phosphate γ
	Asn132	chélate le Mg^{2+} inhibiteur

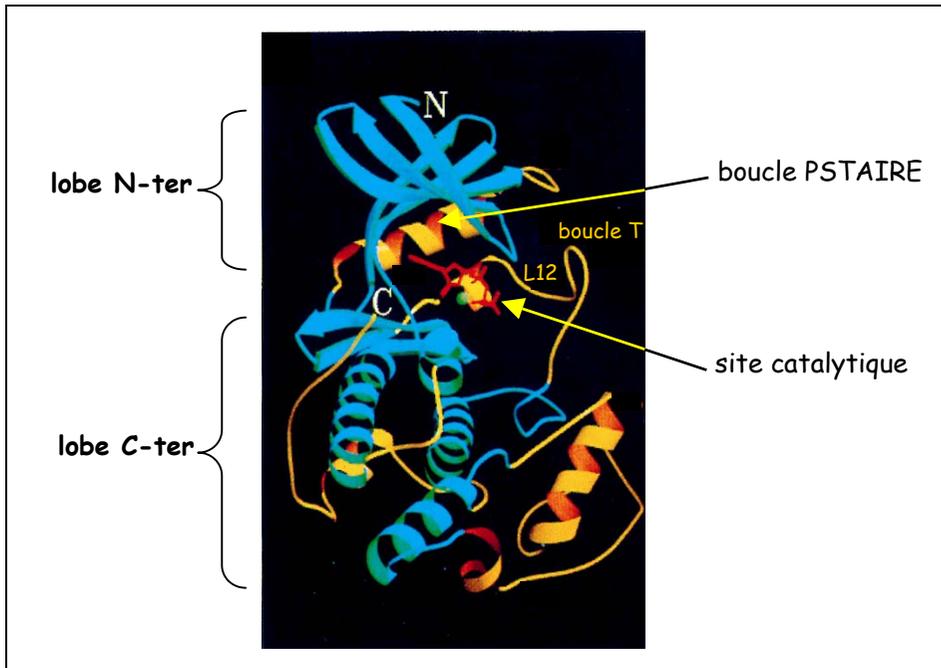


Figure 18 : **Structure tri-dimensionnelle du domaine catalytique de cdk2.** La kinase adopte un repliement caractéristique des cdk avec un lobe amino-terminal riche en feuillets β , un lobe carboxy-terminal riche en hélices α et le site catalytique situé entre ces deux lobes. Les positions de l'hélice PSTAIRE, de la petite hélice L12 ainsi que de la boucle T sont indiquées. L'ATP est représenté en rouge et l'ion Mg^{2+} en vert (d'après De Bondt et al., 1993).

VII	Asp145	chélate le Mg^{2+} activateur
VIII	Thr160	résidu phosphorylé du segment d'activation
VIII	Glu172	forme une paire d'ions avec l' Arg280
IX	Asp185	stabilise la boucle catalytique
XI	Arg274	forme une paire d'ions avec Glu208

Table 5 : Rôle des résidus conservés dans le domaine catalytique des cdk. La position des résidus indiqués dans cette table est celle des résidus de la kinase cdk2.

La résolution de la structure cristallographique de plusieurs cdk a permis de visualiser l'organisation du cœur catalytique (De Bondt *et al.*, 1993 et Taylor et Radzio-Andzelm, 1994). Les douze motifs conservés se replient pour former une structure constituée de deux lobes (figure 18). Les motifs I à IV constituent le lobe amino-terminal et les motifs VIa à XI constituent le lobe carboxy-terminal. Le lobe amino-terminal est principalement impliqué dans l'ancrage et l'orientation du nucléotide et dans la fixation de la cycline (via l'hélice α correspondant à la séquence PSTAIRE). A l'exception de l'hélice PSTAIRE, il ne contient que des feuilletts β anti-parallèles. Le lobe carboxy-terminal est quant à lui majoritairement composé d'hélices α et est impliqué dans la liaison du substrat et le transfert du groupement phosphate. Le sillon situé entre les deux lobes, constitué par le motif V, est le site catalytique.

1.2- Régulation de l'activité des complexes cdk-cycline

Sous forme monomérique, une cdk est totalement inactive. Cet état est dû à plusieurs paramètres structuraux : 1) plusieurs résidus impliqués la fixation de l'ATP ne sont pas correctement positionnés parce qu'une petite hélice (L12), proche du site actif, gêne le positionnement de l'hélice PSTAIRE; la fixation de l'ATP est cependant possible mais ses phosphates sont orientés de telle façon que le transfert de phosphate ne peut pas avoir lieu; 2) la boucle T bloque l'accès au site de liaison du substrat (De Bondt *et al.*, 1993).

L'activation des cdk nécessite l'association d'une sous-unité régulatrice, faisant partie de la famille des cyclines, et la phosphorylation d'un résidu sérine situé dans la boucle T. L'activité des cdk peut également être régulée négativement par d'autres phosphorylations ou la fixation de protéines inhibitrices (CKI, pour *cdk-inhibitor*) (pour des revues : Morgan *et al.*, 1998; Solomon et Kaldis, 1998 et Pavletich *et al.*, 1999). En plus de ces mécanismes de régulation, le contrôle de la progression du cycle cellulaire dépend de la localisation cellulaire des complexes

cdk-cycline et de leurs régulateurs (Moore *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 1999; pour une revue, Yang et Kornbluth, 1999).

1.2.1 - Activation par la liaison des cyclines

Les cyclines tiennent leur nom du fait que le niveau de ces protéines dans les cellules est cyclique. En effet, les gènes codant pour certaines cyclines sont transcrits à des moments particuliers du cycle cellulaire, permettant à celles-ci de s'accumuler pour interagir et activer les cdk qui contrôlent ce cycle. Ces cyclines possèdent des séquences particulières (*destruction box* et séquences PEST, en code à une lettre) qui les ciblent vers la voie de dégradation dépendante de l'ubiquitine (Glutzer *et al.*, 1991; Murray, 1995). L'expression et la dégradation séquentielles de ces cyclines permettent donc aux cellules de progresser à travers les différentes phases du cycle cellulaire d'une façon ordonnée. Il existe cependant des cyclines dont l'expression est constante au cours du cycle, par exemple les cyclines C et H.

La liaison d'une cycline à une cdk monomérique stimule son activité kinase de l'ordre de 400000 fois *in vitro* (Connell-Crowley *et al.*, 1993). La cristallisation du complexe cdk2-cyclineA a mis en évidence des modifications structurales importantes entraînées par la fixation de la cycline : l'hélice PSTAIRE et la boucle T se déplacent, libérant ainsi l'entrée du site catalytique (figure 19) (Jeffrey *et al.*, 1995). Ces changements structuraux permettent de positionner favorablement les résidus impliqués dans la fixation de l'ATP (Asp145, Glu51, Lys33 dans le cas de cdk2). Il faut noter que, dans le cas d'autres protéine-kinases (non dépendantes des cyclines), ces trois résidus sont correctement positionnés sans la nécessité d'interaction avec une sous-unité régulatrice (Cox *et al.*, 1994).

La réorganisation du site catalytique induite par l'interaction avec la cycline ne permet cependant qu'une activation partielle de la cdk (figure 20) (Desai *et al.*, 1992; Connell-Crowley *et al.*, 1993). Le mouvement de la boucle T, induit par l'interaction de la cycline, expose un résidu thréonine dont phosphorylation conduira à l'activation complète de la cdk (Gould *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 1992; Solomon *et al.*, 1992).

1.2.2- Régulation par phosphorylation

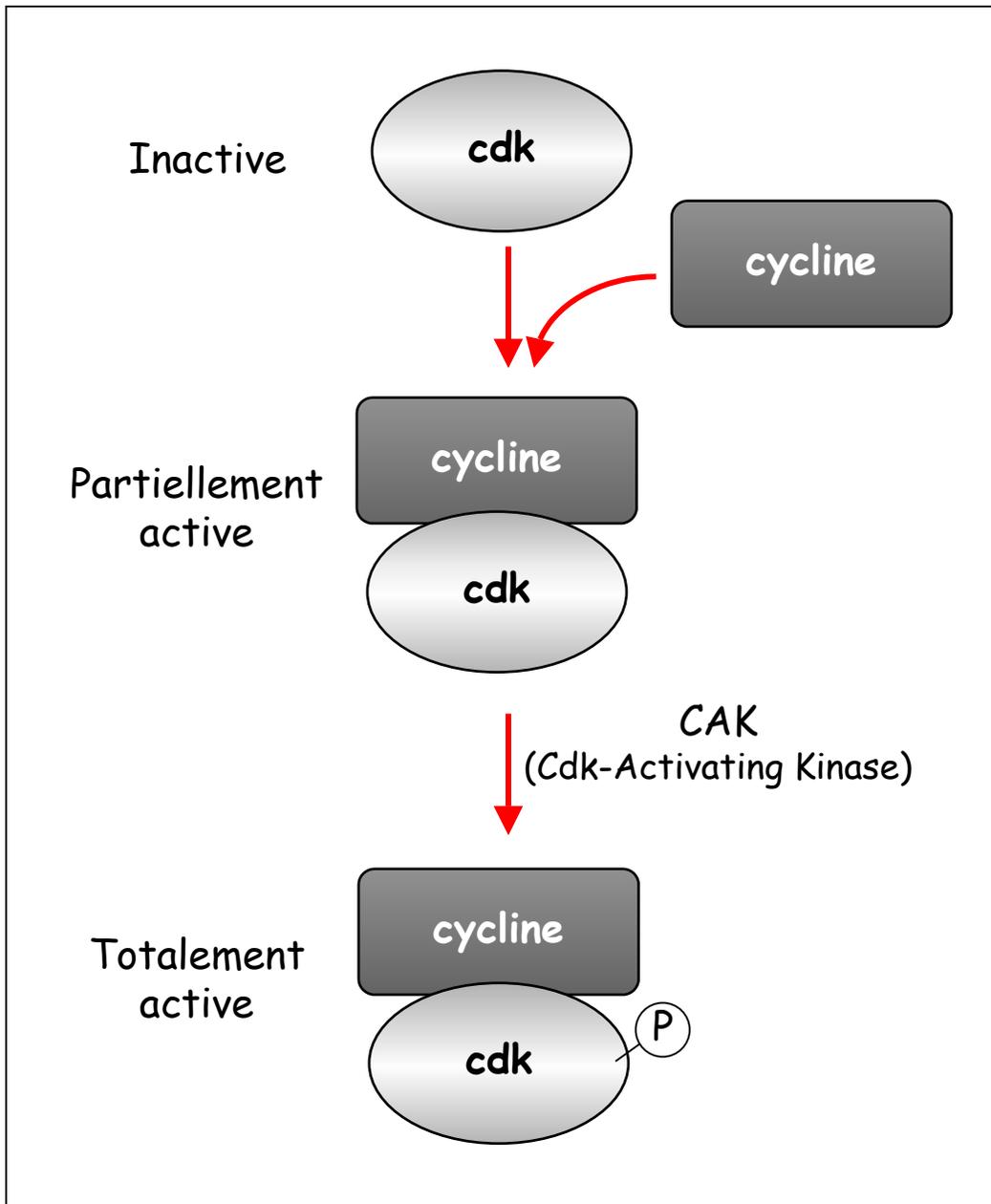


Figure 20. Représentation schématique de la régulation des cdk par la fixation d'une cycline spécifique et leur phosphorylation. Les flèches rouges indiquent une activation des cdk.

a) Phosphorylations activatrices

Pour être complètement activés, les complexes cdk-cycline doivent être phosphorylés sur un résidu thréonine conservé, situé au niveau de la boucle T des cdk. Cette phosphorylation, identifiée en premier lieu chez *S. pombe*, au niveau du résidu Thr167 de Cdc2 (Gould et Nurse, 1989 et Gould *et al.*, 1991), puis chez le Xénope (Thr161 de cdk1) et chez *S. cerevisiae* (Thr169 de cdc28), est nécessaire à l'activité des cdk. Elle stimule en effet l'activité d'un complexe cdk-cycline de l'ordre de 80 à 300 fois (Connell-Crowley *et al.*, 1993; Russo *et al.*, 1996).

La structure cristallographique du complexe cdk2-cyclineA montre que la phosphorylation de la Thr160 de cdk2 (correspondant au résidu Thr161 de cdk1) induit un mouvement de la boucle T qui positionne le groupe phosphate dans une poche chargée positivement formée par 3 arginines (figure 21). Ces trois résidus proviennent de différentes parties de la structure (un du lobe amino-terminal, un du lobe carboxy-terminal et un de la boucle T) (Russo *et al.*, 1996). Le phosphate agit alors comme un nœud central formant un réseau de liaisons hydrogène complétant la réorganisation du site de liaison du substrat engagée par l'interaction de la cycline. Le complexe cdk-cycline se trouve ainsi stabilisé et son activité enzymatique stimulée.

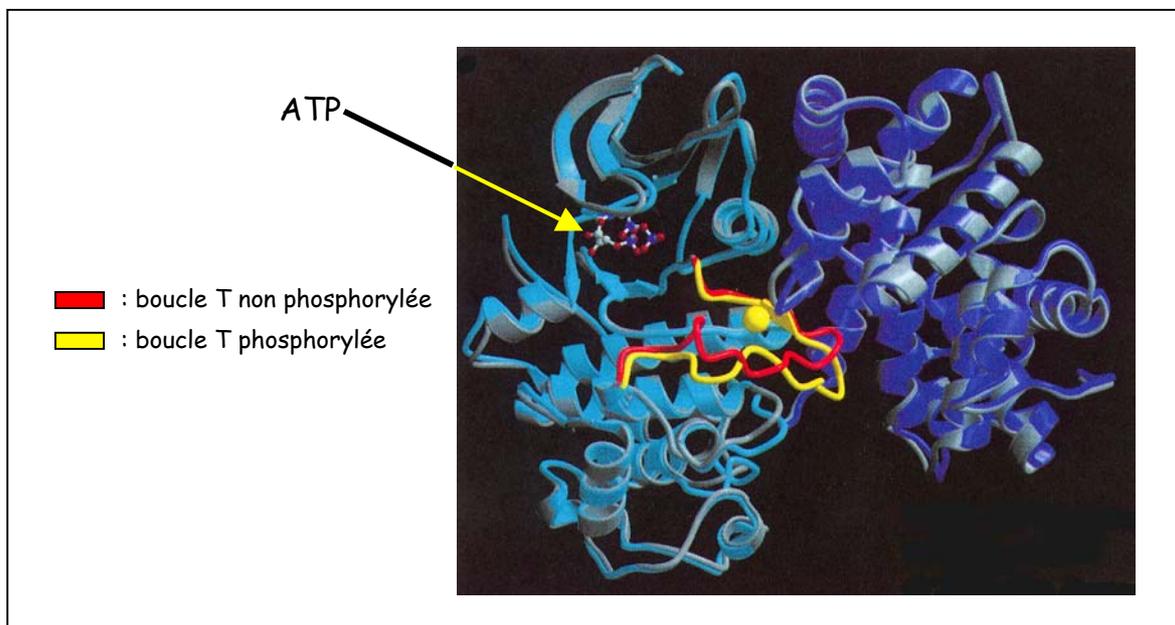


Figure 21. **Changement conformationnel de la cdk induit par la phosphorylation de sa boucle T.** La kinase cdk2 est représentée en bleu et la cycline A en violet. Le complexe cdk2-cyclineA non phosphorylé est représenté en gris. La sphère jaune représente le groupement phosphate du résidu phosphorylé de la cdk (reproduit de Russo *et al.*, 1996).

La protéine-kinase responsable de la phosphorylation du résidu Thr de cdk1, cdk2, cdk4 et cdk6 a été identifiée, il s'agit de la *CAK* (*cdk-activating kinase*). Chez la levure *S. pombe* et chez les métazoaires, cette kinase est un complexe trimérique formé d'une sous-unité catalytique, cdk7 (Darbon *et al.*, 1994), une sous-unité régulatrice, la cycline H (Fesquet *et al.*, 1993; Fisher et Morgan 1994 et Makela, *et al.*, 1994), et la protéine MAT1 (*Ménage-A-Trois*) (Tassan *et al.*, 1995) (voir page 62). Chez la levure *S. cerevisiae*, l'activité *CAK* a cependant été caractérisée comme une protéine monomérique appelée Cak1 (ou Civ1) (Espinoza *et al.*, 1996; Kaldis *et al.*, 1996 et Thuret *et al.*, 1996). Une protéine-phosphatase agissant sur le site Thr160 de cdk2 a également été identifiée et appelée KAP (Poon et Hunter, 1995). L'activité de KAP permettrait à cdk1 de revenir à son état monomérique non phosphorylé après dégradation de la cycline.

b) Phosphorylations inhibitrices

L'activité de certains complexes cdk-cycline peut être inhibée par la phosphorylation de deux résidus conservés, correspondant aux résidus Thr14 et Tyr15 de cdk1, qui se situent dans la région de fixation de l'ATP au niveau du motif Gly-X-Gly-X-X-Gly (Gould et Nurse, 1989; Krek et Nigg, 1991 et Norbury *et al.*, 1991). Ces phosphorylations inhibent l'activité de l'enzyme mais ne bloquent pas la fixation de l'ATP *in vitro*, suggérant qu'elles exercent un effet plus subtil dans le positionnement de l'ATP.

Kinase	Espèce	Site(s) phosphorylé(s)	Références
Wee1	<i>S. pombe</i>	Thr/Tyr	Russell et Nurse, 1987 Parker <i>et al.</i> , 1992
	<i>S. cerevisiae</i> (Swe1)	Tyr	Booher <i>et al.</i> , 1993
	Homme	Tyr	Parker <i>et al.</i> , 1992 McGowan et Russell, 1993
	Xénope	Tyr	Mueller <i>et al.</i> , 1995a
	Drosophile (Dwee1)	Tyr	Campbell <i>et al.</i> , 1995
Myt1	Xénope	Thr/Tyr	Mueller <i>et al.</i> , 1995b
	Homme	Thr/Tyr	Liu <i>et al.</i> , 1997
Mik1	<i>S. pombe</i>	Tyr	Lee <i>et al.</i> , 1994

Table 6. Protéine-kinases responsables de la phosphorylation inhibitrice des résidus Thr14 et Tyr15 de cdk1 (cdc2) chez différentes espèces.

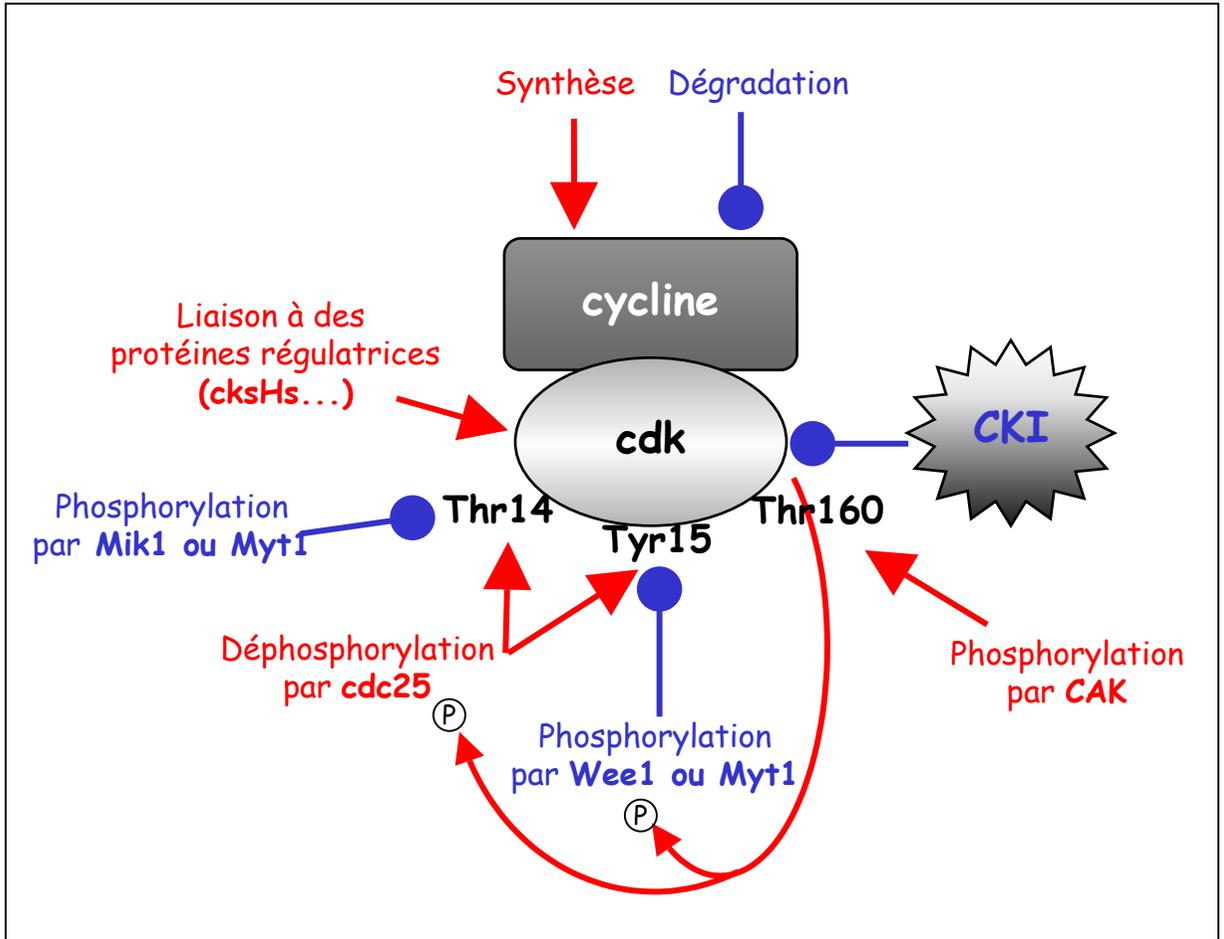


Figure 22 : Différents modes de régulation de l'activité des cdk. Ce schéma très simplifié résume les différents mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des cdk chez les mammifères. Les événements aboutissant à l'activation des cdk sont indiqués en rouge et ceux inhibant leur activité en bleu.

Les protéine-kinases responsables de la phosphorylation de ces résidus ont été caractérisées chez différentes espèces. Il s'agit des kinases Wee1, Mik1 et Myt1 (table 6). A titre d'exemple, Wee1 inhibe l'activité de cdk1 pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire en phosphorylant son résidu Tyr15 (McGowan *et al.*, 1993). L'activité de ces enzymes est elle-même régulée par phosphorylation au cours du cycle cellulaire. Le complexe cdc2-cyclineB est en effet capable de phosphoryler, et ainsi d'inhiber, la protéine Wee1 (Mueller *et al.*, 1995), fournissant ainsi une boucle d'auto-régulation au moment de l'entrée en mitose (figure 22). Le rôle physiologique de ces phosphorylations inhibitrices serait d'empêcher la cellule d'entrer en mitose tant que la réplication de l'ADN n'est pas accomplie ou tant que l'ADN endommagé n'est pas réparé (pour une revue : Lew et Kornbluth, 1996).

L'entrée en mitose est également contrôlée par cdc25, une protéine-phosphatase capable de déphosphoryler les résidus Thr14 et Tyr15 (pour une revue : Solomon et Kaldis, 1998). Cette enzyme est présente dans différentes espèces comme les levures *S. pombe* (Russell et Nurse, 1986) et *S. cerevisiae* (Russell *et al.*, 1989), la Drosophile (Edgar et O'Farrell, 1989 et Alphey *et al.*, 1992), le Xénope (Kumagai et Dunphy, 1992) et l'Homme (Sadhu *et al.*, 1990 et Galaktionov et Beach, 1991). Cdc25 est elle-même activée par phosphorylation par la kinase cdc2 (Hoffman *et al.*, 1993) ou cdk2 (Hoffman *et al.*, 1994) *in vitro*.

Ainsi, l'entrée en mitose est finement contrôlée par des boucles de régulation faisant intervenir la phospho- ou dephosphorylation des kinases ou des phosphatases qui agissent sur des sites communs des cdk (figure 22).

1.2.3- Régulation par les inhibiteurs de cdk (CKI)

L'activité des complexes cdk-cycline est également contrôlée par l'interaction d'inhibiteurs de cdk (CKI, pour *cyclin-dependent kinase inhibitor*). Ces protéines existent chez de nombreux organismes, de la levure aux mammifères. Chez les levures, Sic1 de *S. cerevisiae* et Rum1 de *S. pombe* contrôlent l'entrée en phase S et assurent le déroulement ordonné des événements du cycle cellulaire (Nasmyth *et al.*, 1996 et Stern et Nurse, 1996). Chez les mammifères, sept inhibiteurs CKI ont été identifiés et classés en deux familles selon leur spécificité, leur structure et leur mécanisme d'action : les membres de la famille INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D}) ou de la famille CIP/KIP (p27^{KIP} et p57^{KIP2}) (Sherr et Roberts, 1995).

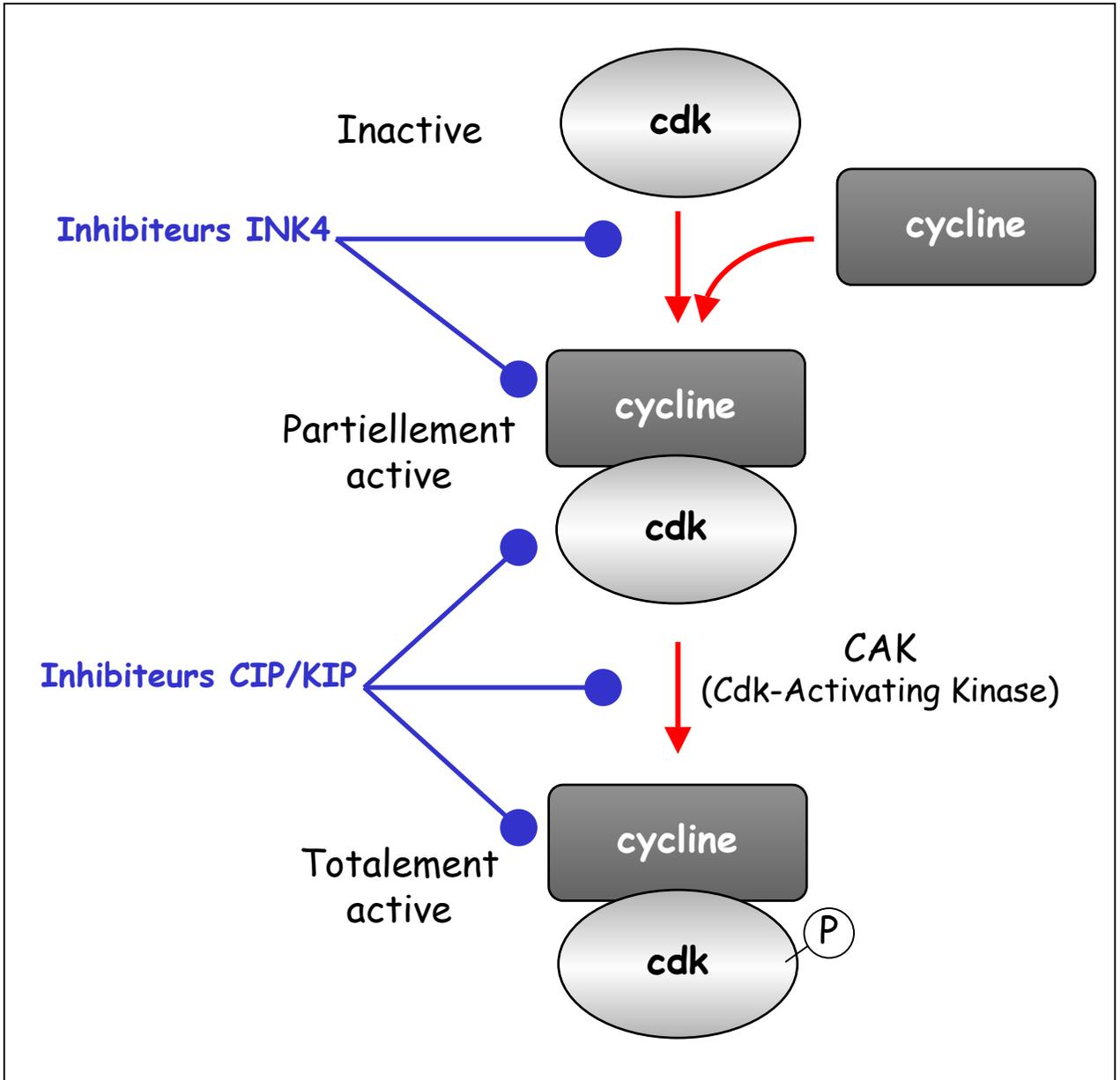


Figure 23. Représentation schématique du mode de régulation des cdk par les deux familles de CKI (cdk-inhibitor) : INK4 ou CIP/KIP. Les flèches rouges indiquent une activation des cdk et les flèches bleues une inhibition.

Des données structurales montrent que le mode d'interaction et d'inhibition varie d'une famille d'inhibiteur à l'autre. Les membres de la famille INK4 inhibent l'activité kinase des cdk en formant un complexe binaire avec celles-ci (figure 23). Ils se lient à la cdk monomérique du côté opposé au site de liaison de la cycline, entraînant une distorsion de la cdk qui altère le site de fixation de la cycline et de l'ATP, et bloque le mouvement de l'hélice PSTAIRE (Peter, 1997). Les membres de la famille CIP/KIP agissent quant à eux par la formation d'un complexe ternaire cdk-cycline-CKI. Ils lient des complexes cdk-cyclines et réorganisent le lobe amino-terminal de la cdk, déstabilisant les contacts importants pour le maintien de l'ATP. Une hélice de l'inhibiteur vient également se placer dans le site catalytique de la cdk, éliminant ainsi la possibilité d'interaction de l'ATP (Russo *et al.*, 1996). Cette hélice contient un résidu tyrosine dont la chaîne latérale mime les contacts et la position du groupe purine de l'ATP. De plus, la proximité de l'inhibiteur avec la boucle T peut gêner sa phosphorylation par le complexe CAK.

Étant donné l'importance qu'ont les CKI dans la coordination de la prolifération et de la différenciation cellulaire, il n'est pas surprenant que leur activité soit étroitement régulée au cours du cycle ou en réponse à différents signaux. Généralement, cette régulation affecte principalement le taux cellulaire des CKIs plutôt que leur activité intrinsèque. Le taux des CKIs est régulé par plusieurs mécanismes comme la transcription, la traduction et la protéolyse dirigée par ubiquitination (pour une revue : Peter, 1997). De plus, les inhibiteurs des deux familles ne peuvent pas interagir en même temps sur le même complexe. Ainsi, une classe d'inhibiteur peut donc empêcher l'interaction avec les inhibiteurs d'une autre classe, entraînant une redistribution de ces inhibiteurs à d'autres complexes cdk-cycline.

1.2.4- Régulation par d'autres mécanismes

La localisation cellulaire des cyclines et des cdk, mais aussi des activateurs et des inhibiteurs de l'activité de ces complexes, à un moment donné du cycle cellulaire peut jouer un rôle déterminant dans l'accessibilité à certains substrats de la kinase. Par exemple, la localisation cellulaire du complexe cdk1-cyclineB apparaît finement régulée au cours du cycle cellulaire (Pines et Hunter, 1994) et une localisation nucléaire spécifique a été observée pour un certain nombre de cdk et de cyclines (Baldin *et al.*, 1993, Jackman *et al.*, 1995; Ohtsubo *et al.*, 1995, Keenan, *et al.*, 2001 et Frouin *et al.*, 2002; pour des revues : Takizawa et Morgan, 2000 et Obaya et Sedivy, 2002).

Un des mystères de la régulation des cdk reste le rôle de la protéine p13suc1 chez *S. pombe* et celui de ses homologues cksHs1 et cksHs2 chez *S. cerevisiae* et chez les vertébrés (pour une revue : Morgan, 1995). Ces protéines de petite taille qui sont essentielles à la progression dans le cycle cellulaire sont retrouvées fortement associées aux cdk *in vivo*. Cependant, on ne leur connaît pas encore de fonction précise sur l'activité des cdk. La cristallisation de la protéine cksHs2 humaine suggère que ces protéines sont impliquées dans l'oligomérisation des cdk *in vivo* (Parge *et al.* 1993).

1.3- Conclusions

La majorité des processus régulant l'activité des cdk (interaction de la cycline, phosphorylation et fixation des inhibiteurs CKI) induit une réorganisation structurale de celles-ci. Ceci indique que les cdk possèdent une plasticité structurale intrinsèque, en particulier au niveau de leur site catalytique. On peut considérer que les cdk monomériques ne sont pas complètement repliées. Lors de l'interaction avec la cycline, cette dernière organise la structure de façon à placer les résidus du site actif dans une position correcte et déplace la boucle T. Puis, une fois phosphorylée, la thréonine de la boucle T agit comme un nœud central pour terminer ces réarrangements structuraux. Les cdk adoptent alors la structure générale des sérine/thréonine kinases (non cycline-dépendantes) (Russo *et al.*, 1996). Enfin, une fois assemblées et actives, les cdk peuvent de nouveau subir d'autres changements structuraux suite à l'interaction avec des CKI.

2- RÔLE DES CDK DANS LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

En plus des complexes cdk-cycline impliqués dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire, trois d'entre eux joueraient un rôle dans la régulation de la transcription : les complexes cdk7-cyclineH, cdk8-cyclineC et cdk9-cyclineT (pour une revue : Lania *et al.*, 1999). Ces trois kinases sont capables de phosphoryler le domaine carboxy-terminal (CTD) de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II (ARN Pol II) mais leurs rôles dans la régulation de l'activité de cette enzyme sont distincts.

2.1- Le complexe cdk7-cycline H

La kinase cdk7 est une protéine ubiquitaire de 40 kDa qui contient les 12 domaines communs aux protéine-kinases (Tassan *et al.*, 1994). Contrairement aux cdk qui contrôlent le cycle cellulaire, cdk7 contient un signal de localisation nucléaire, qui lui confère une localisation préférentielle dans le noyau (Tassan *et al.*, 1994 et Darbon *et al.*, 1994) et son activité est constante au cours du cycle cellulaire (Poon *et al.*, 1994; Tassan *et al.*, 1994). De même, cette cdk ne présente pas de résidus correspondant aux sites de phosphorylations inhibitrices (Thr14 et Tyr15 dans le cas de cdk1) et a la particularité inédite d'exister sous la forme d'un complexe trimérique avec la cycline H et la protéine MAT1. L'association de MAT1 au complexe cdk7-cyclineH permet de passer outre l'activation de cdk7 par la phosphorylation de la boucle T et permet également à cdk7 d'acquiescer pleinement son activité (Devault *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1995 et Tassan *et al.*, 1995).

Le complexe ternaire cdk7-cycline H-MAT1 peut également constituer un sous-complexe fonctionnel du facteur de transcription-réparation TFIIH (voir publication 1) et cette association à TFIIH modifie sa spécificité de substrat. En effet, au sein du complexe CAK libre, cdk7 phosphoryle cdk1, cdk2, cdk3, cdk4 et cdk6 (pour une revue : Nigg, 1996) mais, une fois associée à TFIIH, elle phosphoryle préférentiellement les substrats liés à la réaction de transcription, c'est-à-dire : le domaine CTD de l'ARN Pol II, TFIIE, TFIIIF, la TBP et les activateurs transcriptionnels tels que les récepteurs nucléaires, Oct1 ou p53 (Rossignol *et al.*, 1997; Yankulov et Bentley, 1997).

Au sein de TFIIH, cdk7 est la principale kinase responsable de la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II *in vivo* (Valay *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 2001). Cette phosphorylation permet la transition entre les phases d'initiation et d'élongation de la transcription (Dahmus, 1996 et Yamamoto, 2001), mais sa fonction précise reste cependant à déterminer. *In vitro*, la phosphorylation du CTD par TFIIH stimule la transcription d'une manière générale (Orphanides *et al.*, 1996) mais peut inhiber l'activité de l'ARN Pol II lorsqu'elle précède la formation du complexe de pré-initiation sur l'ADN (Serizawa *et al.*, 1993; Gebara *et al.*, 1997). De plus, même si la présence du sous-complexe CAK est essentielle à l'activité optimale de TFIIH dans une réaction de transcription *in vitro* (Svejstrup *et al.*, 1995; Drapkin *et al.*, 1996 et Reardon *et al.*, 1996), plusieurs études ont mis en évidence que la nécessité de la phosphorylation du CTD par cdk7 pour la transcription de certains gènes dépend de la nature de leur promoteur *in vitro* (Akoulitchev *et al.*, 1995 et Makela *et al.*, 1995) et *in vivo* (Lee et Lis, 1998).

La dualité de fonction de cdk7, dans la régulation du cycle cellulaire (par l'activation des cdk) et dans la régulation de la transcription (par la phosphorylation du CTD), suggère une connexion entre ces deux processus. Cette idée est soutenue par des observations récentes concernant l'inhibiteur spécifique de cdk4 et cdk6, p16^{INK4A}. Ce CKI interagit directement avec cdk4 et inhibe la phosphorylation de pRb, provoquant ainsi l'arrêt du cycle en phase G1 (Serrano *et al.*, 1993). p16^{INK4A} est par ailleurs capable d'inhiber la phosphorylation du CTD par cdk7, sans affecter son activité activatrice des cdk (Serizawa *et al.*, 1998 et Nishiwaki *et al.*, 2000). Récemment, un mutant de p16^{INK4A} (G101W) a été identifié dans des cas de mélanomes familiaux. Ce mutant est toujours capable d'arrêter le cycle cellulaire en G1 (Koh *et al.*, 1995; Soufir *et al.*, 1998) bien qu'il ai perdu sa capacité d'inhiber la phosphorylation de pRb par cdk4 (Nishiwaki, 2000), probablement parce qu'il est toujours capable d'inhiber la phosphorylation du CTD par cdk7. Ces observations indiquent que la phosphorylation du CTD par cdk7 contribue, par un moyen inconnu, à la régulation de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire.

2.2- Le complexe cdk9-cycline T

La kinase cdk9 est une protéine ubiquitaire de 43 kDa qui contient les 12 domaines communs aux protéine-kinases (Hanks *et al.*, 1988). Elle fut initialement nommée "PITALRE" pour la différencier des autres cdk, dont la séquence impliquée dans la fixation de la cycline (dans le domaine III) est PISTAIRE (Grana *et al.*, 1994, Peng *et al.*, 1998 et Wei *et al.*, 1998). Comme dans le cas de cdk7, cdk9 contient un signal de localisation nucléaire, qui lui confère une localisation préférentielle dans le noyau (Grana *et al.*, 1994), et son activité est constante au cours du cycle cellulaire (Garriga *et al.*, 1998).

Cdk9 est la sous-unité catalytique du facteur d'élongation P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*) où elle est associée à la cycline T (Wei *et al.*, 1998 et Peng *et al.*, 1998). P-TEFb permet l'allongement des transcrits en maintenant l'état de phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II (Marshall *et al.*, 1996). En l'absence de P-TEFb, deux facteurs inhibiteurs de l'élongation, DSIF (*DRB Sensitivity Inducing Factor*) et NELF (*Negative ELongation Factor*), s'associent à l'ARN Pol II et s'opposent à sa progression au delà de quelques dizaines de nucléotides après le site d'initiation (Yamaguchi *et al.*, 1999a). La phosphorylation du CTD par P-TEFb pourrait favoriser la dissociation de DSIF et NELF de l'ARN Pol II (Yamaguchi *et al.*, 1999b).

Il faut enfin noter que cdk9-cyclineT peut également s'associer à d'autres protéines dont l'identité et la fonction sont encore inconnues, même si on peut supposer qu'elles peuvent réguler la kinase ou orienter sa spécificité de substrat (Zhu *et al.*, 1997).

2.3- Le complexe cdk8-cycline C

La kinase cdk8 (ou son homologue SRB10 chez la levure) a pour partenaire la cycline C (ou SRB11). Contrairement à la majorité des cdk, cdk8 a la particularité de ne pas présenter de site de phosphorylation activatrice (résidu Thr) dans sa boucle T (Tassan *et al.*, 1995). Comme pour cdk7 et cdk9, le niveau d'expression et l'activité enzymatique de cdk8 sont constants au cours du cycle cellulaire (Rickert *et al.*, 1996).

Chez la levure, SRB10 et SRB11 font partie du complexe médiateur et la cdk phosphoryle le CTD de l'ARN Pol II (Thompson *et al.*, 1993; Liao *et al.*, 1995 et Ossipow *et al.*, 1995). Chez les mammifères, cdk8 peut également phosphoryler le CTD *in vitro* (Leclerc *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 1996; Rickert *et al.*, 1996; Rickert *et al.*, 1999), mais cdk8 et la cycline C ne sont présentes que dans certains complexes médiateurs. En effet, on les trouve au sein de NAT (Sun *et al.*, 1998) et de TRAPP/SMCC (Gu *et al.*, 1999), mais pas dans ARC/DRIP ni dans CRSP/PC2, le plus petit des complexes médiateurs (voir page 39).

Chez la levure, SRB10 agit comme un répresseur de la transcription *in vivo*. De même, la présence de cdk8 au sein de certains complexes médiateurs des mammifères semble être à l'origine de leur activité inhibitrice sur la transcription (Sun *et al.*, 1998 et Gu *et al.*, 1999). Le mécanisme précis de cette répression n'est pas encore clair, mais il semble qu'il fasse intervenir la phosphorylation du CTD par cette kinase. Chez la levure, SRB10 phosphoryle le CTD avant le recrutement de l'ARN Pol II sur le promoteur et réprime ainsi son interaction avec le PIC (figure 24). Chez les mammifères, la kinase de TFIIH est elle-même la cible de cdk8 qui, au sein du médiateur NAT, phosphoryle la cycline H ce qui a pour effet d'inhiber l'activité kinase de cdk7 et, de ce fait, de réprimer la transcription (Akoulitchev *et al.*, 2000). Le complexe cdk8-cyclineC pourrait donc être considéré comme un "module" inhibiteur de la transcription au sein de certains complexes médiateurs chez les eucaryotes supérieurs.

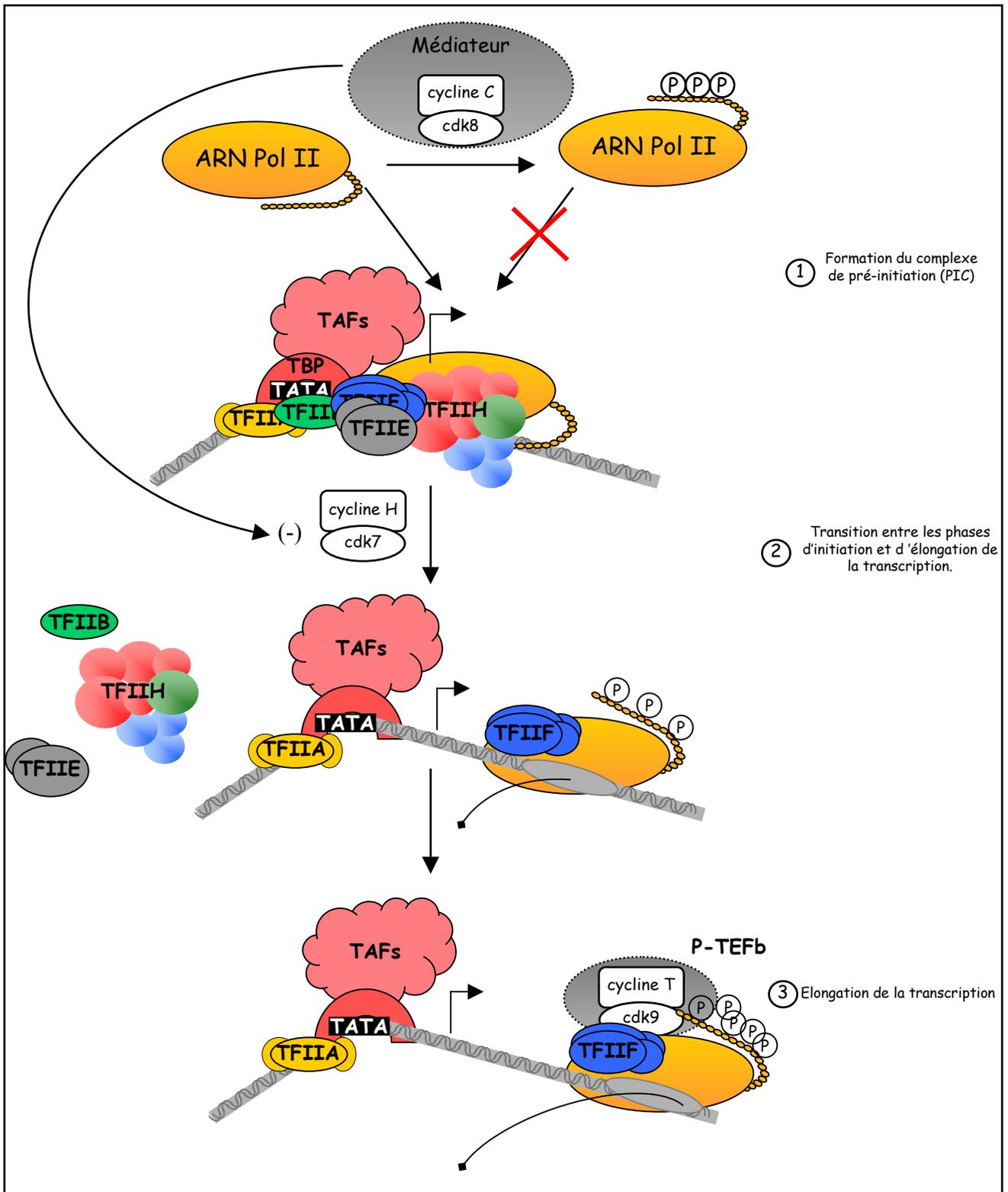


Figure 24. Représentation schématique du rôle des trois kinases du CTD dans la régulation de la transcription. Les trois kinases capables de phosphoryler le CTD de l'ARN Pol II agissent à différentes étapes de la réaction de transcription : (1) cdk8 (présente au sein du complexe médiateur) empêche l'association de l'ARN Pol II au complexe de pré-initiation (PIC); (2) après l'assemblage du PIC sur le promoteur, la phosphorylation du CTD par cdk7 (au sein du facteur général de transcription TFIIH) permet la transition entre les phases d'initiation et d'élongation de la transcription; (3) cdk9 (au sein du facteur d'élongation P-TEFb) maintient le niveau hyperphosphorylé du CTD pendant la phase d'élongation pour éviter l'arrêt prématuré de l'ARN Pol II.

2.4- Régulation concertée de la transcription par cdk7, cdk8 et cdk9

Les trois kinases décrites ci-dessus sont capables de phosphoryler le CTD de l'ARN Pol II de façon similaire et avec la même efficacité. Cependant, bien qu'ayant le même substrat, chacune d'entre elles semble avoir une spécificité pour une des différentes étapes de la réaction (figure 24). La phosphorylation de la Ser5 de l'heptapeptide du CTD par cdk7 n'a lieu que lorsque tous les composants du PIC sont assemblés sur le promoteur, ce qui confère à cette réaction un haut niveau de spécificité (Lu H *et al.*, 1992). A l'inverse, cdk8 est capable de phosphoryler l'ARN Pol II (sur les résidus Ser2 et Ser5) avant la formation du PIC sur le promoteur, alors que l'ARN Pol II est associée au complexe médiateur au sein de l'holoenzyme (Hengartner *et al.*, 1998 et Sun *et al.*, 1998). Enfin, cdk9 phosphoryle préférentiellement la Ser2 du CTD lorsque celui-ci a été préalablement phosphorylé (par cdk7, par exemple) (Marshall *et al.*, 1996).

En agissant séquentiellement, ces cdk semblent donc réguler la transcription de manière concertée : 1) au sein du complexe médiateur (et de l'holoenzyme), cdk8 empêcherait l'incorporation de l'ARN Pol II dans le PIC, 2) au sein du facteur général de transcription TFIID (et du PIC), cdk7 permettrait la transition entre l'initiation et l'élongation, et 3) au sein du facteur d'élongation P-TEFb, cdk9 maintiendrait l'ARN Pol II dans un état phosphorylé au cours de l'élongation et permettrait le recrutement des enzymes de maturation des ARN pré-messagers (voir page 12).

2.5- Détournement de cdk7 et cdk9 par le virus HIV

Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) est capable de détourner ce mode de régulation concerté au profit de l'expression de son génome. Une protéine virale, Tat, stimule en effet l'expression de certains gènes du HIV (Jones et Peterlin, 1994). Le facteur TAK (*Tat-activating kinase*), un co-régulateur transcriptionnel nécessaire à l'activation de la transcription par Tat, s'est révélé correspondre au facteur d'élongation P-TEFb (Herrmann et Rice, 1995; Gold *et al.*, 1998).

Dans les cellules infectées par le VIH, l'activateur transcriptionnel Tat s'associe à la fois à cdk9, via son domaine d'activation, *in vitro* (Herrmann et Rice, 1993; Herrmann et Rice, 1995; et Chun et Jeang, 1996) et *in vivo* (Yang *et al.*, 1996), et à la cycline T (Ivanov *et al.*, 1999; Kwak *et al.*, 1999). Tat stimule alors l'activité kinase de cdk9 envers le CTD (Mancebo *et al.*, 1997; Zhu *et*

al., 1997; Ivanov *et al.*, 1999), augmentant ainsi la processivité de l'ARN Pol II au cours de l'élongation de la transcription (Yang *et al.*, 1997).

Tat intervient également au niveau de l'initiation de la transcription en stabilisant le PIC, par des interactions avec des éléments de la machinerie transcriptionnelle comme TBP, TFIIB, ou l'ARN Pol II (Mavankal *et al.*, 1996; Cujec *et al.*, 1997a; Veschambre *et al.*, 1997), et en stimulant une autre CTD kinase, cdk7, responsable de la phosphorylation du CTD lors de la transition entre l'initiation et l'élongation (Okamoto *et al.*, 1996; Parada et Roeder, 1996; Cujec *et al.*, 1997b). Ainsi Tat semble pouvoir activer la phosphorylation séquentielle du CTD grâce à cdk7 lors de la transition initiation-élongation, puis grâce à cdk9 lors de l'élongation (pour une revue, Jones, 1997). Récemment, seule la kinase cdk9 a été identifiée comme étant essentielle à l'activation de la transcription par Tat (Chen et Zhou, 1999).

CHAPITRE V : TFIIH, UN COMPLEXE MULTIFONCTIONNEL AU CENTRE DES PLUSIEURS PROCESSUS FONDAMENTAUX

TFIIH fut découvert il y a plus de dix ans comme un facteur nécessaire à la transcription des gènes de classe II. Il correspond au facteur σ isolé chez le rat (Conaway et Conaway, 1989), au facteur β isolé chez la levure (Feaver *et al.*, 1991), ainsi qu'au facteur BTF2 isolé chez l'homme (Gérard *et al.*, 1991). C'est l'un des plus gros et des plus complexes des facteurs généraux de transcription. Il est composé de neuf sous-unités, d'un poids moléculaire allant de 32 à 89 Kda, (figure 25) et possède des activités enzymatiques intrinsèques : deux activités hélicases, portées par les sous-unités de 80 (XPD) et 89 KDa (XPB), ainsi qu'une activité kinase dépendante des cyclines portée par la sous-unité cdk7. La découverte de l'appartenance des sous-unités XPD et XPB au processus de réparation de l'ADN, ainsi que de trois autres sous-unités de TFIIH (formant un sous-complexe fonctionnel appelé CAK) à la régulation du cycle cellulaire, permit de porter un nouveau regard sur la connexion entre la transcription, la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire (Weber *et al.*, 1988; Weeda *et al.*, 1990; Schaeffer *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1994; Schaeffer *et al.*, 1994).

1- LES SOUS-UNITES DU FACTEUR TFIIH

Lors de la purification du facteur TFIIH à partir de cellules humaines, il s'est avéré que trois de ses sous-unités (cdk7, cycline H et MAT1) pouvaient soit exister sous la forme d'un complexe ternaire appelé CAK (pour *cdk-activating kinase*), soit être associées aux autres sous-unités de TFIIH pour former un complexe à 9 sous-unités. TFIIH est donc composé de deux sous-complexes fonctionnels (figure 25) : le complexe CAK et le cœur de TFIIH, composé de 5 sous-unités (XPB, p62, p52, p44 et p32). La sous-unité restante, XPD, peut être associée soit au cœur soit au CAK et joue probablement un rôle de pontage entre ces deux sous-complexes (Drapkin *et al.*, 1996; Reardon *et al.*, 1996; Rossignol *et al.*, 1997).

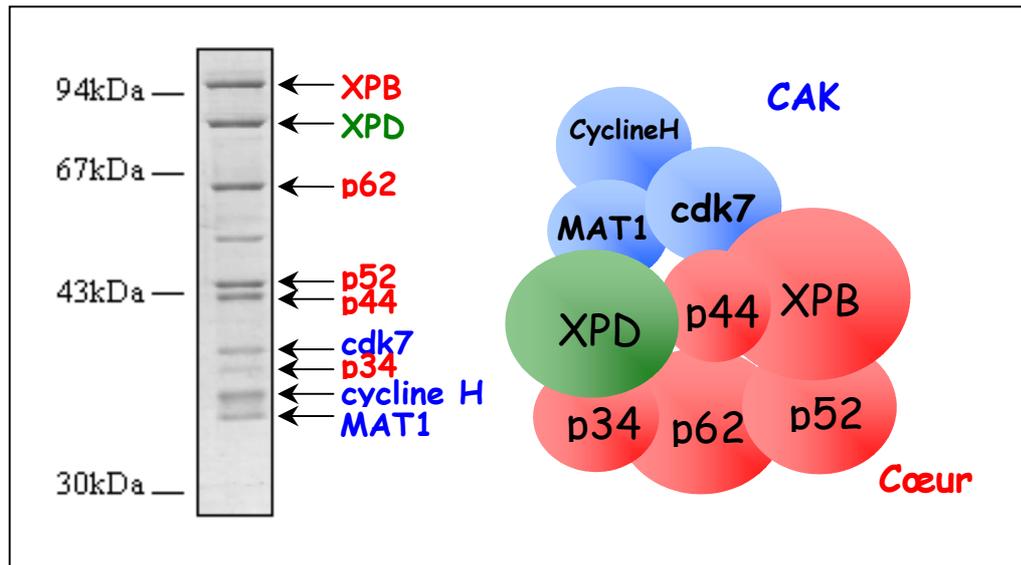


Figure 25 : Le facteur de transcription-réparation TFIIH. A gauche : gel SDS-PAGE coloré à l'argent mettant en évidence les 9 sous-unités du complexe TFIIH purifié à partir de cellules HeLa. A droite : représentation schématique du complexe, mettant en évidence les deux-sous-complexes fonctionnels : le CAK (*cdk-activating kinase*, en bleu) et le cœur (en rouge).

1.1- Les sous-unités du cœur de TFIIH

XPB, un polypeptide de 762 acides aminés et de poids moléculaire 89 KDa, possède sept domaines structuraux correspondant à des domaines hélicases ADN/ADN (Ma *et al.*, 1994). En effet, XPB possède une activité hélicase de polarité 3'-5' couplée à une activité ATPasique dépendante de la présence d'ADN (Ma *et al.*, 1994). Des expériences de mutagenèse dirigée dans le gène *xpb* humain ont montré qu'une mutation dans le site de fixation de l'ATP de XPB inhibe l'activité ATPase mais également l'activité hélicase, entraînant la mort des cellules (Ma *et al.*, 1994). XPB contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN de type hélice-tour-hélice nécessaire à son activité (Ma *et al.*, 1994). Des mutations dans la protéine XPB peuvent être à l'origine de maladies génétiques très rares (voir plus bas).

p62, un polypeptide de 548 acides aminés et d'un poids moléculaire de 62 KDa, fut la première sous-unité humaine de TFIIH à être clonée (Fischer *et al.*, 1992). Bien que cette protéine ne possède pas de motifs structuraux particuliers, des anticorps dirigés contre celle-ci inhibe fortement la transcription *in vitro* suggérant un rôle essentiel dans la réaction de

transcription. L'homologue chez la levure, TFB1, est non seulement requis pour la viabilité de la cellule (Gileadi *et al.*, 1992), mais est également impliqué dans la réparation de l'ADN puisqu'une troncation de cette protéine, qui abolit son interaction avec la sous-unité Ssl1 (ou p44) de TFIIH, entraîne une hypersensibilité aux rayons ultraviolets (Matsui *et al.*, 1995). L'analyse de la séquence génomique de p62 révèle une séquence codante répartie sur 14 exons couvrant 21 Kpb (Perez *et al.*, 1998).

p52 est une protéine de 436 acides aminés et d'un poids moléculaire de 52 KDa. Elle fut la dernière sous-unité de TFIIH à avoir été cloné (Marinoni *et al.*, 1997). Bien que cette protéine ne possède pas de motifs structuraux particuliers, comme dans le cas de p62, un anticorps dirigé contre ce polypeptide inhibe la transcription *in vitro* et *in vivo*. L'homologue de p52 chez la levure, TFB2, est nécessaire à la viabilité de la cellule (Feaver *et al.*, 1997). Au sein de TFIIH, cette sous-unité semble ancrer l'hélicase XPB au cœur de TFIIH et participe ainsi à l'activité transcriptionnelle optimale du complexe (Jawahri A. *et al.*, soumis).

p44 comporte de 395 acides aminés pour un poids moléculaire de 44 KDa (Humbert *et al.*, 1994). Ssl1 (pour Suppressor of Stem Loop 1), l'homologue de p44 chez la levure, a été identifié lors d'un criblage génétique permettant la recherche de protéines impliquées dans l'initiation de la traduction. En effet, Ssl1 possède la capacité à stimuler la traduction d'un ARN possédant une structure en épingle à cheveux en début de séquence (Yoon *et al.*, 1992). Les levures possédant une mutation dans ce gène montrent une hypersensibilité aux UV liée à un défaut de réparation de l'ADN ainsi qu'un phénotype de thermosensibilité due à une déficience de l'activité transcriptionnelle de la levure (Wang *et al.*, 1995). Au sein de TFIIH, p44 interagit avec la sous-unité XPD par l'intermédiaire de son extrémité amino-terminale (Seroz *et al.*, 2000) et régule son activité hélicase (Coin *et al.*, 1998). De plus, l'interaction entre Ssl1 et TFB1 (p62) est absolument indispensable à la viabilité de la cellule (Matsui *et al.*, 1995). Cette interaction fait intervenir un motif structural de type "doigt de zinc" (CX₂CX₄CX₅CX₂C) situé dans la partie carboxy-terminale de p44. Enfin, un motif de type "RING finger-like" (CX₂CX₁₁CX₂CX₄CX₂CX₁₀CX₂C), situé à son extrémité carboxy-terminale (Humbert *et al.*, 1994), participe à l'activité de TFIIH lors de l'échappée du promoteur (Tremeau-Bravard *et al.*, 2001). Il existe deux copies du gène *p44* dans le génome humain. En effet, une région chromosomique, comprenant non seulement *p44* mais également d'autres gènes comme SMN ou NAIP, est dupliquée; une copie étant placée du côté centromérique du chromosome 5 (5q13) et l'autre du côté télomérique du même bras chromosomique. La région télomérique peut être

délétée dans les cellules de patients atteints de la maladie de Werdnig-Hoffmann, conduisant à une atrophie musculaire spinale (Burglen *et al.*, 1997). Bien que cette délétion puisse éliminer une partie de la séquence de la copie télomérique, il ne semble pas que p44 soit impliqué dans cette maladie, puisque la copie centromérique est intacte et fonctionnelle. En effet, les activités de transcription et de réparation d'extraits de cellules de patients restent inchangées. Bien que les deux copies de p44 diffèrent par trois acides aminés, il ne semble pas y avoir de différences quant à leur association à TFIIH.

p34 est un polypeptide de 303 acides aminés et d'un poids moléculaire de 34 KDa (Humbert *et al.*, 1994), dont l'homologue chez la levure est Tfb4 (Feaver *et al.*, 1997). Bien que cette protéine possède un motif structural en doigt de zinc de type CX₂CX₄CX₅CX₂C identique à celui de p44, aucune activité de liaison à l'ADN n'a été caractérisée à ce jour. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que p34 est fortement associé à p44 et pourrait avoir un rôle structural en maintenant la cohésion de TFIIH.

1.2- Les sous-unités du CAK

cdk7 est un polypeptide de 346 acides aminés et d'un poids moléculaire de 40 KDa (Tassan *et al.*, 1994) dont l'homologue chez la levure est Kin28 (Simon *et al.*, 1986; Valay *et al.*, 1993; Valay *et al.*, 1995). Initialement clonée chez le Xénope et nommée MO15 (Shuttelworth *et al.*, 1990), cette protéine fut renommée cdk7 après l'identification de son partenaire, la cycline H (Fisher et Morgan, 1994; Makela *et al.*, 1994). Cdk7 possède un domaine de liaison à l'ATP de type GXGKT, une boucle T où se situent les résidus phosphorylés (thréonines 170 et 176) indispensables à son activité, et un site catalytique (figure 26). Pour être active, cdk7 doit nécessairement être associée à la cycline H (Nigg, 1996), grâce au motif PSTAIRE consensuel aux cdk. L'association de MAT1 au complexe binaire permet de passer outre l'activation de cdk7 par la phosphorylation de la boucle T et permet également à cdk7 d'acquiescer pleinement son activité. Cette caractéristique est inédite chez les autres cdk. De même, à l'inverse de la plupart des autres complexes cdk-cycline, l'activité de cdk7 et la composition du CAK ne varient pas au cours du cycle cellulaire (Poon *et al.*, 1994; Tassan *et al.*, 1994).

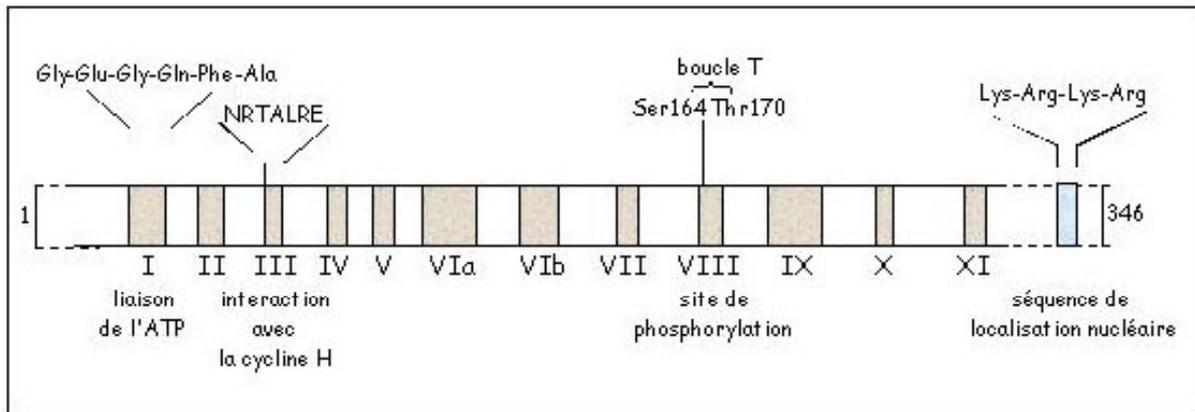


Figure 26 : Organisation schématique de cdk7.

La **cycline H** est une protéine d'un poids moléculaire de 38 kDa, composée de 323 acides aminés (Makela *et al.*, 1994), dont l'homologue chez la levure est Ccl1 (Valay *et al.*, 1993; Svejstrup *et al.*, 1996). La partie centrale de la cycline H contient deux répétitions directes d'une centaine d'acides aminés qui forment deux séries symétriques de 5 hélices α (figure 27). Ce motif constitue la boîte cycline caractéristique de toutes les cyclines (Brown *et al.*, 1995; Jeffrey *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1997). La structure cristallographique de la cycline H a montré une grande similitude avec une autre cycline, la cycline A (Andersen *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996), bien que ces deux protéines soient phylogénétiquement éloignées. La cycline A est ainsi capable de remplacer la cycline H au sein du CAK permettant la phosphorylation *in vitro* d'un oligopeptide mimant le CTD de l'ARN Pol II (Andersen *et al.*, 1997). La cycline H peut être la cible d'une phosphorylation par cdk8, ce qui aurait pour effet d'inhiber l'activité de cdk7 lors de la transcription (Akoulitchev et Reinberg, 1998).

MAT1 (pour Ménage-à-Trois 1) est une protéine de 32 kDa composée de 312 acides aminés (Tassan *et al.*, 1995; Yee *et al.*, 1995). MAT1 possède dans sa partie amino-terminale un motif structural de liaison au zinc de type "RING finger" C₃H₄ ainsi qu'un domaine "coiled-coil" dans sa partie médiane (figure 28). L'homologue de MAT1 chez la levure, appelé Tfb3 ou Rig2 (Faye *et al.*, 1997; Feaver *et al.*, 1997), ne peut pas être dissocié du corps de TFIIH comme MAT1. Tfb3 pourrait alors être le point d'ancrage de TFIID (formé de Ccl1 et de Kin28) au corps de TFIIH (Svejstrup *et al.*, 1996).

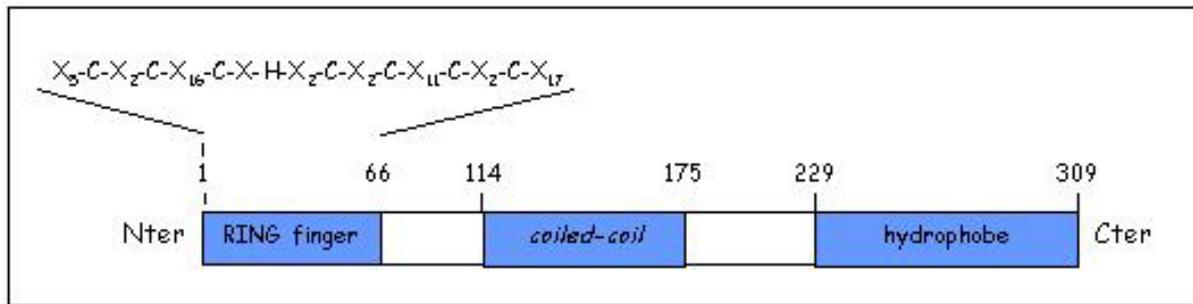


Figure 28 : **Sous-domaines de MAT1.** Le motif RING-finger présente la séquence consensus $C-X_2-C-X_{(9-39)}-C-X_{(1-3)}-H-X_{(2-3)}-C-X_2-C-X_{(4-48)}-C-X_{(2-4)}-C$ (où C représente une cystéine, H une histidine et X un résidu quelconque).

De par son association, MAT1 permet la stabilisation du complexe binaire cdk7-cycline H, l'activation du complexe kinase en absence de la phosphorylation de la boucle T de cdk7 et change la spécificité de substrats de cdk7. En effet, la phosphorylation de l'oligopeptide mimant le CTD de l'ARN Pol II est modulée selon l'association de MAT1 au complexe binaire cdk7-cycline H alors que la phosphorylation par ce dernier de cdk2 reste inchangée que MAT1 soit présent ou non (Rossignol *et al.*, 1997; Yankulov et Bentley, 1997). De plus certains substrats ne sont phosphorylés par cdk7 qu'en présence de MAT1, comme par exemple les facteurs de transcription p53 et Oct1 (Inamoto *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 1997). Ces résultats sont toutefois à relativiser puisque MAT1 semble associé en permanence au complexe cdk7-cycline H, quelle que soit la phase du cycle cellulaire (Tassan *et al.*, 1995). MAT1 est phosphorylé par cdk1-cycline B, qui intervient lors de la mitose. Cette phosphorylation pourrait inhiber l'activité kinase du complexe ternaire, puisqu'il a été montré que dans des cellules en mitose, la phosphorylation par TFIIH du CTD de l'ARN Pol II est inhibée (Long *et al.*, 1998).

1.3- La sous-unité XPD

XPD est un polypeptide de 761 acides aminés et d'un poids moléculaire de 80 KDa, qui contient également sept domaines hélicases. XPD possède une activité hélicase de polarité opposée à celle de XPB (polarité 5'-3'), dépendante de l'ATP (Sung *et al.*, 1993; Schaeffer *et al.*, 1994). L'abolition de son activité enzymatique, par des mutations dans ses domaines ATPase ou hélicases, affecte la viabilité de la levure (Naumovski *et al.*, 1985) mais sans entraîner la mort (Sung *et al.*, 1988), suggérant que l'activité enzymatique de XPD n'est pas indispensable à la transcription. En effet, *in vitro*, les mutations qui abolissent l'activité enzymatique de XPD n'altèrent que modérément l'activité transcriptionnelle de TFIIH (Tirode *et al.*, 1999; Winkler

et al., 2000). Par contre, la délétion totale du gène est létale aussi bien pour la levure que pour la souris (de Boer *et al.*, 1998), suggérant que le processus de transcription requière la présence physique de cette sous-unité de TFIIH. Par contre, sa présence et son activité hélicase sont toutes deux nécessaires à la fonction essentielle de TFIIH dans le processus de réparation de l'ADN (Feaver *et al.*, 1993; Sung *et al.*, 1996).

L'activité hélicase de XPD peut être modulée par son association à la sous-unité p44 : cette association stimule son activité de l'ordre de 10 fois (Coin *et al.*, 1998). Les mutations dans le gène *xpd* qui affectent cette interaction peuvent être à l'origine de maladies génétiques rares comme le *Xeroderma pigmentosum*, la Trichothiodystrophie ou le syndrome de Cockayne (voir plus bas), qui se caractérisent par des déficiences de TFIIH dans ses fonctions de transcription ou de réparation de l'ADN.

2- IMPLICATION DE TFIIH DANS L'APOPTOSE

L'hypothèse selon laquelle TFIIH est impliquée dans le mécanisme d'apoptose est née de la découverte d'une interaction entre cinq sous-unités du facteur TFIIH et le suppresseur de tumeur p53. En effet, XPB, XPD, p62, la cycline H et MAT1 interagissent avec p53 (Xiao *et al.*, 1994). D'une part, ces interactions inhibent les activités enzymatiques de TFIIH. En effet, l'interaction entre p53 et les deux hélicases conduit à une inhibition de leurs activités hélicases (Xiao *et al.*, 1994; Leveillard *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1995) et l'interaction entre p53 et la cycline H résulte en une diminution significative de l'activité kinase de cdk7 (Schneider *et al.*, 1998). D'autre part, cdk7 phosphoryle p53, ce qui a pour effet d'augmenter son activité de liaison à des séquences spécifiques d'ADN (Lu *et al.*, 1997).

Après un choc génotoxique, comme une irradiation UV, on observe une accumulation de p53 (Agarwal *et al.*, 1998), qui coïncide avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 permettant la réparation de l'ADN. Par ailleurs, il n'est pas possible d'induire l'apoptose médiée par p53 dans des cellules dont les gènes *xpb* ou *xpd* sont mutés et la transfection de ces cellules par des vecteurs contenant ces deux gènes leur permet de s'engager dans le processus d'apoptose (Wang *et al.*, 1996, Robles *et al.*, 1999). On peut donc imaginer que TFIIH puisse établir un lien entre le blocage de la transcription par une lésion sur l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire par le biais de la phosphorylation de p53 (Ko *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1997). Cette activation de p53

pourrait par conséquent stimuler l'expression du gène codant pour l'inhibiteur de cdk p21^{CIP1}, menant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire (Ko et Prives, 1996).

3- LA REPARATION DE L'ADN PAR EXCISION-RESYNTHESE DE NUCLEOTIDES (NER)

L'ADN contient l'information nécessaire au développement, au fonctionnement et à la reproduction de chaque organisme. A l'échelle de la cellule, des altérations affectant la structure ou l'intégrité des molécules d'ADN empêchent le bon déroulement de processus comme la transcription ou la réplication. Il peut alors en résulter un arrêt de la croissance cellulaire, la mort cellulaire ou une instabilité génomique. Au niveau de l'organisme, ces lésions ont été impliquées dans de nombreuses maladies génétiques héréditaires, dans la carcinogenèse, dans l'apparition de désordres génétiques ou encore dans le processus de vieillissement.

Les lésions de l'ADN peuvent avoir lieu spontanément à cause de l'instabilité des liens chimiques de l'ADN (p.e. désamination, dépurination) ou peuvent être induites par des irradiations ou par des composés chimiques. Elles peuvent être de différents types, incluant des cassures sur un ou les deux brins d'ADN induites par les rayons X, des pontages inter- ou intra-brin, induits par divers agents chimiques comme le *cis*-platine, ainsi que diverses modifications de bases causées par des agents oxydatifs. Des modifications au niveau des bases de l'ADN peuvent également avoir des causes endogènes, comme les dommages oxydatifs générés par les radicaux libres du métabolisme cellulaire.

Afin d'éviter l'accumulation de dommages sur l'ADN, la cellule dispose d'une batterie de mécanismes de réparation (figure 29). On peut citer en exemple les mécanismes de recombinaison homologue et de jonction des extrémités (*end-joining*), qui réparent les coupures double-brin, le mécanisme d'excision de base (BER, pour *Base Excision Repair*), qui répare les bases modifiées par oxydation, alkylation ou méthylation, et la voie d'excision-resynthèse d'oligonucléotides (NER, pour *Nucleotide Excision Repair*), qui agit principalement sur les lésions qui induisent une forte torsion de la double hélice d'ADN.

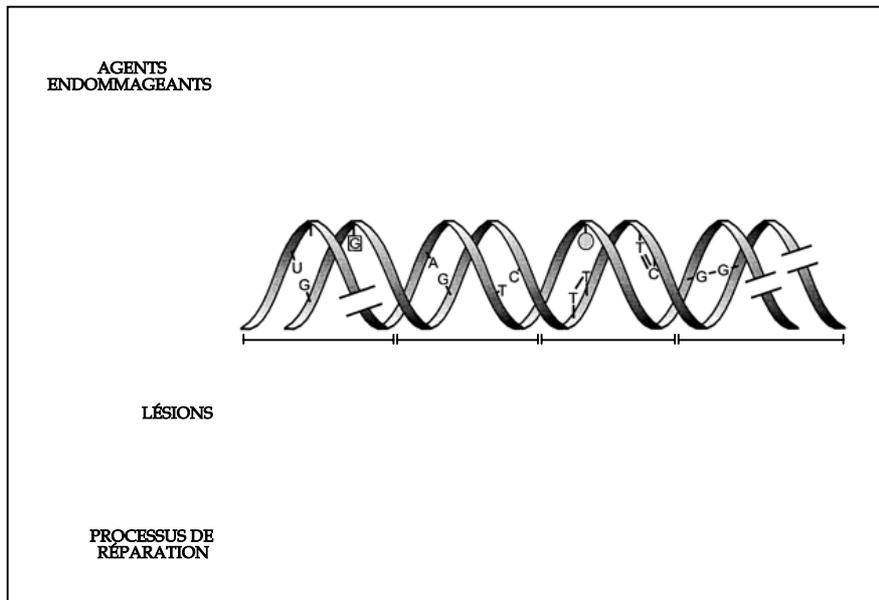


Figure 29 : Les différents mécanismes de réparation des lésions sur l'ADN (d'après de Boer et Hoeijmakers, 2000).

Toutefois, une lésion donnée peut être réparée par différentes voies et plusieurs voies de réparation ont des facteurs en commun (Lindahl *et al.*, 1997). Nous nous attacherons à la voie de réparation par NER. Ce mécanisme est responsable de la réparation d'une grande variété de dommages causés à l'ADN, comme les lésions induites par les rayons UV.

3.1- Le système de réparation par NER

Le processus de la réparation par la NER met en action plus de 20 protéines différentes dans les étapes successives que sont 1) la reconnaissance de la lésion, 2) l'ouverture locale de la double hélice d'ADN, 3) l'incision du brin endommagé de chaque côté de la lésion suivie de 4) son excision complète, et enfin 5) la resynthèse du brin d'ADN. Ce mécanisme a été élucidé grâce aux études menées chez la levure (Friedberg *et al.*, 1995) et la reconstitution de la réaction *in vitro*, qui a permis la caractérisation de six facteurs, dont plusieurs sont composés de multiples sous-unités, qui mènent à l'excision du fragment d'ADN endommagé (Aboussekhra *et al.*, 1995; Mu *et al.*, 1995). Ces protéines sont XPA, l'hétérotrimère RPA, le complexe XPC-hHR23B, le complexe TFIIH ainsi que les deux endonucléases : XPG et l'hétérodimère ERCC1-XPF. Une fois la lésion éliminée, la brèche ainsi créée est ensuite comblée par une ADN polymérase, aidée des facteurs RPC et PCNA, et l'ADN nouvellement synthétisé est scellé par une ADN ligase.

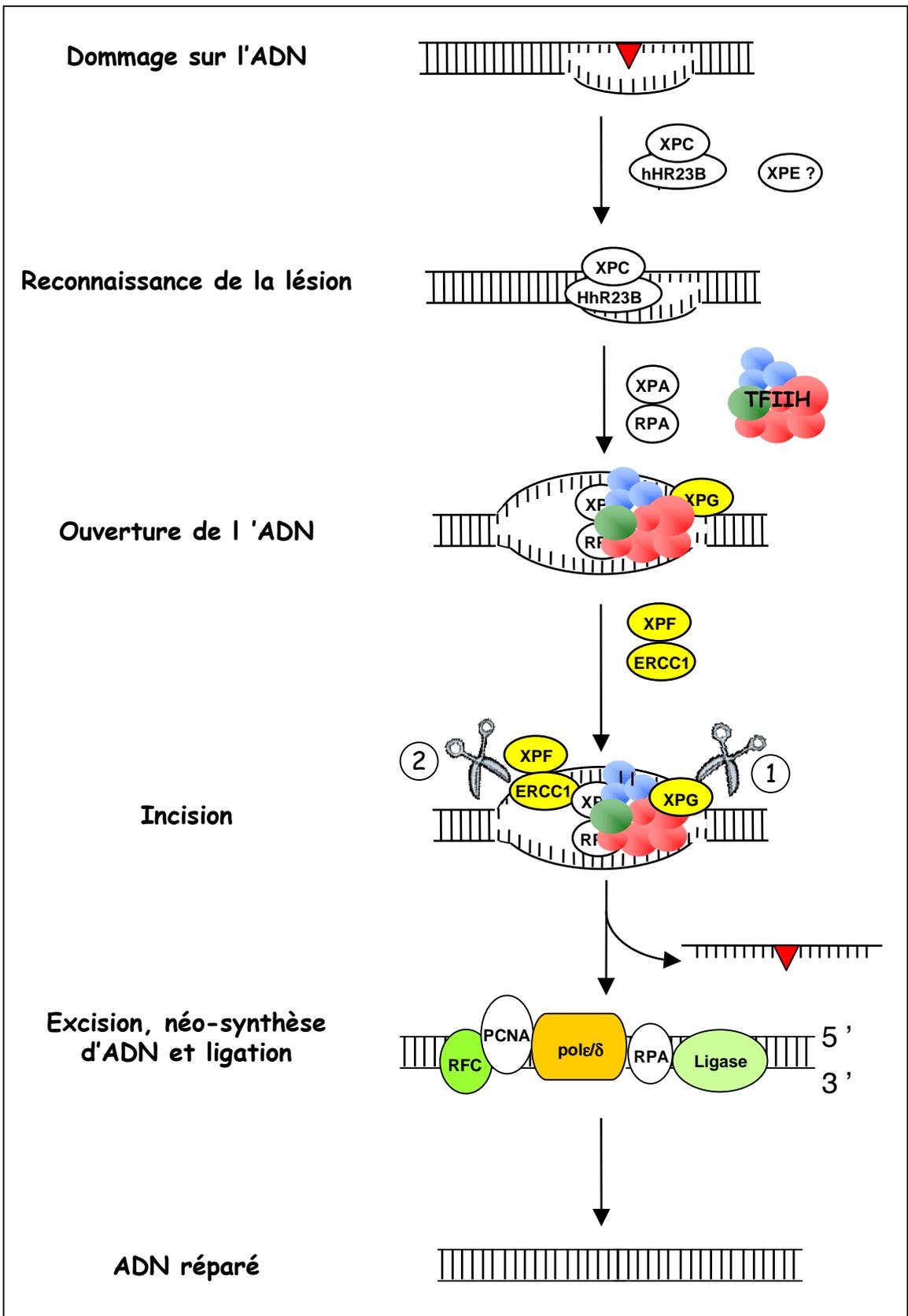


Figure 30 : La voie de réparation par excision-resynthèse de nucléotides (NER).

La réparation par NER implique dans un premier temps à la fois la reconnaissance du site de la lésion et la distinction entre le brin endommagé et le brin non endommagé (figure 30). Ces fonctions sont dévolues au complexe XPC/hHR23B (Sugasawa *et al.*, 1998), à XPA et à RPA (Wakasugi et Sancar, 1999). XPC/hHR23B et XPA reconnaissent la distorsion de l'ADN (et non les détails de la structure modifiée) et lient l'ADN simple brin, certainement en prenant appui sur des interactions hydrophobes au niveau des bases non appariées. Le complexe XPC-hHR23B modifie localement la conformation du duplex d'ADN autour de la lésion (Sugasawa *et al.*, 1998), ce qui pourrait permettre l'entrée en jeu des autres facteurs de la réparation. La protéine XPE (appelée dans un premier temps UV-DDB, pour *UV-Damaged DNA Binding*), est un facteur non indispensable pour la réaction de NER *in vitro* (Hwang et Chu, 1993, Araujo *et al.*, 2000), mais pourrait participer à la reconnaissance de la lésion dans un contexte chromatinien (Hwang *et al.*, 1999). La reconnaissance du brin endommagé semble être attribuée à RPA dans la mesure où ce facteur se fixe préférentiellement sur le brin non endommagé (de Laat *et al.*, 1998). Bien que RPA ne reconnaisse pas les lésions elles-mêmes, celui-ci a une forte affinité pour les régions simple-brin issue de la torsion de la double hélice induite par la lésion. RPA se fixe sur l'ADN de manière séquentielle : il interagit dans un premier temps du côté de l'extrémité 5' du brin d'ADN, sur une longueur de 8 à 10 nucléotides puis, dans un deuxième temps, la molécule s'allonge dans la direction 3', permettant son interaction avec l'ADN sur une région plus étendue, d'une trentaine de nucléotides.

La réparation nécessite ensuite la formation d'un intermédiaire ADN complètement ouvert sur 32 nucléotides autour de la lésion. Cette ouverture dépend de l'hydrolyse d'ATP (Evans *et al.*, 1997) et requiert la présence de XPB et XPD, les deux hélicases de polarités opposées de TFIIH (voir plus bas). Cette ouverture nécessite également la participation de XPA, RPA, XPC-hHR23B et XPG, bien que l'activité catalytique de XPG ne soit pas requise (Evans *et al.*, 1997; Mu *et al.*, 1997; Wakasugi *et al.*, 1997; Constantinou *et al.*, 1999). A cette étape, de par ces multiples associations, sans doute séquentielles (Saijo *et al.*, 1996), avec RPA (Li *et al.*, 1995), ERCC1 (Li *et al.*, 1994; Park et Sancar, 1994; Li *et al.*, 1995), XPF (Bessho *et al.*, 1997) et TFIIH (Park *et al.*, 1995; Nocentini *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998), XPA peut être considéré comme le chef d'orchestre de la réaction puisqu'il pourrait positionner correctement les différents acteurs de la réparation autour de la lésion.

La structure ouverte est ensuite reconnue par deux endonucléases à spécificité de structure, capables de couper une variété de substrats artificiels tels que des bulles ou des épingles à cheveux : XPG et ERCC1-XPF. L'incision par XPG, qui est certainement recruté par

l'intermédiaire de TFIIH (Iyer *et al.*, 1996), s'effectue toujours sur un seul brin du duplex ADN, du côté 3' de la jonction avec le simple brin (Lieber *et al.*, 1997). La présence de XPG est également indispensable à la formation du complexe complètement ouvert, indiquant un rôle au cœur même de la réaction (Evans *et al.*, 1997 et Mu *et al.*, 1997). L'incision par ERCC1-XPF, en 5' de la lésion, s'effectue après que l'incision par XPG en 3' de la lésion ait eu lieu (O'Donovan *et al.*, 1994 et Mu *et al.*, 1996) et se fait toujours sur un seul brin du duplex ADN, en 5' de la jonction avec l'ADN simple brin (Sijbers *et al.*, 1996). La double incision libère un oligonucléotide de 24 à 32 résidus contenant la lésion (Huang *et al.*, 1992 et Moggs *et al.*, 1996). RPA semble coordonner ces deux nucléases : lorsque RPA est lié au brin non endommagé, la partie orientée du côté 3' de celui-ci interagit avec ERCC1-XPF alors que sa partie orientée du côté 5' s'associe à XPG (He *et al.*, 1995; de Laat *et al.*, 1998). En se fixant préférentiellement sur le brin non endommagé, RPA pourrait donc induire une spécificité de brin à ERCC1-XPF en stimulant l'incision du brin endommagé et en inhibant celle du brin non endommagé.

Tous les facteurs de la NER se dissocient enfin de la bulle de réparation, à l'exception de RPA qui stabilise la région simple brin. La brèche, créée par l'excision du fragment d'ADN contenant la lésion, est alors comblée par l'ADN polymérase ζ ou η (Budd et Campbell, 1995) aidée de RPA, du facteur de réplication C (RFC, pour *Replication Factor C*) ainsi que de l'antigène nucléaire des cellules prolifératives (PCNA, pour *Proliferative Cell Nuclear Antigen*) (Shivji *et al.*, 1995). RFC se fixe préférentiellement à l'extrémité 5' de l'ADN et stimule l'association de PCNA. PCNA est un facteur impliqué dans la réparation mais également dans la réplication où il augmente la processivité des polymérases, en partenariat avec RFC. Ce complexe permet le recrutement de la polymérase (Wood et Shivji, 1997). L'ADN nouvellement synthétisé est finalement scellé par une ADN ligase, probablement l'ADN ligase I puisqu'une mutation dans celle-ci peut conduire à un phénotype de sensibilité aux rayons UV (Barnes *et al.*, 1992).

3.1.2- NER couplée à la transcription

Le mécanisme réactionnel décrit ci-dessus est désigné sous le nom de réparation globale du génome par NER (GG-NER, pour *Global Genome NER*) car ce processus élimine les lésions de l'ADN sur la totalité du génome. En revanche, les lésions situées sur le brin codant des gènes activement transcrits sont réparées de manière préférentielle par une "sous-voie" de la réparation par NER, dite réparation couplée à la transcription (TC-NER, pour *Transcription Coupled NER*) (Bohr *et al.*, 1985 et Mellon *et al.*, 1987). Les deux processus sont identiques

exceptés pour la reconnaissance initiale du dommage : dans le cas de la GG-NER, celle-ci fait intervenir XPC/hHR23B alors que, lors de la TC-NER, il semble que ce soit l'ARN Pol II elle-même qui, lorsqu'elle est bloquée au niveau d'une lésion, soit le signal de reconnaissance du dommage et recrute la machinerie de NER (Mu et Sancar, 1997).

Chez la bactérie, le produit du gène *mfd* (TRCF, pour *Transcription-Repair Coupling Factor*) reconnaît l'ARN Pol II arrêtée au niveau d'une lésion, la déplace et recrute la machinerie de réparation (Selby *et al.*, 1991; Selby et Sancar, 1993). Chez les eucaryotes, bien que le système semble plus complexe, une fonction similaire à TRCF pourrait être portée par CSB, une protéine dont des mutations dans le gène sont responsables du syndrome de Cockayne (voir page 75). CSB possède en effet des homologies structurales avec TRCF, puisque tous deux possèdent une activité ATPase (Guzder *et al.*, 1996) et des motifs hélicases (Troelstra *et al.*, 1992; van Gool *et al.*, 1994), et CSB semble voyager avec l'ARN Pol II lors de l'élongation de la transcription (Tantin *et al.*, 1998). Cependant, CSB ne possède pas d'activité hélicase (Selby et Sancar, 1997) et n'est pas capable de déplacer l'ARN Pol II (van Hoffen *et al.*, 1999).

Le devenir d'une ARN Pol II arrêtée au niveau d'une lésion reste un mystère. En effet, des données contradictoires montrent que 1) une ARN Pol II arrêtée au niveau d'une lésion ne gêne pas la réparation (Selby *et al.*, 1997) et constitue un complexe très stable (LePage *et al.*, 2000), 2) l'ARN Pol II recule et coupe la partie 3' naissante de l'ARN (Donahue *et al.*, 1994) et (3) que la polymérase est écartée de la lésion indépendamment de CSA ou CSB (Selby *et al.*, 1997). La seule certitude semble venir du fait que CSB seule n'est pas capable de déplacer la polymérase dans un système reconstitué *in vitro* (Selby et Sancar, 1997) et que les protéines spécifiques à la TCR ont deux fonctions : déplacer la polymérase de la lésion et recruter les facteurs de réparation. Il faut enfin noter que CSA et CSB pourrait avoir un rôle dans l'ubiquitination de l'ARN Pol II après exposition à des radiations U.V. ou au *cis*-platine (Bregman *et al.*, 1996), suggérant un rôle probable de cette ubiquitination dans la TCR en favorisant peut être le recrutement des autres facteurs de la réparation.

3.2- Implications de TFIIH dans la NER

L'étape de reconnaissance-incision de la réparation par NER est dépendante de l'hydrolyse d'ATP (Evans *et al.*, 1997). Le seul facteur impliqué dans cette étape et ayant des activités enzymatiques dépendantes de l'ATP est le facteur de transcription/réparation TFIIH.

Parmi les différentes sous-unités de ce complexe ayant une activité catalytique, les hélicases XPB et XPD sont d'un intérêt particulier puisque des mutations dans leur séquence sont responsables de maladies génétiques rares, longtemps associées à un seul défaut de réparation de l'ADN par NER (voir plus bas). Les activités hélicases de XPB (Guzder *et al.*, 1994; Hwang *et al.*, 1996; Sung *et al.*, 1996) et XPD (Guzder *et al.*, 1995; Sung *et al.*, 1996) sont responsables de l'ouverture complète de l'ADN de part et d'autre de la lésion.

Le rôle de TFIIH dans la réaction de NER ne semble pas se limiter à une simple ouverture de l'ADN car l'utilisation d'un substrat ADN pré-ouvert ne dispense pas la réaction d'excision de la présence de TFIIH (Mu *et al.*, 1997). Cette fonction supplémentaire de TFIIH pourrait faire intervenir ses interactions avec XPA (Park *et al.*, 1995), XPC (Drapkin *et al.*, 1994), XPG (Iyer *et al.*, 1996) et XPF-ERCC1 (Evans *et al.*, 1997). En effet, l'interaction de TFIIH avec XPG et XPF-ERCC1, dont TFIIH stimule l'activité, semble indiquer que TFIIH pourrait également avoir un rôle à jouer dans le bon positionnement des deux endonucléases. De plus, des altérations inactivant l'activité enzymatique de XPD ne permettent plus de détecter les incisions ni en 3' ni en 5' de la lésion dans des tests *in vitro* (Winkler *et al.*, 2000). Par ailleurs, des expériences menées chez la levure ont montré que l'homologue de XPD, RAD3, présente une affinité pour les lésions induites sur l'ADN par les UV qui dépend de la superhélicité de l'ADN (Sung *et al.*, 1994), ce qui pourrait suggérer un rôle supplémentaire de TFIIH lors de la reconnaissance de la lésion. Enfin, L'interaction de TFIIH et XPA est renforcée lorsque ce dernier est déjà lié à l'ADN au niveau de la lésion (Nocentini *et al.*, 1997).

Bien que, chez l'Homme, seules les sous-unités XPB et XPD semblent avoir une fonction catalytique dans la réaction de réparation, chez la levure, d'autres sous-unités ont été activement impliquées comme Tfb1 (l'homologue de p62) (Matsui *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995), Ssl1 (l'homologue de p44) (Yoon *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995) et Tfb2 (l'homologue de p52) (Feaver *et al.*, 1997). En effet, des souches de levure mutées dans ces gènes présentent une sensibilité accrue aux U.V. Quant aux trois sous-unités qui composent le sous-complexe CAK de TFIIH, leur rôle dans la réaction de réparation est sujet à caution. En effet, chez la levure, ce complexe kinase n'est pas nécessaire à la NER (Svejstrup *et al.*, 1995; Sung *et al.*, 1996) alors que, chez l'Homme, il semble inhiber la réaction de réparation (Araujo *et al.*, 2000).

Enfin, l'appartenance de TFIIH à la fois aux processus de transcription et de réparation de l'ADN fait de lui un bon candidat pour la coordination de la réparation couplée à la transcription. Cependant, puisque TFIIH ne voyage pas avec l'ARN Pol II lors de l'élongation de la transcription et doit être recruté (avec les autres facteurs de réparation) au niveau de l'ARN

Pol II arrêtée, ce couplage pourrait requérir également CSB qui, elle, appartient au complexe d'élongation (Tantin *et al.*, 1998).

3.3- Syndromes liés à une déficience de la NER

Au vue de l'importance des mécanismes de réparation de l'ADN, il était prévisible que des mutations dans les gènes codant pour les protéines intervenant dans ces processus puissent être responsables de maladies génétiques plus ou moins sévères. Il existe trois maladies autosomiques récessives rares associées à la réparation par NER : le *Xeroderma pigmentosum*, le syndrome de Cockayne et la Trichothiodystrophie.

3.3.1- Le *Xeroderma pigmentosum*

La première description de cette maladie fut rapportée en 1863 par Kaposi qui lui donna un nom en relation avec les symptômes identifiés, comme l'assèchement (*xeros*) de la peau (*dermos*) et une pigmentation anormale de la peau exposée au soleil (*pigmentosum*). Outre ces premiers symptômes, ces patients présentent également une photosensibilité accrue au rayon UV (Bootsma *et al.*, 1998), une prédisposition aux cancers de la peau (Chu, 1997) ou encore une dégénérescence neurologique (Bootsma *et al.*, 1995) (table 7). Il existe une grande hétérogénéité de symptômes chez les patients atteints de *Xeroderma pigmentosum* (XP). Par exemple, la forme la plus sévère est caractérisée par un nanisme, des problèmes de développement sexuel et une microcéphalie associée à une détérioration mentale progressive (DeSanctis et Cacchione, 1932), alors que d'autres patients ne présentent pas de retard de croissance et ne développent pas ou que tardivement des problèmes neurologiques.

La fréquence d'apparition de cette maladie est d'environ un pour un million. L'âge moyen d'apparition des symptômes est de 2 ans, période au cours de laquelle les premiers carcinomes (et, plus rarement, des mélanomes) peuvent apparaître. L'espérance de vie d'un malade souffrant de XP est de 30 ans. La plupart des patients meurent de néoplasie (développement de néoplasmes malins). Durant leur vie, ils sont exposés à des risques 2000 fois supérieurs par rapport au reste de la population de développer des cancers cutanés (Cleaver et Kraemer, 1989). Ils souffrent également de graves altérations oculaires et sont exposés à un risque de 10 à 20 fois supérieur à la moyenne de développer des cancers de l'appareil digestif avant l'âge de 20 ans (Kraemer *et al.*, 1994). La description dans la littérature de plus de 800 cas cliniques (Cleaver et Kraemer,

1995) a montré qu'outre les rayonnements UV, la toxicité des carcinogènes chimiques (dérivés du benzène dans les cigarettes, produits de la pyrolyse du tryptophane dans les nourritures carbonisées par exemple) est elle aussi dramatiquement augmentée chez ces patients.

Symptômes	Syndromes			
	XP	XP/CS	CS	TTD
Cutanés				
photosensibilité	++	++	+	+/-
anomalies pigmentaires	++	+	-	-
Cheveux et ongles cassants	-	-	-	+
ichtyose	-	-	-	+
cancer de la peau	++	+	-	-
Développementaux				
retard de croissance	-	+	+	+
immaturité sexuelle	-	+	+	+
Neurologiques				
neurodégénérescence	+	+	+	-
neurodysmyélination	-	+	+	+
dégénération mentale	+/-	+	+	+
ataxie	+/-	+	+	+/-
microcéphalie	+/-	+	+	+/-
Cellulaires				
UDS (% contrôle)	5-50	5-50	normale	5-50
sensibilité aux UV	++	++	+	+/-

Table 7 : **Symptômes associés aux syndromes XP, TTD et CS** (UDS : Unscheduled DNA Synthesis).

Des expériences de complémentation dans des cellules de patients XP ont conduit à la caractérisation de 8 groupes de complémentation (de XP-A à XP-G), correspondant aux facteurs de la réaction de NER (XPA à XPG) plus un groupe appelé XP-variant (XPV) dont le produit du gène est impliqué dans la réparation post-réplivative (Svoboda *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999). Aujourd'hui, tous les gènes corrigeant la déficience des 8 groupes ont été clonés. Le défaut de réparation ainsi que la sensibilité aux UV et aux différents agents génotoxiques varient selon le groupe de complémentation (table 8). Par exemple, les formes les plus sévères du XP sont associées à XPA alors que les cellules les moins affectées appartiennent au groupe XP-E. De même, dans les cellules XP-C, la réparation se fait de manière normale sur les gènes activement transcrits (Tyrrell et Amdruz, 1987) alors que la TCR et la GGR sont affectées de manière identique dans les autres groupes de complémentation.

Groupes de complémentation	Fréquence relative	Réparation (NER)			Clinique			Syndromes associés
		GGR	TCR	UDS	Sensibilité aux UV	Cancers cutanés	Anomalies neurologiques	
XP-A	élevée	-	-	< 5%	+++	+	++ ^a	XP
XP-B	très rare	-	-	10-40%	++	+/-	++/+ ^b	XP/CS, TTD
XP-C	élevée	-	+	15-30%	+	+	-	XP
XP-D	intermédiaire	-	-	15-30%	++	+/-	++/± ^b	XP, XP/CS, TTD
XP-E	rare	-	?	□ 50%	±	+/-	-	XP
XP-F	rare	-	-	15-30%	+	+/-	-/± ^a	XP
XP-G	rare	-	-	2-25%	++	+/-	++/+ ^b	XP, XP/CS
CS-A	intermédiaire	+	-	100%	+	-	++ ^b	CS
CS-B	élevée	+	-	100%	+	-	++ ^b	CS
TTD-A	très rare	-	-	10%	+	-	+ ^b	TTD

GGR: réparation globale du génome ; TCR: réparation couplée à la transcription ; a: neurodégénérescence b: démyélinisation ; UDS: Unscheduled DNA synthesis (synthèse d'ADN non programmée)

Table 8 : Les différents groupes de complémentation des maladies associées à un défaut de réparation de l'ADN par NER.

Bien que les patients XP-V présente un phénotype similaire aux autres XP, ce groupe de complémentation est un cas particulier puisqu'il n'implique pas un défaut d'élimination de la lésion elle-même, mais de la re-synthèse de l'ADN qui la suit. En effet, dans les cellules XP-V, c'est la fonction de l'ADN polymérase η qui est altérée, la plupart du temps parce que la protéine est tronquée (Masutani *et al.*, 1999a; Masutani *et al.*, 1999b). Cette polymérase, au même titre que l'ADN polymérase ζ est capable de répliquer l'ADN "au travers" d'une lésion (McDonald *et al.*, 1997, Johnson *et al.*, 1999). Ce processus n'est pas générateur de mutations lorsqu'il fait intervenir la polymérase η (contrairement à la polymérase ζ) et constitue donc un moyen de réparation de l'ADN post-répliatif (McDonald *et al.*, 1997 et Baynton *et al.*, 1998). Le fait que ce soit la polymérase η qui soit altérée dans les cellules XP-V est donc en accord avec le fait que des mutations s'accumulent dans ces cellules, car seule la synthèse génératrice de lésion y est encore fonctionnelle (Masutani, *et al.*, 1999).

Il existe quelques patients ayant une mutation dans le gène *XPG* ne présentant pas d'anomalies neurologiques. L'apparition de ces anomalies chez la plupart des patients XP-G pourrait montrer l'appartenance de XPG à différents mécanismes de réparation. Par exemple, la dégénérescence neurologique observée chez ces patients pourrait trouver son origine dans la mauvaise réparation des dommages oxydatifs endogènes, conduisant à un vieillissement accéléré puis à la mort des neurones (Reardon *et al.*, 1997).

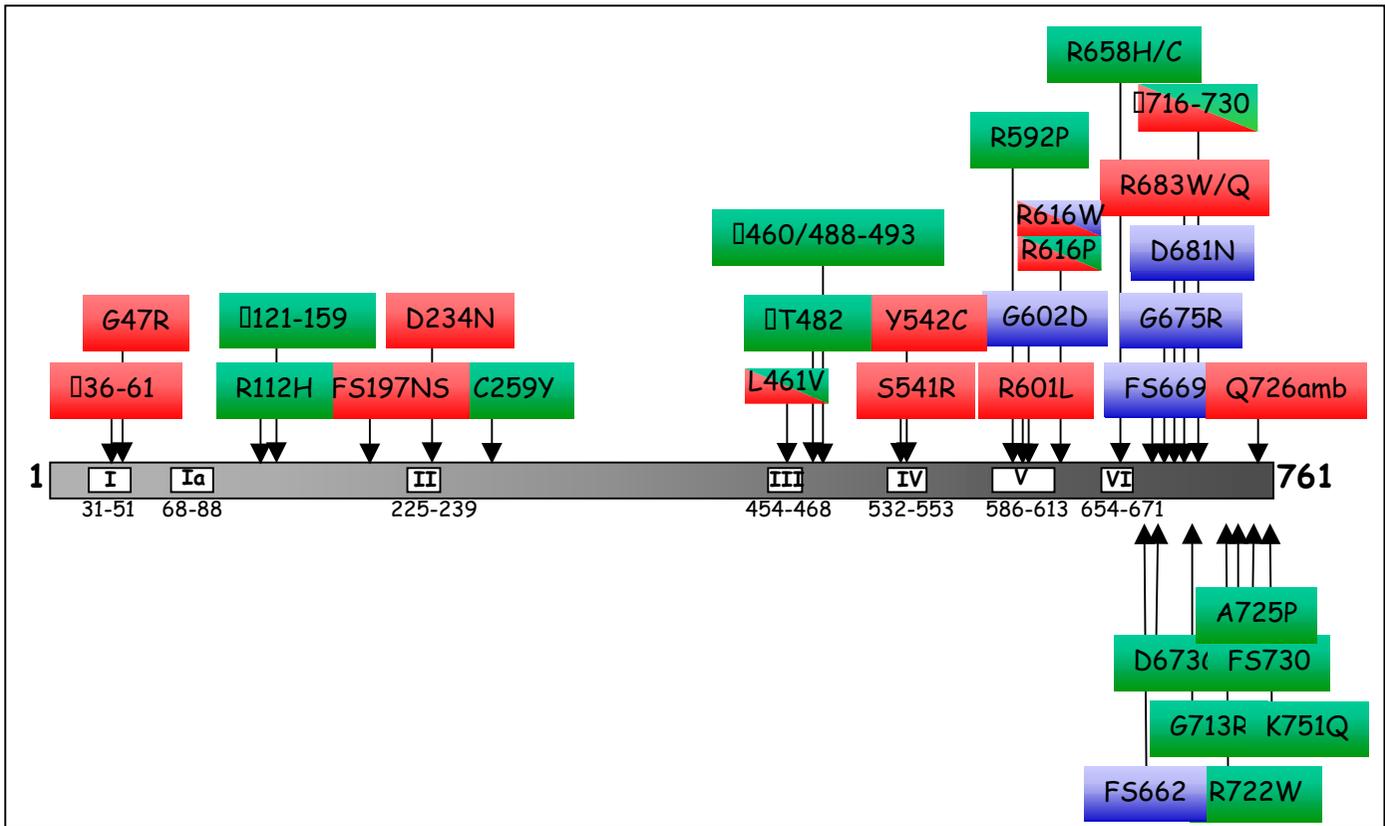


Figure 31 : Mutations recensées dans la protéine XPD chez les patients XP (en rouge), TTD (en vert) ou XP/CS (en bleu). Les boîtes blanches représentent les sept domaines hélicase de la protéine. Δ = délétion, FS : décalage du cadre de lecture (frame-shift), NS = mutation non-sens.

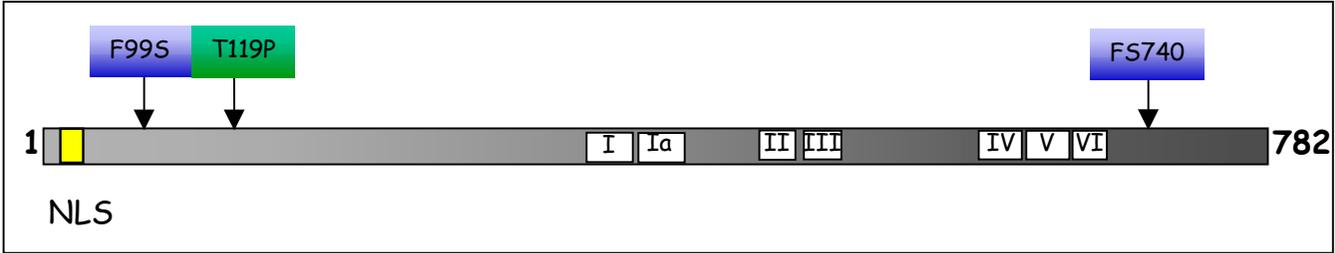


Figure 32 : Mutations recensées dans la protéine XPB chez les patients XP/CS (en bleu) ou TTD (en vert). Les boîtes blanches représentent les sept domaines hélicase de la protéine. NLS : signal de localisation nucléaire, Δ = délétion, FS : décalage du cadre de lecture (frame-shift).

L'appartenance de XPB et XPD à TFIIH suggère que certains symptômes ne soient pas dus uniquement à un défaut de réparation. Bien qu'une délétion partielle ou totale du gène *xpd* entraîne la mort de la cellule (de Boer *et al.*, 1998), il existe des patients portant différentes mutations dans ce gène (figure 31). Le très faible nombre de patients XP-B rend certainement compte de la létalité des mutations dans ce gène, probablement à cause de son action indispensable à la réaction de transcription (figure 32). De plus, les groupes XP-B et XP-D sont caractérisés par une grande hétérogénéité puisque des patients appartenant à ces deux groupes peuvent, en plus des symptômes XP, présenter les symptômes de deux autres maladies, le syndrome de Cockayne et la Trichothiodystrophie.

3.3.2- Le syndrome de Cockayne

Ce syndrome, décrit pour la première fois en 1936 par Cockayne, est caractérisé par un retard de croissance, un retard mental, des troubles neurologiques, oculaires (cataracte, rétinopathie pigmentaire) et auditifs (surdité progressive) ainsi qu'une microcéphalie associée à une démyélinisation (Cockayne, 1936 et Friedberg, 1996). Les patients atteints du syndrome de Cockayne (CS) présentent également des anomalies du squelette, comme un faciès en "tête d'oiseau" (*bird-like face*), des caries et une ostéoporose chez les patients les plus âgés. La durée de vie moyenne des patients est de 12 ans, bien que certains patients dépassent la quarantaine. La cause de la mort est souvent en relation avec une pneumonie ou des troubles respiratoires (Nance et Berry, 1992). Bien que les patients CS soient photosensibles, ils ne présentent ni d'anomalies de pigmentation, ni de prédisposition aux cancers cutanés.

Les patients atteints de CS présentent un défaut de la réparation couplée à la transcription (TCR), alors que la réparation globale du génome est normale (Venema *et al.*, 1990). Suite à l'exposition à des agents endommageant l'ADN, les cellules de patients CS recouvrent en effet plus lentement leur activité de transcription (van Oosterwijk *et al.*, 1996 et Dianov *et al.*, 1997). Cinq protéines sont impliquées dans l'apparition de cette maladie : CSA, CSB, XPB, XPD et XPG (Vermeulen *et al.*, 1993; Vermeulen *et al.*, 1994; Broughton *et al.*, 1995; Nouspikel *et al.*, 1997; Okinaka *et al.*, 1997). Des mutations dans les gènes *CSA* et *CSB* sont responsables du syndrome de Cockayne dit "pur", alors que des mutations dans *xpb*, *xpd* ou *xpg* sont à l'origine d'un syndrome qui combine les phénotypes du XP et du CS (appelé XP/CS).

La protéine CSB fait partie du complexe d'élongation de l'ARN Pol II (Tantin *et al.*, 1997; van Gool *et al.*, 1997) et semble stimuler de l'élongation du transcrit (Selby et Sancar, 1997). Ni

CSB ni CSA ne sont impliquées dans la réparation des lésions présentes dans les premiers nucléotides après le site d'initiation de la transcription, confirmant leur rôle dans la réparation des lésions au cours de l'élongation de la transcription (Tijsterman *et al.*, 1997; Tu *et al.*, 1997; Tu *et al.*, 1998). L'absence de développement de cancers de la peau chez les patients CS pourrait être due à l'élimination sélective par apoptose des cellules contenant une lésion. En effet, certaines cellules CS-B présentent une réponse apoptotique élevée suite à une irradiation aux UV (Balajee *et al.*, 2000).

Le fait que les sous-unités XPB et XPD de TFIIH puissent également être à l'origine du syndrome de Cockayne renforce l'idée de son implication dans la TCR. De plus, TFIIH interagit à la fois avec CSA (Henning *et al.*, 1995) et CSB (Iyer *et al.*, 1996). Dans des cellules XP/CS du groupe de complémentation XPD (XP-D/CS), le traitement aux UV induit des coupures de l'ADN à travers tout le génome (Berneburg *et al.*, 2000). De manière surprenante, ces coupures ne sont pas corrélées à la réparation par NER. En effet, lorsqu'un ADN plasmidique endommagé est introduit dans une cellule XP-D/CS, on n'observe pas de coupure au niveau du plasmide mais à travers tout l'ADN génomique. Il se pourrait donc que le signal dû au dommage forcerait TFIIH à recruter la machinerie de réparation à l'endroit où TFIIH se trouve, c'est-à-dire majoritairement au niveau des sites d'initiation de la transcription. Ainsi, les bulles de transcription serviraient de substrats aux activités endonucléases de la machinerie de réparation, ce qui conduirait à la coupure de ces sites. Ces résultats pourraient être mis en relation avec des expériences menées chez la levure, où des mutations dans RAD3 (l'homologue de XPD) perturbent la stabilité du génome en stimulant la recombinaison de répétitions courtes de l'ADN (Maines *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000).

3.3.3- La Trichothiodystrophie

La Trichothiodystrophie (TTD), au mode de transmission autosomique récessif, fut décrite pour la première fois par Pollitt en 1968 (Pollitt *et al.*, 1968). La caractéristique la plus marquante de cette maladie est des cheveux cassants formant des nœuds ou ayant des extrémités en brosse. Les analyses biochimiques ont montré que les cheveux des patients TTD avaient un contenu réduit en soufre dû à un déficit en protéines de faible poids moléculaire riches en soufre (Gillepsie et Marshall, 1983). Outre les phanères cassants, les patients TTD sont atteints de microcéphalie, de retard mental, de troubles neurologiques associés à une hypomyélinisation, d'ichtyose, d'hypogonadisme et de nanisme cachectique. La moitié des

patients TTD présente également une photosensibilité aux UV, mais dans aucun cas une prédisposition aux cancers de la peau.

Les cellules TTD présentent un taux de réparation résiduelle moyen situé entre 10 et 25% de l'activité normale. Il existe trois groupes de complémentation. Deux d'entre eux ont pour origine les hélicases XPB et XPD du complexe TFIIH (Stefanini *et al.*, 1986 et Vermeulen *et al.*, 1994). Dans le troisième groupe de complémentation, la microinjection de l'ADNc codant pour chacune des sous-unités de TFIIH ne rétablit pas une activité de réparation normale (Vermeulen *et al.*, 1994), suggérant qu'aucune des sous-unités de TFIIH n'est affectée dans ce groupe, appelé TTD-A. Cependant, la microinjection d'une fraction protéique purifiée de TFIIH est capable de corriger les défauts de réparation (Vermeulen *et al.*, 1994). Il a récemment été montré qu'il existe une baisse de la concentration cellulaire en TFIIH dans les cellules TTD-A (Vermeulen *et al.*, 2000). Il se pourrait donc que la protéine altérée dans le groupe TTD-A soit un facteur, appelé provisoirement IIHSF (*TFIIH-stabilizing assembly factor*), qui stabiliserait et protégerait TFIIH contre sa dégradation (Bergmann et Egly, 2001). Ce facteur TTDA n'a pas encore été caractérisé à ce jour.

Il est intéressant de noter que des souris possédant une mutation dans *xpd* mimant une mutation retrouvée chez des patients TTD, présentent une prédisposition au développement de cancers de la peau, contrairement à ce que l'on voit chez les patients (de Boer *et al.*, 1999). Une hypothèse serait que les enfants atteints de TTD seraient "protégés" du développement de cancers cutanés par une hyperkératination de la peau, les protégeant des rayons U.V.

Une étude récente a permis de montrer que le phénotype "absence de cancers cutanés" des TTD est indépendant des défauts dans le mécanisme de réparation (Berneburg *et al.*, 2000). En effet, il existe un patient dont les cellules présentent une hypersensibilité aux UV supérieure aux autres TTD, et équivalente à celle des cellules XP, alors que le patient présente les mêmes symptômes que les autres malades TTD.

4- FONCTIONS DU SOUS-COMPLEXE CAK DE TFIIH

PUBLICATION 1 : Cette revue, intitulée "CAK in TFIIH", constitue le 8^{ème} chapitre du livre "*The CDK-Activating Kinase (CAK)*" publié par Landes Bioscience (éditeur : Pilipp Kaldis). Elle

résume et discute les différentes implications du sous-complexe *CAK* de TFIIH dans les différentes fonctions de ce complexe, lors de la régulation de la transcription ou la réparation de l'ADN par la voie de NER.

"CDK-activating kinases (CAK)"

Chapter 8 : "CAK in TFIIF"

Anne KERIEL and Jean-Marc EGLY

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS/INSERM/Université Louis Pasteur
BP 163, 67404 Illkirch Cedex, France.
(00-33)-3-8865-3447
e-mail: egly@igbmc.u-strasbg.fr

Content :

Introduction

1- CAK as part of TFIIF

2- The role of CAK in DNA repair

3- Transcription Regulation by CAK

- Phosphorylation of basal transcription factors regulates transcription
- Regulation of transcription and RNA polymerase II CTD phosphorylation.
- CAK is involved in Activated Transcription.

Conclusions and perspectives.

Abbreviations

Cdk(s) : cyclin-dependent kinase(s); CAK : cdk-activating kinase; NER : nucleotide excision repair; RNA polymerase II : RNA pol II; CTD : carboxy-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II; GTF(s) : general transcription factors; TFIIF : transcription factor of class II genes

Introduction

TFIIH was originally identified as a basal transcription factor involved in protein-coding genes transcription ^{1, 2}. The systematic cloning of its nine subunits revealed however that TFIIH also participates in two other fundamental cell processes : cell cycle regulation and repair of damaged DNA. Because TFIIH is involved in more than one cellular process, mutations in some of its subunits can lead to human syndromes : *Xeroderma pigmentosum*, Trichothiodystrophy and Cockayne syndrome ^{3, 4}. These genetic disorders are characterized by complex phenotypes with large ranges of pleiotropic symptoms, including UV-light sensitivity, cancer susceptibilities and developmental abnormalities.

In this study, we will describe the function(s) of a ternary subcomplex of TFIIH, named « CAK » (cdk-activating kinase) because of its ability to activate cdks by phosphorylation, keeping in mind that TFIIH possesses additional enzymatic activities involved in both RNA synthesis and DNA repair.

1- CAK as part of TFIIH

The mammalian TFIIH is a multiprotein complex of nine subunits, ranging from 89 kDa to 32 kDa (fig 8.1), that can be resolved in two main functional subcomplexes : the core-TFIIH, composed of five subunits (XPB, p62, p52, p44 and p34), and the CAK (cdk-activating kinase), composed of CDK7, cyclin H and MAT1 ^{5, 6}. The remaining XPD subunit can be found either associated with the core or with the kinase complex ^{7, 8} and is believed to anchor the CAK to the core-TFIIH ⁹. TFIIH possesses three intrinsic enzymatic activities : the cyclin-dependent kinase CDK7 and two ATPase/helicases of opposite polarities attributed to the XPB and XPD subunits. The two helicases are responsible for catalysing the DNA opening that takes place either around the initiation site, during transcription, or around a lesion, to allow DNA repair ^{10, 11, 12} (cf. paragraph 2). The kinase activity of CDK7 is directed towards the cyclin-dependent kinases (cdks), in agreement with the initial definition of the CAK complex, but also towards RNA polymerase II (RNA pol II), general

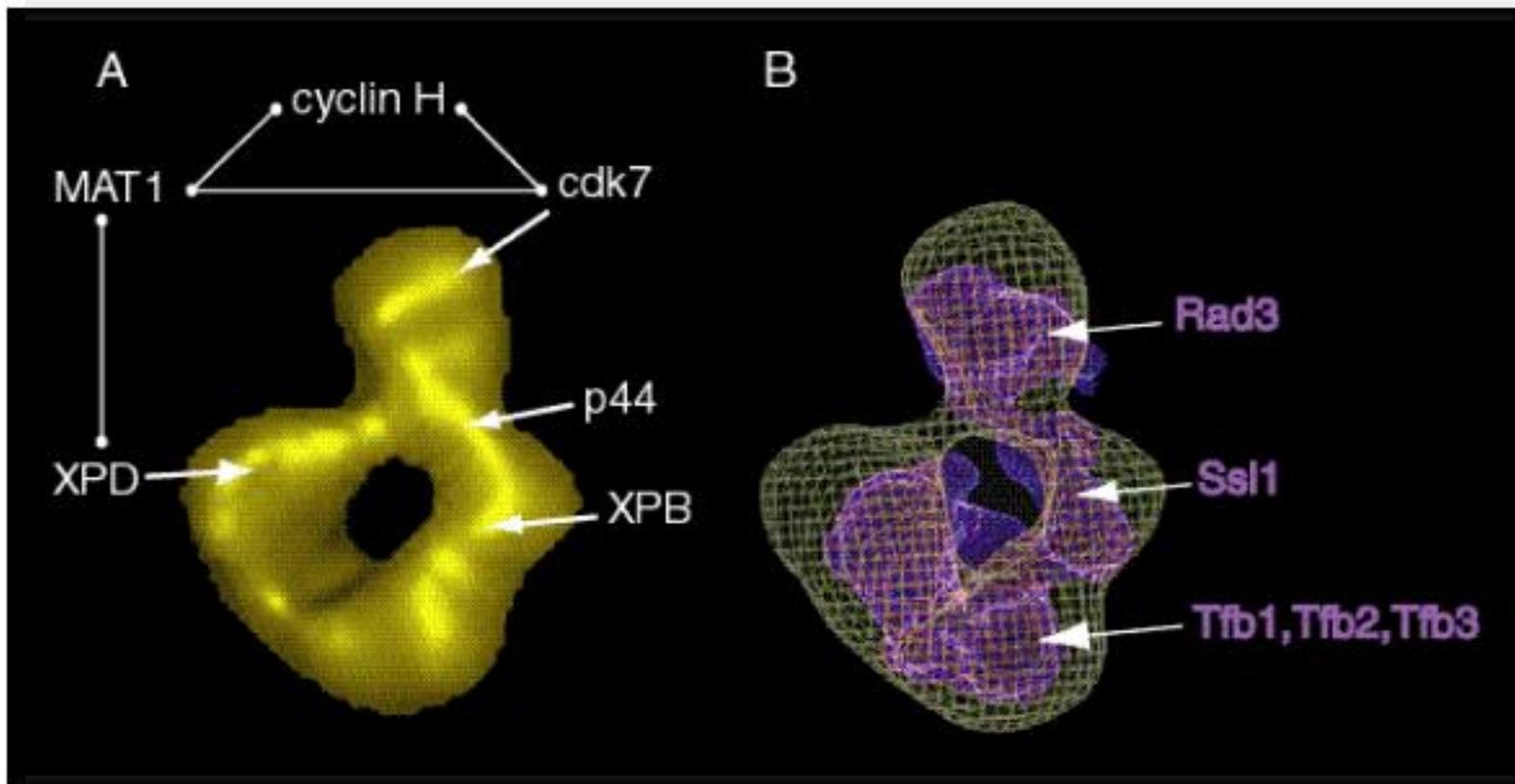


Figure 8.2 : **Quaternary organizations of human TFIIH and yeast core-TFIIH.** (A) Surface representation of the 3D model reconstruction of human TFIIH from electron microscopy analysis. The positions of subunits CDK7, XPD, XPB, and p44, as inferred from immunolabeling experiments, are indicated by the arrows. The cyclin H, MAT1, and p34 subunits are tentatively positioned according to well established pairwise subunit-subunit interaction studies. (B) Superimposition of the 2D crystal structure of yeast core-TFIIH with human TFIIH (blue). Assignments of density regions to subunits in the yeast structure, either Rad3p, Ssl1p, or Tfb1p/Tfb2p/Tfb3p, are indicated. (Adapted from Chang *et al.*, *Cell*,102:609–613, 2000).

transcription factors as well as transcription activators and repressors (cf. paragraph 3). Interestingly, the preference of CAK for one of these two classes of substrates depends on whether it resides in TFIIH or exists as a free complex, suggesting that free CAK is devoted to cell cycle regulation whereas, when associated to the core-TFIIH, it participates to TFIIH function(s) in the transcription reaction^{13, 14}.

Cloning of the genes encoding the nine subunits of TFIIH revealed a highly conserved structure and function from yeast to human¹⁵ (fig 8.1). However, although yeast TFIIH has the same composition as the mammalian counterpart, some differences exist: 1) the yeast core-TFIIH subcomplex contains Tfb1p (p62), Tfb2p (p52), and Ssl1p (p44), but also Rad3p (XPD) and Tfb3p (MAT1) which are absent in the human core factor¹⁶; 2) in contrast to their human homologues, the yeast Ssl2p (XPB) helicase and Tfb4p (p34) are not present in the core subcomplex¹⁷; 3) the kinase subcomplex (called TFIK) contains only Kin28p (CDK7) and Ccl1p (cyclin H)^{18, 19} and does not exhibit a cdk-activating kinase (CAK) activity²⁰. In *S. cerevisiae*, the cdk-activating function has been devoted to Cak1p/Civ1p, a kinase that is not associated to TFIIH^{21, 22, 23, 24}.

The differences observed between human and yeast TFIIH also appeared from their quaternary organization. The three-dimensional (3D) model designed from electron microscopy analysis shows that the human TFIIH is organized into a ring-like structure, with a hole whose size is suitable to accommodate a double-stranded DNA molecule, and from which an almost spherical bulge of protein density protrudes out²⁵ (fig 8.2A). The human recombinant core-TFIIH subcomplex forms a circular architecture that can be superimposed on the ring found in human TFIIH, suggesting that the CAK constitutes the bulge appended to the ring-like structure²⁵. The quaternary organization of TFIIH subunits can be partially inferred from immunolabeling combined with coimmunoprecipitation experiments (fig 8.2A). The CDK7 kinase was shown to be located in the protruding domain. The p44 subunit is located within the ring structure, at the basis of the protruding protein density, and is flanked on either side by the XPB and XPD helicases. It is interesting to note that the location of XPD, close to the CAK-containing bulge, is consistent with the proposal that it could bridge (or stabilize) the interaction between the CAK and the core-

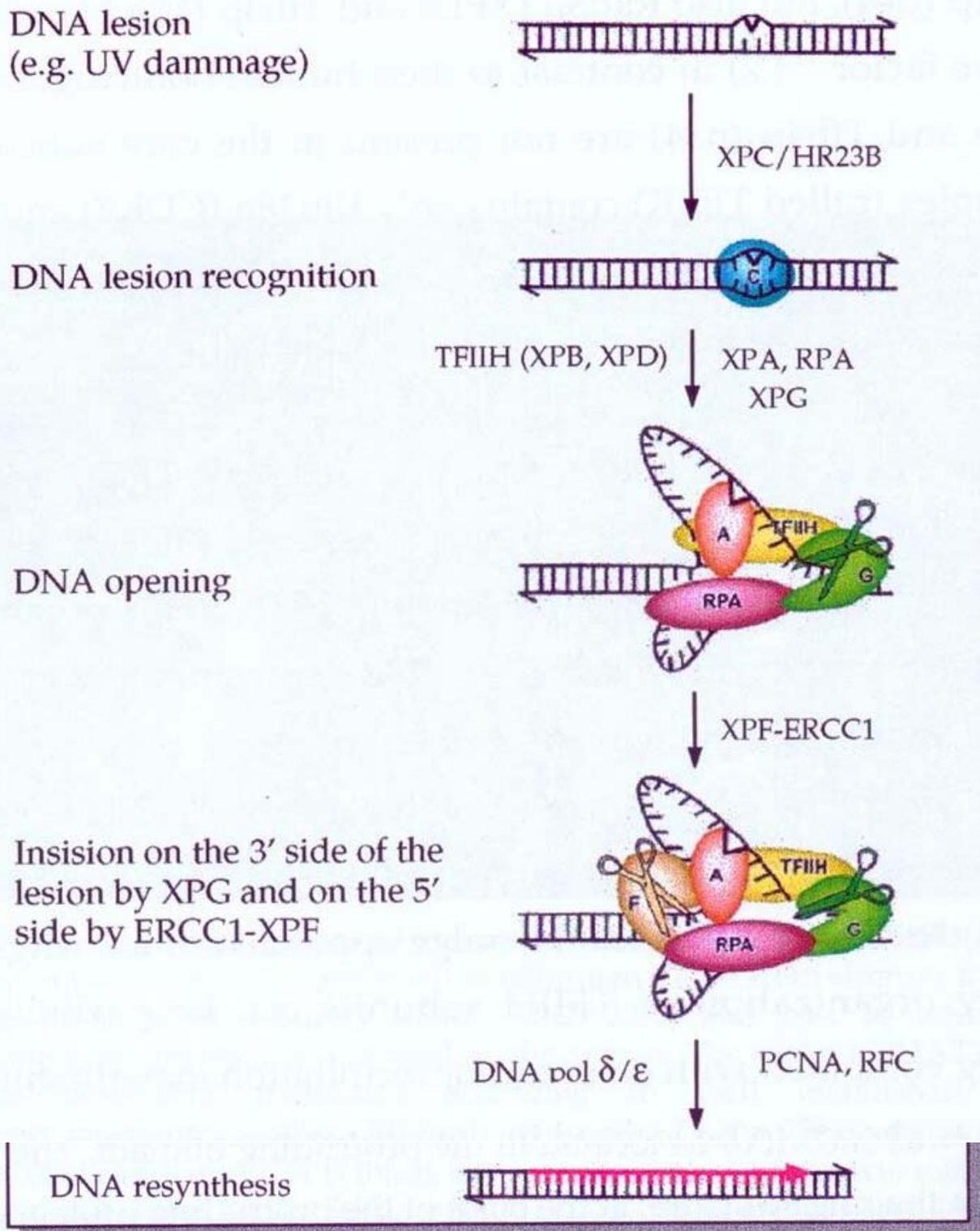


Figure 8.3 : Schematic representation of the nucleotide excision repair (NER) pathway. The involvement of the various NER proteins (XPC/HR23B, TFIIH, RPA, XPA, XPG, XPF-ERCC1, DNA polymerase, PCNA, RFC and DNA ligase I) are shown at each step of the reaction (damage recognition, DNA opening, incision, excision, resynthesis and ligation), as described in the text.

TFIIH. The resolution of the 2D crystallographic structure of the yeast core-TFIIH subcomplex, which contains the helicase Rad3p (XPD), Ssl1p (p44), Tfb1p (p62), Tfb2p (p52), and Tfb3p (MAT1), was also reported ²⁶. In this complex, Tfb1p, Tfb2p, and Tfb3p form a ring-like structure to which is appended Rad3p, via a bridge created by Ssl1p (fig 8.2B, in blue). A plausible fit of the crystal structure of yeast core-TFIIH to the human TFIIH particle reconstruction could be proposed (fig 8.2B), pointing to differences and similarities in size, shape, and arrangement of subunits. The human and yeast studies are not fully compatible because : 1) the yeast core-TFIIH subcomplex presents a large non-ring density area ; 2) the rings observed in each structure are of different size and subunits composition; 3) the localization of the Rad3p/XPD and the Tfb3p/MAT1 subunits in the two structures are in clear disagreement (fig 8.2B).

The discrepancies in the subunit composition and quaternary organization between the yeast and human TFIIH subcomplexes probably reflect some subtle differences concerning the role of their various subunits in the DNA repair and transcription activities of TFIIH.

2- The role of CAK in DNA repair

DNA repair pathways are fundamental cellular processes for protecting cells against genetic damage, produced by various genotoxic agents. They proceed essentially either through the direct replacement of the nucleotide modified by a lesion or through the excision of an oligonucleotide carrying the damage and the subsequent replacement by a newly synthesised intact DNA (reviewed in ²⁷). Among the various DNA repair pathways, nucleotide excision repair (NER) plays an essential role in cell survival by removing the major UV-induced DNA lesions. Defects in this DNA repair pathway generate three human genetic disorders : *Xeroderma pigmentosum* (XP), trichothiodystrophy and Cockayne syndrome. XP is a highly cancer-prone skin disorder which symptoms are caused by exposure to sunlight and can be accounted for the deficiency in NER. Eight complementation groups of XPs (XP-A to XP-G + XP-V) have been identified ; two of them result from mutations in the XPB and XPD helicases of TFIIH.

Recently, the identification of the various components of the NER pathway, the mutation of which generate the DNA repair disorders, allowed the reconstitution of the NER reaction *in vitro* ²⁸. NER proceeds through different steps : damage recognition, opening of the DNA around the lesion, incision on each side, excision of the ~30-mer oligonucleotide bearing the damage, replacement of the excised fragment by resynthesis and ligation (fig 8.3) ²⁹. Briefly, XPC/HR23B and XPA bind the damaged DNA, followed by the opening of the DNA around the lesion, promoted by the two helicases subunits of TFIIH, XPD and XPB. The RPA protein, with the help of XPA, would then maintain the DNA opened, allowing cleavage by the two XPG and XPF-ERCC1 nucleases. Once the damaged fragment is excised, *de novo* DNA synthesis is achieved by the DNA polymerase δ/ϵ under the control of PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) and RCF (replication factor C) and the reaction is terminated by DNA ligase I ^{28, 30, 31}.

The involvement of TFIIH in NER was emphasized by immunodepletion experiments, with anti-p34 antibodies or anti-p52 antibodies, which led to the inhibition of NER activity both *in vitro* and *in vivo* ^{32, 33}. These observations raised the question of the role of each TFIIH subunit in NER. According to the UV-sensitivity phenotype of the different mutant cells in yeast and human, at least five TFIIH subunits could be considered as repair proteins : the XPB/Rad25p and XPD/Rad3p helicases, as well as p62/Tfb1p ^{34, 35}, p44/Ssl1p ^{35, 36} and p52/Tfb2p ¹⁵. To the opposite, yeast strains carrying mutations either in Kin28p or in Tfb3p exhibit only a mild, if any, UV-sensibility and no decrease in DNA damage repair ^{19, 37}. Altogether, these results minimize the role of CAK in NER. In agreement with this, a CAK-depleted TFIIH was shown to be still active in a reconstituted yeast ³⁸ or mammalian ³⁹ *in vitro* system. However, at least two studies imply the CAK component of TFIIH in NER. First, microinjection of antibodies raised against CDK7 results in a drop of NER *in vivo* ⁵. Second, a *tfb3* temperature-sensitive mutant yeast strain was demonstrated to exhibit both a severe UV-sensitivity and a defect in NER *in vitro* ⁴⁰. Moreover, using a reconstituted excision assay, it was demonstrated that the presence of CAK inhibits the reaction ⁴¹. This inhibition was observed only in the presence of an ATP-regenerating system. Addition of a specific kinase inhibitor

overcame this inhibition, suggesting that it is the kinase activity of CAK, and not its physical presence, that is involved in this negative regulation.

In the light of the above results, it remains difficult to design a scenario in which TFIIH would work either in transcription or in NER as a function of its structural state (absence or presence of CAK, modification of some of its subunits,...). Nevertheless, two distinct TFIIH complexes has been evidenced in yeast : one of them contains the kinase and the cyclin subunits and is involved in transcription; the other one, which forms the “repairosome complex” with other NER components and seems therefore devoted to NER, lacks TFIK^{40, 42}. The transition from one form to another would enable competition to occur between transcription and NER⁴². This model is, however, not applicable to mammalian cells : first, eventhough mammalian TFIIH easily separates into several subcomplexes upon purification, the existence of the core-TFIIH subcomplex has never been demonstrated in cells; second, microinjection of anti-CDK7 antibodies inhibits NER *in vivo*⁵, suggesting that the 9-subunits TFIIH normally participates in NER. It is thus believed that, in mammals, the two functions of TFIIH do not involve two distinct TFIIH complexes ; the switch between these two functions would rather be the result of intramolecular events induced by DNA damage. A model was proposed in which CDK7 (or CAK) negatively regulates the NER reaction by phosphorylating some NER components⁴¹, and is itself inhibited in response to DNA damage. Indeed, the kinase activity of the TFIIH purified from UV-irradiated mammalian cells is dramatically inhibited⁶. Moreover, treatment of HeLa cell extracts with serine-threonine phosphatase inhibitors prevents incision of the damaged oligonucleotide during the NER reaction⁴³. In this model, XPG, which was found to interact physically with and be phosphorylated by TFIIH^{44, 45} is a good target for such inhibition.

As a conclusion, it has to be noticed that, eventhough CDK7 might not be directly involved in the NER reaction, it likely plays a crucial role in the cell cycle arrest induced upon genotoxic attacks, allowing DNA repair. When DNA is damaged, TFIIH would activate p53 by phosphorylation, which would further stimulate the cdk-inhibitor p21^{WAF1/CIP1} gene expression, leading to cell cycle arrest⁴⁶.

3- Transcription Regulation by CAK

In eukaryotes, the synthesis of messenger RNA by RNA pol II is a multistep process that requires at least six general transcription factors (or GTFs, named TFIIA to TFIIH), allowing « basal » transcription, which can be further regulated by activators and repressors (for a review see ⁴⁷). The transcription reaction proceeds through different steps: assembly of the preinitiation complex, promoter opening, first phosphodiesterbond formation, promoter clearance, elongation and termination. The first step consists in the assembly of the different GTFs, along with a nonphosphorylated RNA pol II, at the promoter (usually including a TATA-box and the start site). Indeed, TFIIH, TFIIA, TFIIF, TFIIE and RNA pol II join the promoter (either as a pre-assembled complex or sequentially), already bound by TFIID and TFIIB, to form the closed "preinitiation" complex which is inactive. Then the ATP-dependent opening of DNA allows the formation of the first phosphodiester bond followed by the escape of RNA pol II from the initiation complex, referred as to "promoter clearance", to carry on with transcript elongation. Regulation of the basal machinery, which occurs in a chromatin context, is orchestrated by the recruitment of additional transcription factors that can either stabilize the preinitiation complex or modify some of the components of the basal apparatus through acetylation, glycosylation, and/or phosphorylation.

Phosphorylation is an essential process of transcription regulation ; first, phosphorylation is both rapid and reversible ; second, most of the transcription factors appear to be phosphorylated ; third, many signal transduction pathways affecting gene expression activate protein kinases ; fourth, this modification provides a large spectrum of regulation because multiple kinases can phosphorylate a given protein at various sites, within its different functional domains. Indeed, regulation of transcription involves CDK7, CDK8, and CDK9, but also several other kinases such as TAF_{II}250 (TBP-associated factor 250), DNA-PK (DNA-dependant Protein Kinase) and MAP kinases (Mitogen Activated Protein Kinases). Their substrates include the RNA pol II as well as some GTFs and regulatory factors such as nuclear receptors

(RAR α , RAR γ , ER α , AR) and other DNA-binding proteins (GAL4, p53 and Oct-1) (reviewed in ⁴⁸).

Phosphorylation of basal transcription factors regulates transcription

Most GTFs are phosphorylated (at least *in vitro*) and three of them, TFIID (TAF_{II}250), TFIIF (its α subunit) and TFIIH (CDK7), have been shown to possess intrinsic kinase activities towards GTFs. Very few is known concerning the consequences of GTFs phosphorylation. It appears however that the global repression of RNA pol II transcription that is observed at mitosis, might be facilitated by the reversible phosphorylation of TFIID components (TAF_{II}20/15, TAF_{II}31, TAF_{II}80, and TBP) ⁴⁹ (reviewed in ⁵⁰).

One of the most remarkable GTF in terms of phosphorylation is TFIIH which uses TBP, TFIIE α , and TFIIF α as substrates, at least *in vitro* (reviewed in ⁵¹). It has to be kept in mind however that relevance for the phosphorylation of TBP (*in vivo*) and TFIIF α (*in vitro*) by other kinases than TFIIH, have been illustrated. Moreover, eventhough TFIIF phosphorylation was found to reduce the initiation and the elongation kinetic ^{52, 53}, a direct link between phosphorylation of TFIIF α by TFIIH and the regulation of TFIIF activity has not been provided yet.

TFIIH is also a substrate for other cyclin-dependent kinases. The p62 and CDK7 subunits of TFIIH are phosphorylated *in vivo* by CDK1/cyclin B, resulting in a silencing of transcription and an inhibition of CDK7 kinase activity during mitosis ^{54, 55}. In addition, phosphorylation of the cyclin H by CDK8/cyclin C represses both the ability of TFIIH to support activated transcription and its CTD kinase activity with, as a global consequence, an inhibition of cellular proliferation ⁵⁶.

Regulation of transcription and RNA pol II CTD phosphorylation.

The carboxy-terminal domain (CTD) of the largest subunit of RNA pol II, which contains up to 52 repeats of the heptapeptide Tyr₁-Ser₂-Pro₃-Thr₄-Ser₅-Pro₆-Ser₇, represents an ideal substrate for serine-threonine kinases. Many questions remain unanswered concerning the role of this remarkable domain. It is nevertheless clear that its phosphorylation/dephosphorylation follows some steps of the transcription

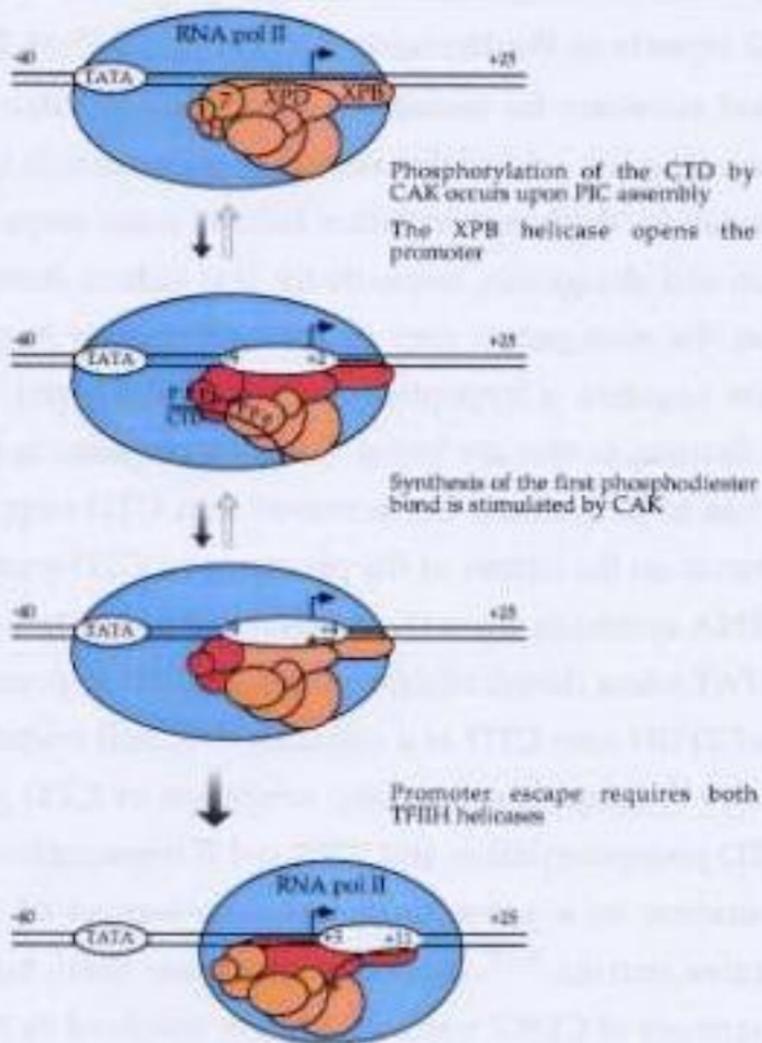


Figure 8.4 : Proposed role(s) of TFIID subunits in transcription initiation. The involvement of the CAK subcomplex or of the two helicases subunits of TFIID into the different steps of the initiation of transcription are shown.

reaction : initiation and elongation, respectively. It is indeed demonstrated that RNA pol II engaged in the elongation step of transcription is hyperphosphorylated, whereas initiation requires a hypophosphorylated RNA pol II (reviewed in ⁵⁷). Deletions of this domain *in vivo* are lethal ⁵⁸ and its presence is required for *in vitro* transcription. It has to be pointed out however that CTD requirement for *in vitro* transcription depends on the nature of the promoter : a CTD-truncated RNA pol II is able to catalyse RNA synthesis from the Adenovirus major late promoter (AdMLP) but not from the TATA-less dihydrofolate reductase (DHFR) promoter ⁵⁹.

The kinase of TFIIF uses CTD as a substrate ⁶⁰. A null mutation in CDK7, either *in vivo* ⁶¹ or *in vitro* ¹², leads to a dramatic inhibition of CTD phosphorylation. In addition, both CTD phosphorylation and RNA pol II transcription are reduced at the restriction temperature in a yeast *kin28* (the counterpart of the human CDK7) temperature-sensitive mutant ^{20, 37}. Not only the kinase itself, but also cyclin H and MAT1, the two partners of CDK7 within CAK, are involved in the phosphorylation process. Indeed, a conditional *ccl1* yeast mutant (the counterpart of human cyclin H) shows a strong decrease of the *in vivo* level of CTD phosphorylation ⁶². Mutation in MAT1 also affects both CTD phosphorylation and basal transcription. It was suggested that disruption of the RING-finger motif of MAT1 does not further allow optimal positioning of some of the components of the basal transcription machinery on the promoter, with as a consequence a drop in the affinity of CDK7 for its CTD substrate and/or a decrease of RNA synthesis ⁶³.

Although not really proven, it seems that CTD phosphorylation would favor the transition from initiation to elongation by allowing the RNA pol II to be released from TFIID, which remains bound to its TATA-box target site ^{60, 64}. In addition, it has to be noticed that transcription from the DHFR promoter needs CAK kinase activity ⁵⁹, whereas both basal and activated transcription from the AdMLP requires neither the enzymatic activity of CAK ^{59, 61} nor its presence within TFIIF ^{7, 8, 13}. In fact, *in vitro* CTD phosphorylation requires neither promoter opening nor formation of the first phosphodiester bond ¹² (fig 8.4). It remains that CAK stimulates significantly the formation of the first phosphodiester bond ⁶⁵, but this involves only a structural contribution of the complex and not its enzymatic activity ⁶⁶.

Although not absolutely required for initiation of transcription from every promoter *in vitro*, phosphorylation of the CTD likely serves as a control panel for transcription and post-transcriptional events *in vivo*. Besides controlling the progression of RNA pol II through the transcription cycle, CTD phosphorylation and dephosphorylation has also been directly linked to other gene expression related processes such as pre-mRNA processing (capping, splicing, poly(A)site cleavage) [reviewed in ⁶⁷], as well as ubiquitin-dependent degradation of RNA pol II ⁶⁸.

CAK is involved in activated transcription

Since transcription regulators interact directly, or via cofactors, with the basal transcription machinery, it was hypothesized that some kinases present within this machinery, such as CDK7, TAFII250 or TFIIF α , would participate in the regulation of transcription. CDK7 (or its yeast homologue Kin28p) was indeed found to phosphorylate the activation domains of both E2F-1 ⁶⁹ and the yeast transcription factor GAL4 ⁷⁰, the DNA binding domains of GAL4 ⁷⁰ and Oct-1 ⁷¹ and the activation and C-terminal multi-functional domains of p53 ^{72, 73}. As a consequence, one could observe variations in gene expression levels. Interestingly, it was also found that the retinoic acid receptors (RAR) α and γ , and the estrogen receptor alpha (ER α) are phosphorylated *in vitro*, as well as *in vivo*, by CDK7 ^{74, 75, 76}. Such phosphorylation by TFIIH parallels an increase of target genes expression level. Recently, a physical interaction was also detected between the androgen receptor (AR) and TFIIH ⁷⁷. RARs, ER α and AR belong to the superfamily of nuclear receptors which share common conserved domains : a ligand-independent activation domain named AF-1, encompassing the phosphorylation site for CDK7, a DNA-binding domain (DBD), a ligand-binding domain (LBD) and an activation domain that is inducible by cognate ligands, AF-2 (reviewed in ⁷⁸). The nuclear receptors regulate target gene expression by binding to specific DNA sequences, named "response elements", either as homo- or heterodimers.

The mechanism of action of all these transcriptional regulators is still unclear. However, it seems that the phosphorylation of AF-1 domains of RARs and ER α by CDK7 is essential for transactivating target genes expression ^{74, 75, 76}. It cannot be

excluded that phosphorylation might regulate either the binding of the receptor to its responsive element and/or its dimerization. It is not known whether, once phosphorylated, these receptors directly stimulate some components of the transcription machinery (basal factors and/or co-activators). It can be hypothesized that, upon interaction with TFIIH and further phosphorylation, these DNA binding proteins could stimulate some steps of the transcription reaction such as CTD phosphorylation, DNA opening, promoter clearance, or recruitment and/or stimulation of the elongation machinery. Indeed, phosphorylation of the DNA-binding domain of p53 by CDK7, which stimulates *in vitro* the transcription of some genes, enhances its affinity for its responsive DNA-element ⁷³. Other studies suggest that such phosphorylation modulate interactions with proteins such as MDM-2, CBP/p300 or TFIID ⁷⁹. Nevertheless, to date, it has not been demonstrated that CDK7 phosphorylation could play a role in the transactivation of transcription mediated by p53 *in vivo*. Finally, an additional mechanism of transcription factor regulation is provided by phosphorylation of the activation domain of E2F-1 by CDK7, which is responsible for targeting E2F-1 to ubiquitin-dependent proteolysis, thus affecting E2F-1 activity at the protein level ⁶⁹.

Conclusions and perspectives

With the discovery of the multiple functions of TFIIH, this factor has emerged as a pivotal component of the cell life, likely coordinating cell cycle progression with transcription and DNA repair. The activity of CDK7, originally identified as the kinase responsible for cdk activation within a free CAK complex, had thus to be analyzed in the scope of the multisubunit TFIIH complex and in its roles in transcription and DNA repair.

There are still unanswered questions concerning the role of the kinase of TFIIH in basal transcription : does it regulate RNA synthesis through stimulation of some of the first steps of the transcription initiation, or does it simply rhythm two of the main steps of the transcription reaction : initiation and elongation ? Does CDK7 coordinate some RNA processing events such as splicing or polyadenylation through

phosphorylation of the CTD of RNA pol II? If we extend our observations to transcription activation, does CDK7 play a role in regulation of specific genes and, as thus, is under the control of external stimuli and does it function in relation with some chromatin assembly/disassembly processes ?

We may then wonder how the kinase of TFIIH might be regulated upon genotoxic attack, knowing that TFIIH is an essential factor of DNA repair. In such a situation, could one emphasized that CDK7 exert a role at this level and, if so, which one ? At this stage of our knowledge, the simplest hypothesis considers the CAK subcomplex (and/or its kinase activity) as a key element for the transition of TFIIH roles from transcription to DNA repair. However, further studies are definitely required to challenge this model.

Here are some of the questions that are worthwhile to take into consideration if one would try to further understand the mechanisms that underlie regulation and coupling of two fundamental cell processes : transcription and DNA repair.

Acknowledgments

We are grateful to all members of our group for fruitful discussions and critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche Scientifique et Technique, from the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant ARC9083), and from the Human Frontier Program (RG-193/97) and EEC grants (QLG1-1999). A.K. was a recipient of a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche Scientifique et Technique.

References

1. **J. W. Conaway and R. C. Conaway.** A Multisubunit Transcription Factor Essential for Accurate Initiation by RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.* 1989;264:2357-2362
2. **M. Gerard, L. Fischer, V. Moncollin, et al.** Purification and Interaction Properties of the Human RNA Polymerase B(II) General Transcription Factor Btf2. *J. Biol. Chem.* 1991;266:20940-20945
3. **E. Taylor, B. Broughton, E. Botta, et al.** Xeroderma Pigmentosum and Trichothiodystrophy Are Associated with Different Mutations in the XPD (Ercc2) Repair/Transcription Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94:8658-8663

4. **E. Botta, T. Nardo, B. C. Broughton, et al.** Analysis of Mutations in the XPD Gene in Italian Patients with Trichothiodystrophy: Site of Mutation Correlates with Repair Deficiency, but Gene Dosage Appears to Determine Clinical Severity. *Am J Hum Genet.* 1998;63:1036-1048
5. **R. Roy, J. P. Adamczewski, T. Seroz, et al.** The MO15 Cell Cycle Kinase Is Associated with the TFIIH Transcription-DNA Repair Factor. *Cell.* 1994;79:1093-1101
6. **J. P. Adamczewski, M. Rossignol, J. P. Tassan, et al.** MAT1, CDK7 and cyclin H Form a Kinase Complex Which Is UV Light-Sensitive Upon Association with TFIIH. *EMBO J.* 1996;15:1877-1884
7. **R. Drapkin, G. Le Roy, H. Cho, et al.** Human Cyclin-Dependent Kinase-Activating Kinase Exists in Three Distinct Complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996;93:6488-6493
8. **J. T. Reardon, H. Ge, E. Gibbs, et al.** Isolation and Characterization of Two Human Transcription Factor IIIH (TFIIH)-Related Complexes: Ercc2/CAK and TFIIH. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:6482-6487
9. **F. Coin, J. C. Marinoni, C. Rodolfo, et al.** Mutations in the XPD Helicase Result in Xp and Ttd Phenotypes, Preventing the Interaction of XPD with the p44 Subunit of TFIIH. *Nat. Genet.* 1998;20:184-188
10. **E. Evans, J. Fellows, A. Coffer, et al.** Open Complex Formation around Lesion During Nucleotide Excision Repair Provides a Structure for Cleavage by Human XPG Protein. *EMBO J.* 1997;16:625-638
11. **D. Mu, M. Wakasugi, D. S. Hsu, et al.** Characterization of Reaction Intermediates of Human Excision Repair Nuclease. *J. Biol. Chem.* 1997;272:28971-28979
12. **F. Tirode, D. Busso, F. Coin, et al.** Reconstitution of the Transcription Factor TFIIH: Assignment of the Functions for the Three Enzymatic Subunits, XPB, XPD and CDK7. *Mol. Cell.* 1999;3:87-95
13. **M. Rossignol, I. Kolb-Cheynel and J. M. Egly.** Substrate Specificity of the Cdk-Activating Kinase (CAK) Is Altered Upon Association with TFIIH. *EMBO J.* 1997;16:1628-1637
14. **K. Yankulov and D. L. Bentley.** Regulation of CDK7 Substrate Specificity by MAT1 and TFIIH. *EMBO J.* 1997;16:1638-1646
15. **W. J. Feaver, N. L. Henry, Z. Wang, et al.** Genes for Tfb2, Tfb3, and Tfb4 Subunits of Yeast Transcription/Repair Factor IIIH. Homology to Human Cyclin-Dependent Kinase Activating Kinase and IIIH Subunits. *J. Biol. Chem.* 1997;272:19319-19327
16. **J. Q. Svejstrup, W. J. Feaver, J. LaPointe, et al.** RNA Polymerase Transcription Factor IIIH Holoenzyme from Yeast. *J. Biol. Chem.* 1994;269:28044-28048
17. **W. J. Feaver, J. Q. Svejstrup, L. Bardwell, et al.** Dual Roles of a Multiprotein Complex from *S. cerevisiae* in Transcription and DNA Repair. *Cell.* 1993;75:1379-1387
18. **J. Q. Svejstrup, W. J. Feaver and R. D. Kornberg.** Subunits of Yeast RNA Polymerase II Transcription Factor TFIIH Encoded by the Ccl1 Gene. *J. Biol. Chem.* 1996;271:643-645
19. **G. Faye, M. Simon, J. G. Valay, et al.** Rig2, a Ring Finger Protein That Interacts with the Kin28/Ccl1 CTD Kinase in Yeast. *Mol. Gen. Genet.* 1997;255:460-466
20. **M. J. Cismowski, G. M. Laff, M. J. Solomon, et al.** Kin28 Encodes a C-Terminal Domain Kinase That Controls mRNA Transcription in *Saccharomyces Cerevisiae* but Lack Cyclin-Dependent Kinase-Activating Activity. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15:2983-2992
21. **P. Kaldis, A. Sutton and M. J. Solomon.** The Cdk-Activating Kinase (CAK) from Budding Yeast. *Cell.* 1996;86:553-564
22. **F. H. Espinoza, A. Farrell, H. Erdjument-Bromage, et al.** A Cyclin-Dependent Kinase-Activating Kinase (CAK) in Budding Yeast Unrelated to Vertebrate CAK. *Science.* 1996;273:1714-1717
23. **J.-Y. Thuret, J.-G. Valay, G. Faye, et al.** Civ1 (CAK in vivo), a Novel Cdk-Activating Kinase. *Cell.* 1996;86:565-576
24. **P. Kaldis.** The Cdk-Activating Kinase (CAK): From Yeast to Mammals. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:284-96
25. **P. Schultz, S. Fribourg, A. Poterszman, et al.** Molecular Structure of Human TFIIH. *Cell.* 2000;102:599-607
26. **W. H. Chang and R. D. Kornberg.** Electron Crystal Structure of the Transcription Factor and DNA Repair Complex, Core TFIIH. *Cell.* 2000;102:609-613.
27. **E. C. Friedberg, G. C. Walker and W. Siede.** *DNA Repair and Mutagenesis* Washington, DC: ASM Press; 1995.
28. **A. Aboussekhra, M. Biggerstaff, M. K. K. Shivji, et al.** Mammalian DNA Nucleotide Excision Repair Reconstituted with Purified Components. *Cell.* 1995;80:859-868
29. **R. D. Wood.** Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 1997;272:23465-23468
30. **D. Mu, C. H. Park, T. Matsunaga, et al.** Reconstitution of Human DNA Repair Excision Nuclease in a Highly Defined System. *J. Biol. Chem.* 1995;270:2415-2418
31. **S. N. Guzder, Y. Habraken, P. Sung, et al.** Reconstitution of Yeast Nucleotide Excision Repair with Purified Rad Proteins, Replication Protein A, and Transcription Factor TFIIH. *J. Biol. Chem.* 1995;270:12973-12976

32. **S. Humbert, H. van Vuuren, Y. Lutz, et al.** p44 and p34 Subunits of the Btf2/TFIIH Transcription Factor Have Homologies with Ssl, a Yeast Protein Involved in DNA Repair. *EMBO J.* 1994;13:2393-2398
33. **J. C. Marinoni, R. Roy, W. Vermeulen, et al.** Cloning and Characterization of p52, the Fifth Subunit of the Core of the Transcription/DNA Repair Factor TFIIH. *EMBO J.* 1997;16:1093-1102
34. **P. Matsui, J. DePaulo and S. Buratowski.** An Interaction between the Tfb1 and Ssl1 Subunits of Yeast TFIIH Correlates with DNA Repair Activity. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:767-772
35. **Z. Wang, S. Buratowski, J. Q. Svejstrup, et al.** The Yeast Tfb1 and Ssl1 Genes, Which Encode Subunits of Transcription Factor IIIH, Are Required for Nucleotide Excision Repair and Polymerase II Transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15:2288-2293
36. **H. Yoon, S. P. Miller, E. K. Pabich, et al.** Ssl1, a Suppressor of a His4 5'-Utr Stem-Loop Mutation, Is Essential for Translation Initiation and Affects UV Resistance in Yeast. *Genes Dev.* 1992;6:2463-2477
37. **J. G. Valay, M. Simon, M. F. Dubois, et al.** The Kin28 Gene Is Required Both for RNA Polymerase II Mediated Transcription and Phosphorylation of the Rpb1p CTD. *J. Mol. Biol.* 1995;249:535-544
38. **P. Sung, S. N. Guzder, L. Prakash, et al.** Reconstitution of TFIIH and Requirement of Its DNA Helicase Subunits, Rad3 and Rad25, in the Incision Step of Nucleotide Excision Repair. *J. Biol. Chem.* 1996;271:10821-10826
39. **D. Mu, D. S. Hsu and A. Sancar.** Reaction Mechanism of Human DNA Repair Excision Nuclease. *J. Biol. Chem.* 1996;271:8285-8294
40. **W. J. Feaver, W. Huang, O. Gileadi, et al.** Subunit Interactions in Yeast Transcription/Repair Factor TFIIH. Requirement for Tfb3 Subunit in Nucleotide Excision Repair. *J Biol Chem.* 2000;275:5941-5946.
41. **S. J. Araujo, F. Tirode, F. Coin, et al.** Nucleotide Excision Repair of DNA with Recombinant Human Proteins: Definition of the Minimal Set of Factors, Active Forms of TFIIH, and Modulation by CAK. *Genes Dev.* 2000;14:349-359
42. **J. Q. Svejstrup, Z. Wang, W. J. Feaver, et al.** Different Forms of TFIIH for Transcription and DNA Repair: Holo-TFIIH and a Nucleotide Excision Repairosome. *Cell.* 1995;80:21-28
43. **R. R. Ariza, S. M. Keyse, J. G. Moggs, et al.** Reversible Protein Phosphorylation Modulates Nucleotide Excision Repair of Damaged DNA by Human Cell Extracts. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:433-440
44. **N. Iyer, M. S. Reagan, K. J. Wu, et al.** Interactions Involving the Human RNA Polymerase II Transcription Factor/Nucleotide Excision Repair Complex TFIIH, the Nucleotide Excision Repair Protein XPG, and Cockayne Syndrome Group B (Csb) Protein. *Biochemistry.* 1996;35:2157-2167
45. **Y. Habraken, P. Sung, S. Prakash, et al.** Transcription Factor TFIIH and DNA Endonuclease Rad2 Constitute Yeast Nucleotide Excision Repair Factor 3: Implications for Nucleotide Excision Repair and Cockayne Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93:10718-10722
46. **L. J. Ko and C. Prives.** p53: Puzzle and Paradigm. *Genes Dev.* 1996;10:1054-1072
47. **G. Orphanides, T. Lagrange and D. Reinberg.** The General Transcription Factors of RNA Polymerase II. *Genes Dev.* 1996;10:2657-2683
48. **T. Riedl and J. M. Egly.** Phosphorylation in Transcription: The CTD and More. *Gene Expr.* 2000;9:3-13
49. **N. Segil, M. Guermah, A. Hoffmann, et al.** Mitotic Regulation of TFIID: Inhibition of Activator-Dependent Transcription and Changes in Subcellular Localization. *Genes Dev.* 1996;10:2389-2400
50. **J. M. Gottesfeld and D. J. Forbes.** Mitotic Repression of the Transcriptional Machinery. *Trends in Biol. Sci.* 1997;22:197-202
51. **P. Frit, E. Bergmann and J. M. Egly.** Transcription Factor IIIH: A Key Player in the Cellular Response to DNA Damage. *Biochimie.* 1999;81:27-38.
52. **S. Kitajima, T. Chibazakura, M. Yonaha, et al.** Regulation of the Human General Transcription Initiation Factor TFIIIF by Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1994;269:29970-29977
53. **M. Rossignol, A. Keriél, A. Staub, et al.** Kinase Activity and Phosphorylation of the Largest Subunit of TFIIIF Transcription Factor. *J Biol Chem.* 1999;274:22387-22392
54. **S. Akoulitchev and D. Reinberg.** The Molecular Mechanism of Mitotic Inhibition of TFIIH Is Mediated by Phosphorylation of CDK7. *Genes Dev.* 1998;12:3541-3550
55. **J. J. Long, A. Leresche, R. W. Kriwacki, et al.** Repression of TFIIH Transcriptional Activity and TFIIH-Associated CDK7 Kinase Activity at Mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18:1467-1476
56. **S. Akoulitchev, S. Chuikov and D. Reinberg.** TFIIH Is Negatively Regulated by CDK8-Containing Mediator Complexes. *Nature.* 2000;407:102-106
57. **M. E. Dahmus.** Reversible Phosphorylation of the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.* 1996;271:19009-19012
58. **V. Ossipow, J. P. Tassan, E. A. Nigg, et al.** A Mammalian RNA Polymerase II Holoenzyme Containing All the Components Required for Promoter-Specific Transcription Initiation. *Cell.* 1995;83:137-146
59. **S. Akoulitchev, T. P. Mäkelä, R. A. Weinberg, et al.** Requirement for TFIIH Kinase Activity in Transcription by RNA Polymerase II. *Nature.* 1995;377:557-560

60. **H. Lu, L. Zawel, L. Fisher, et al.** Human General Transcription Factor IIF Phosphorylates the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Nature*. 1992;358:641-645
61. **T. P. Makela, J. D. Parvin, J. Kim, et al.** A Kinase-Deficient Transcription Factor TFIIF Is Functional in Basal and Activated Transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:5174-5178.
62. **J. G. Valay, M. F. Dubois, O. Bensaude, et al.** Ccl1, a Cyclin Associated with Protein Kinase Kin28, Controls the Phosphorylation of RNA Polymerase II Largest Subunit and mRNA Transcription. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 1996;319:183-189
63. **D. Busso, A. Kériel, B. Sandrock, et al.** Distinct Regions of MAT1 regulate CDK7 kinase and TFIIF transcription activities. *J. Biol. Chem.* 2000;275:22815-22823
64. **A. Usheva, E. Maldonado, A. Goldring, et al.** Specific Interaction between the Nonphosphorylated Form of RNA Polymerase II and the Tata-Binding Protein. *Cell*. 1992;69:871-881
65. **T. Seroz, C. Perez, E. Bergmann, et al.** p44/Ssl1, the Regulatory Subunit of the XPD/Rad3 Helicase plays a Crucial Role in the Transcriptional Activity of TFIIF. *J Biol Chem*. 2000;275:33260-33266
66. **J. Bradsher, F. Coin and J. M. Egly.** Distinct Roles for the Helicases of TFIIF in Transcript Initiation and Promoter Escape. *J. Biol. Chem.* 2000;275:2532-2538
67. **S. McCracken, N. Fong, K. Yankulov, et al.** The C-Terminal Domain of RNA Polymerase II Couples mRNA Processing to Transcription. *Nature*. 1997;365:357-361
68. **A. Mitsui and P. A. Sharp.** Ubiquitination of RNA Polymerase II Large Subunit Signaled by Phosphorylation of Carboxyl-Terminal Domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:6054-6059
69. **L. Vandell and T. Kouzarides.** Residues Phosphorylated by TFIIF Are Required for E2f-1 Degradation During S-Phase. *EMBO J*. 1999;18:4280-4291
70. **M. Hirst, M. S. Kobor, N. Kuriakose, et al.** Gal4 Is Regulated by the RNA Polymerase II Holoenzyme-Associated Cyclin-Dependent Protein Kinase Srb10/Cdk8. *Mol Cell*. 1999;3:673-678.
71. **S. Inamoto, N. Segil, Z. Q. Pan, et al.** The Cyclin-Dependent Kinase-Activating Kinase (CAK) Assembly Factor, MAT1, Targets and Enhances CAK Activity on the POU Domains of Octamer Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* 1997;272:29852-29858
72. **L. J. Ko, S. Y. Shieh, X. Chen, et al.** p53 Is Phosphorylated by CDK7-cyclin H in a p36^{MAT1}-Dependent Manner. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:7220-7229
73. **H. Lu, R. P. Fisher, P. Bailey, et al.** The CDK7-cyclin H-p36 Complex of Transcription Factor IIF Phosphorylates p53, Enhancing Its Sequence-Specific DNA Binding Activity *in Vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:5923-5934
74. **C. Rochette-Egly, S. Adam, M. Rossignol, et al.** Stimulation of RAR Alpha Activation Function Af-1 through Binding to the General Transcription Factor TFIIF and Phosphorylation by CDK7. *Cell*. 1997;90:97-107
75. **J. Bastien, S. Adam-Stitah, T. Riedl, et al.** TFIIF Interacts with the Retinoic Acid Receptor Gamma and Phosphorylates Its Af-1-Activating Domain through CDK7. *J Biol Chem*. 2000;275:21896-21904
76. **D. Chen, T. Riedl, E. Washbrook, et al.** Activation of Estrogen Receptor Alpha by S118 Phosphorylation Involves a Ligand-Dependent Interaction with TFIIF and Participation of CDK7. *Mol Cell*. 2000;6:127-137
77. **D. K. Lee, H. O. Duan and C. Chang.** From Androgen Receptor to the General Transcription Factor TFIIF. Identification of Cdk Activating Kinase (CAK) as an Androgen Receptor NH(2)-Terminal Associated Coactivator. *J Biol Chem*. 2000;275:9308-9313
78. **P. Chambon.** A Decade of Molecular Biology of Retinoic Acid Receptors. *FASEB J*. 1996;10:940-954
79. **D. W. Meek.** Mechanisms of Switching on p53: A Role for Covalent Modification? *Oncogene*. 1999;18:7666-7675.

PUBLICATION 2

Régulation de l'élongation de la transcription par l'autophosphorylation de TFIIF

Le facteur de transcription IIF (TFIIF), initialement identifié comme protéine associée à l'ARN Pol II (RAP pour *RNA Pol II-Associated-Protein*), est un hétérotétramère composé de deux sous-unités α (ou RAP74) et deux sous-unités β (ou RAP30). Il est impliqué à la fois dans la formation du complexe de pré-initiation (PIC), la transition entre l'initiation et l'élongation (Yan *et al.*, 1999), l'élongation de la transcription (Lei *et al.*, 1999) et le recyclage de l'ARN Pol II à la fin d'un cycle de transcription (Lei *et al.*, 1998).

TFIIF peut être considéré comme un centre organisateur du complexe de pré-initiation. En effet, lors de l'assemblage du PIC, TFIIF recrute l'ARN Pol II sous sa forme non phosphorylée et interagit avec TFIIB, TFIIE, TBP, TAF_{II}250 et TAF_{II}100. Il interagit également avec l'ADN, entre la boîte TATA et le site d'initiation (Coulombe *et al.*, 1994), réduisant ainsi les interactions non-spécifiques entre l'ARN Pol II et l'ADN (Killeen *et al.*, 1992; Conaway et Conaway, 1993 et Zewel et Reinberg, 1993). TFIIF favorise enfin l'enroulement de l'ADN autour de l'ARN Pol II (Robert *et al.*, 1998). Lors de l'élongation, la présence de TFIIF stimule la synthèse du messager en inhibant l'arrêt de l'ARN Pol II sur des sites de pause (Lei *et al.*, 1999). Enfin, sa sous-unité α participe au recyclage de l'ARN Pol II (à la fin d'un cycle de transcription) en stimulant la déphosphorylation de celle-ci par une phosphatase spécifique du CTD (Lei *et al.*, 1998).

TFIIF α contient trois régions distinctes : des domaines amino- (1-127) et carboxy-terminaux (399-517) globulaires et une partie centrale riche en résidus acides et basiques (218-398) (Finkelstein, *et al.*, 1992). Des études ont démontré que ces différentes régions correspondent à des domaines fonctionnels distincts et ont permis de déterminer la fonction de chacun d'entre eux (figure 33). Le domaine amino-terminal de TFIIF α interagit avec TFIIF β et possède la plupart des fonctions requises pour l'assemblage du PIC, l'échappée du promoteur et l'élongation, alors que sa région centrale et son domaine carboxy-terminal jouent un rôle dans le recyclage de l'ARN Pol II. Par ailleurs, la partie centrale de TFIIF α interagit avec TFIIB et le domaine CTD de l'ARN Pol II (Kang *et al.*, 1995).

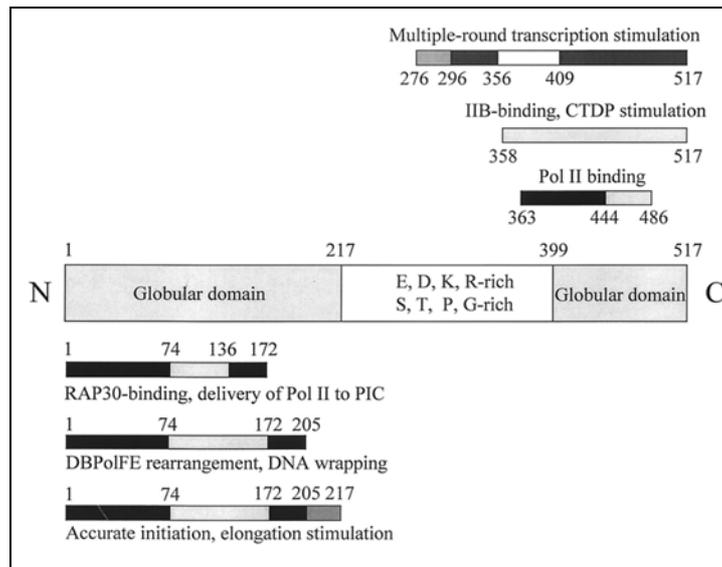


Figure 33 : **Domaines fonctionnels de TFIIFα**. Les régions en noir sont essentielles à l'activité de TFIIF. Abréviations : IIB, TFIIB; CTD, CTD phosphatase; PIC, pre-initiation complex. (Lei *et al*, 1998).

Les activités de TFIIF peuvent être régulées par acétylation (Imhof *et al.*, 1997) ou ADP-ribosylation (Rawling et Alvarez-Gonzalez, 1997), mais surtout par des événements de phospho/dephosphorylation. En effet, le traitement de TFIIF par la phosphatase alcaline a mis en évidence que sa sous-unité α est phosphorylée *in vivo*, et que cet état régule son activité lors de l'initiation et l'élongation de la transcription (Kitajima *et al.*, 1994). L'activité transcriptionnelle de TFIIF est également régulée au cours du cycle cellulaire par la phosphorylation de sa sous-unité α par TAFII250 (sur des sérines comprises entre les résidus 206 et 256) (Yonaha *et al.*, 1997). En plus de TAFII250, la kinase associée au facteur général de transcription TFIIF est également capable de phosphoryler TFIIFα *in vitro* (Ohkuma et Roeder, 1994 et Yankulov et Bentley, 1997).

Dans cette étude, nous avons identifié plusieurs sites de phosphorylation dans la sous-unité α de TFIIF : les résidus sérine 385 et thréonine 389, et 3 sites (compris entre les résidus 207 et 230, 271 et 283, et 335 et 344) contenant la séquence consensus SXXE/D de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII) (figure 34).

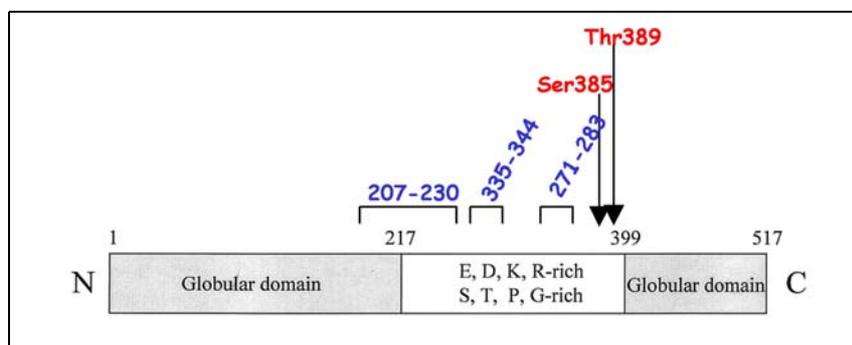


Figure 34 : **Sites de phosphorylation identifiés dans TFIIFα**. Les sites d'autophosphorylation (sérine 385 et thréonine 389) sont montrés en rouge et les trois oligopeptides contenant les sites consensus pour la CKII en bleu.

Nous avons démontré que TFIIF α possède une activité sérine/thréonine kinase intrinsèque responsable de la phosphorylation de ses résidus Ser385 et Thr389. Nous avons par ailleurs constaté que cette autophosphorylation n'affecte pas l'initiation de la transcription mais inhibe l'activité de TFIIF lors de la phase d'élongation. Enfin, nous avons montré que les trois autres sites de phosphorylation sont effectivement la cible de la CKII, mais aussi de TAFII250, confirmant ainsi les observations du Dr. Yonaha et de ses collaborateurs (Yonaha *et al.*, 1997). TFIIF α est également la cible d'une kinase de type CKII présente dans un extrait total de cellules HeLa, mais qui n'a pas été identifiée à ce jour.

Le rôle de l'autophosphorylation de TFIIF α dans la régulation de son activité transcriptionnelle pourrait être lié à fonction de TFIIF dans la recyclage de l'ARN Pol II. On peut en effet imaginer que cette phosphorylation puisse libérer l'ARN Pol II à la fin d'un cycle de transcription en altérant son interaction avec TFIIF. On peut également imaginer qu'elle régule la capacité de TFIIF α à stimuler la déphosphorylation du CTD de l'ARN Pol II par sa phosphatase spécifique.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Kinase Activity and Phosphorylation of the Largest Subunit of TFIIF Transcription Factor

Mireille Rossignol, **Anne Keriél**, Adrien Staub, and Jean-Marc Egly

The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol. 274, N° 32, Pages 22387-22392

Pages 22387-22392 :

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://www.jbc.org/cgi/content/full/274/32/22387?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=kinase+activity+and+phosphorylation&searchid=1117790891369_1723&stored_search=&FIRSTINDEX=0&volume=274&issue=32

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

PUBLICATION 3

Étude fonctionnelle de la sous-unité MAT1 du facteur de transcription/réparation TFIIH

Le complexe TFIIH peut théoriquement être subdivisé en deux sous-complexes fonctionnels : le "cœur" de TFIIH (composé des sous-unités XPB, p62, p52, p44 et p34) et le CAK (pour *cdk-activating-kinase*), constitué de la kinase *cdk7*, de la cycline H et de MAT1. La sous-unité XPD forme un pont entre ces deux sous-complexes.

Au sein du complexe CAK, la sous-unité MAT1 semble jouer un rôle à la fois dans le maintien du complexe ternaire et la spécificité de substrat de la kinase vis-à-vis de ses divers substrats, qui sont impliqués soit dans la transcription (ARN Pol II, facteurs généraux et co-activateurs de la transcription) soit dans le cycle cellulaire (*cdk*). Après analyse de la séquence protéique de MAT1 et prédiction de sa structure secondaire, nous avons identifié plusieurs domaines remarquables : un RING-finger à son extrémité amino-terminale, un motif central de type *coiled-coil* et une région carboxy-terminale riche en résidus hydrophobes (figure 28).

Nous avons voulu savoir si ces motifs jouaient un rôle dans les différentes fonctions de MAT1. Nous avons pour cela reconstitué des facteurs TFIIH recombinants (sur-exprimés dans des cellules d'insectes puis purifiés) contenant des formes tronquées ou mutées de cette sous-unité. La caractérisation fonctionnelle des différents sous-domaines de MAT1 a ainsi permis de démontrer que (figure 35) :

1) L'extrémité carboxy-terminale de MAT1 est nécessaire et suffisante pour la formation du complexe ternaire avec *cdk7*-cycline H et pour la modulation de l'activité kinase de *cdk7*. Par contre, cette région n'est pas suffisante pour permettre des interactions avec les sous-unités du cœur de TFIIH.

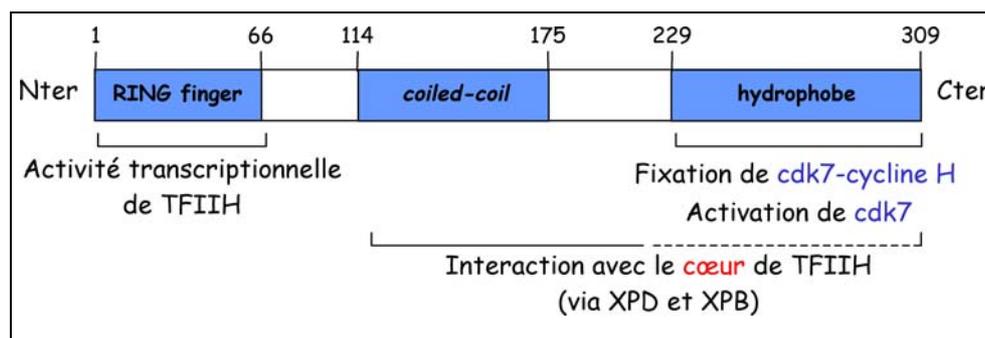


Figure 35 : Analyse fonctionnelle des différents sous-domaines de MAT1.

2) Une région comprenant l'extrémité carboxy-terminale et le domaine central de MAT1 (de type *coiled-coil*) lie le complexe CAK au cœur de TFIIH par son interaction avec les sous-unités XPD et, dans une moindre mesure, XPB. Ces interactions sont essentielles pour l'association stable des 9 sous-unités du complexe.

3) L'intégrité du domaine RING-finger de MAT1 est indispensable à l'activité de TFIIH lors de l'initiation de la transcription, et en particulier à la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II, dans le contexte du PIC assemblé autour d'un promoteur.

Une étude structurale par RMN (résonance magnétique nucléaire), menée sur le domaine RING-finger de MAT1 ultérieurement à nos études fonctionnelles, a montré que ce domaine adopte un repliement entrecroisé caractéristique (Gervais *et al.*, 2001 et figure 36). Cette étude a également permis d'identifier des résidus conservés potentiellement importants pour la fonction du RING-finger de MAT1 : quatre résidus hydrophobes (Leu19, Leu21, Met22 et Val23), quatre résidus chargés positivement et localisés à la surface du domaine (Lys20, Arg54, Lys55 et Arg59) et un résidu tyrosine (Tyr14) strictement conservé et exposé à la surface du domaine.

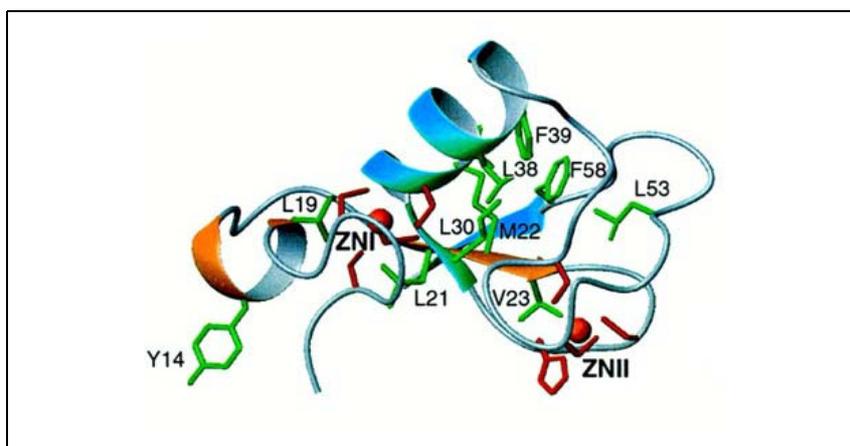


Figure 36 : **Structure tri-dimensionnelle du domaine RING-finger de MAT1.** La représentation en ruban montre l'organisation du domaine en deux hélices α et trois feuillets β : un repliement $\beta\beta\alpha$ typique des motifs RING-finger et une hélice α supplémentaire d'un seul tour (en jaune). Les deux sites de liaison du zinc (boules orange) sont représentés en rouge (Gervais *et al.*, 2001).

Le fait que le domaine RING-finger n'influence l'activité de cdk7 vis-à-vis du CTD que dans le contexte d'un PIC assemblé sur un promoteur (et pas au sein du sous-complexe CAK), suggère que ce domaine pourrait établir des interactions au sein du PIC qui permettraient le positionnement correct de TFIIH et une phosphorylation optimale du CTD. Ces interactions, de nature hydrophobe ou électrostatique, pourraient faire intervenir les résidus décrits ci-dessus. La Tyr14 pourrait également être la cible d'une phosphorylation, permettant une régulation de la fonction de ce domaine.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Distinct Regions of MAT1 Regulate cdk7 Kinase and TFIIH Transcription Activities

Didier Busso, **Anne Keriél**, Björn Sandrock, Arnaud Poterszman, Opher Gileadi, and Jean-Marc Egly

The Journal of Biological Chemistry, 2000, Vol. 275, N° 30, Pages 22815-22823

Pages 22815-22823 :

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/275/30/22815>

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

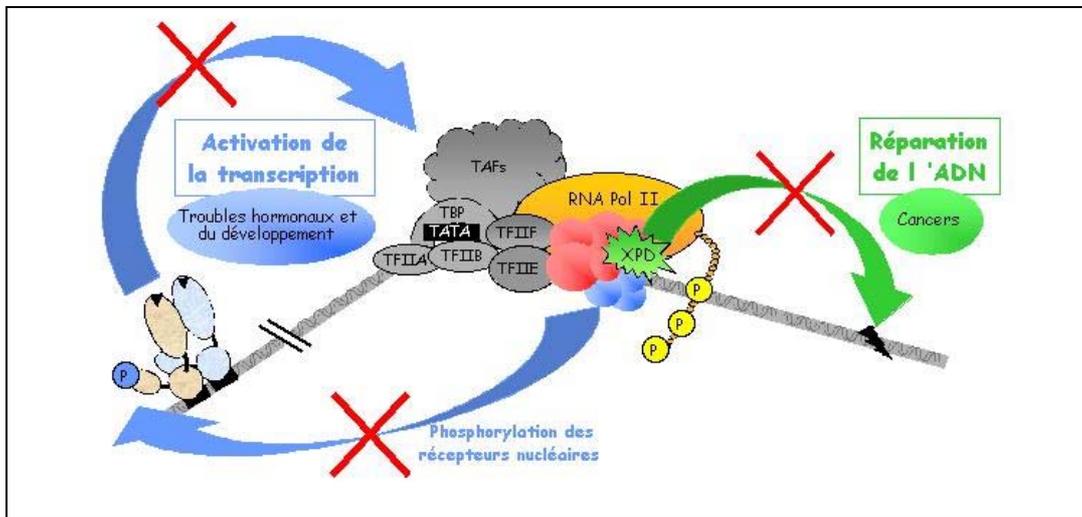
PUBLICATION 4

Étude de l'effet de mutations dans la sous-unité XPD de TFIIH lors de l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires

Ce projet a pris naissance suite au regroupement de plusieurs observations. Il avait d'une part été montré que la kinase de TFIIH était capable de phosphoryler certains récepteurs nucléaires, comme le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR α et RAR γ) ou le récepteur aux œstrogènes (ER α), et que cette phosphorylation est indispensable pour l'activation de la transcription de leur gène cible (Rochette-Egly *et al.*, 1997; Bastien *et al.*, 2000 et Chen *et al.*, 2000). D'autre part, des mutations dans la sous-unité hélicase XPD de TFIIH peuvent être à l'origine de maladies génétiques rares, la Trichothiodystrophie (TTD) et le *Xeroderma pigmentosum* (XP), dont certains phénotypes pourraient trouver une explication dans l'altération de la transcription. En effet, la TTD, qui se caractérise par des cheveux cassants, une peau écaillée, des retards mentaux et physiques, des anomalies du squelette et une neurodysmyélination, est vraisemblablement liée au dysfonctionnement de la transcription et, dans une moindre mesure, de la réparation de l'ADN. Le XP, qui est principalement caractérisé par une très forte photosensibilité et un risque de 1000 à 4000 fois supérieur à la normale de développer des cancers de la peau, est quant à lui uniquement attribué à une déficience de la réparation de l'ADN. Cependant, certains phénotypes supplémentaires du XP, comme des troubles hormonaux et des retards de développement, ne peuvent pas s'interpréter en termes de défaut de réparation et pourraient trouver une explication dans l'altération de la transcription de certains gènes. Nous avons donc cherché à savoir si des mutations dans l'hélicase XPD pouvaient perturber le rôle de TFIIH lors de la régulation de l'expression des gènes par les récepteurs nucléaires.

Nous avons mesuré l'activation de la transcription d'un gène rapporteur dans différentes lignées cellulaires dérivées de patients XP ou TTD et portant des mutations à différentes positions du gène *xpd*. Ces études ont révélé que des altérations dans la protéine XPD inhibent la transactivation par les récepteurs nucléaires RAR, ER et AR (récepteur aux androgènes). Nous avons également démontré que ces altérations déstabilisent le complexe TFIIH, et plus particulièrement le pontage entre les deux sous-complexes CAK et "cœur", n'autorisant de ce fait pas la phosphorylation des récepteurs nucléaires par la kinase de TFIIH. L'implication de ces observations pour la compréhension des

mécanismes d'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires sera discutée dans le chapitre VII (page 116).



L'altération de la régulation des gènes dépendants de l'acide rétinoïque ou de certaines hormones pourrait donc fournir une explication à certains phénotypes, comme des retards de développement et une stérilité, observés chez les patients portant des mutations dans la protéine XPD (figure ci-dessus). Les expériences en cours permettront d'établir s'il existe une corrélation entre la position de la mutation dans le gène *xpd*, l'amplitude de l'altération de la transcription et, par conséquent, la sévérité de certains phénotypes observés chez les patients XP ou TTD.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

XPD Mutations Prevent TFIIH-Dependent Transactivation by Nuclear Receptors and Phosphorylation of RAR α

Anne Keriél, Anne Stary, Alain Sarasin, Cécile Rochette-Egly and Jean-Marc Egly

Cell, 2002, Vol. 109, Pages 125-135

Pages 125-135 :

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00692-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00692-X)
- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

RESULTATS NON PUBLIES

1- EFFETS D'UNE MUTATION DANS LA SOUS-UNITE CDK7 DE TFIIF SUR LA PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE.

La présence d'une activité activatrice des cdk (CAK) au sein de TFIIF (Feaver *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1994, Fisher *et al.*, 1995; Serizawa *et al.*, 1995; Shiekhattar *et al.*, 1995) suggère un rôle de ce facteur de transcription-réparation dans la régulation du cycle cellulaire par l'activation directe des cdk. Cependant, des éléments permettent de douter de la réalité de la fonction de cdk7 dans l'activation des cdk *in vivo*, chez les eucaryotes supérieurs (voir discussion, page 109). Nous avons donc voulu tester une éventuelle fonction de cdk7 dans la régulation du cycle cellulaire des cellules animales.

Pour cela nous avons sur-exprimé cdk7 dans des cellules HeLa, soit dans sa forme sauvage soit une forme mutante, dont le site de fixation à l'ATP est modifié (K41R) et dont l'activité enzymatique est abolie. Les cellules ont donc été co-transfectées avec un vecteur expression eucaryote, p513-cdk7 ou p513-cdk7/K41R, et un vecteur d'expression de la GFP fusionnée à une protéine membranaire, la spectrine, ce qui permet l'ancrage de la GFP à la membrane plasmique et prévient sa diffusion lors de la perméabilisation des cellules. Les cellules sont ensuite synchronisées par traitement à l'aphidicoline (arrêt en phase G1 du cycle cellulaire) ou au nocodazole (arrêt à la transition G2/M), puis relâchée par élimination de ces molécules du milieu. La fluorescence engendrée par la GFP est alors utilisée comme marqueur de transfection lors de l'analyse du contenu en ADN des cellules (qui caractérise les différentes phases du cycle cellulaire) par FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Cette approche permet d'observer la reprise (ou non) du déroulement du cycle cellulaire en fonction de la présence d'une forme mutante de cdk7.

Les cellules synchronisées à la transition G2-M par le nocodazole peuvent, après élimination de la drogue, redémarrer un cycle cellulaire et s'accumulent successivement en phase G1, puis en phase S et enfin, reviennent en phase G2 (figure 37). Nous n'avons pas observé de différence significative de ce profil entre les cellules transfectées par le vecteur p513 vide et celles qui sur-expriment cdk7 ou cdk7/K41R.

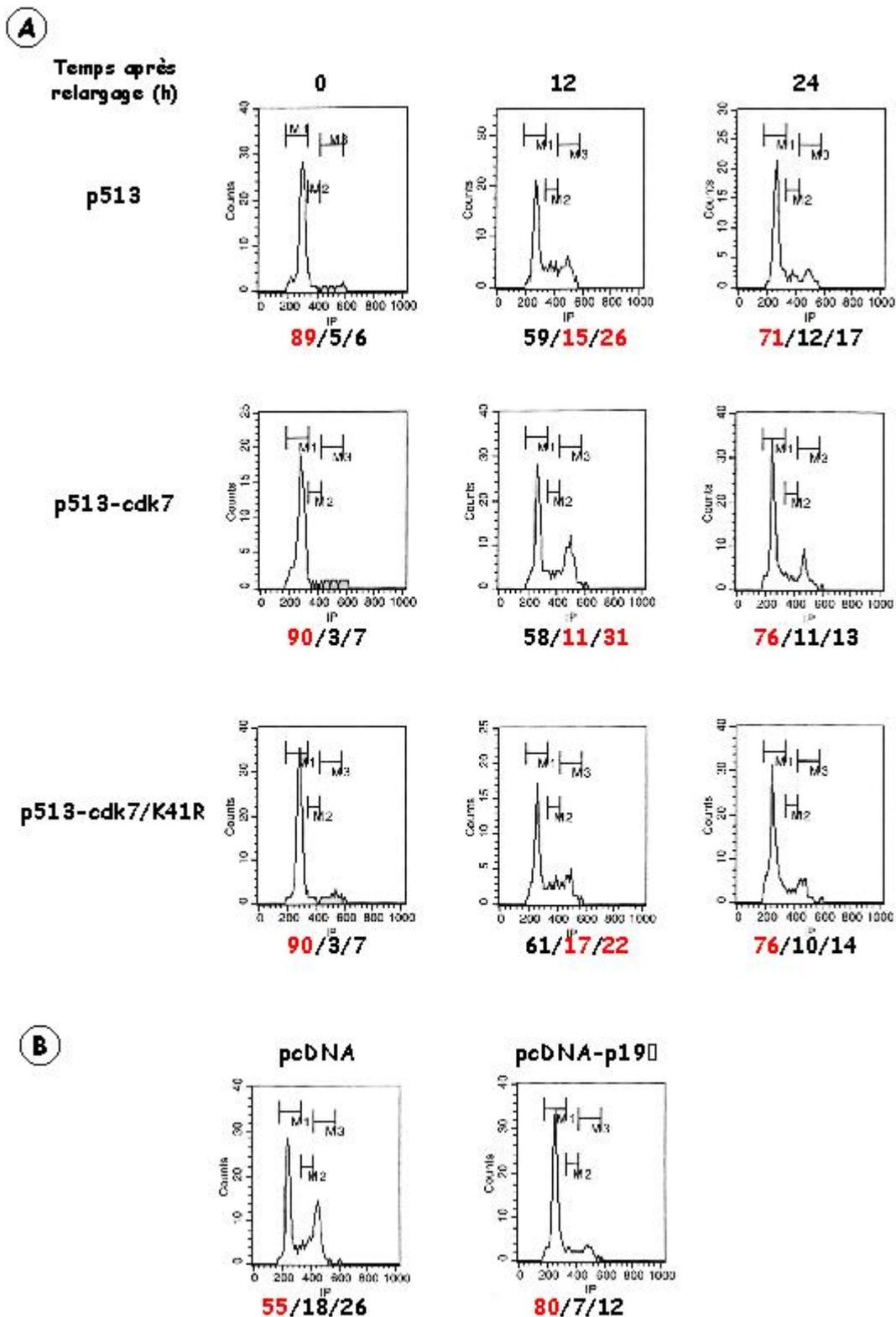


Figure 38 : **Effet du traitement à l'aphidicoline sur des cellules sur-exprimant une forme mutée de cdk7.** A) Après transfection par p513, p513-cdk7 ou p513cdk7/K41R, les cellules HeLa sont synchronisées par traitement à l'aphidicoline puis relarguées et récoltées 0, 12 ou 24 heures plus tard pour analyse par FACS de leur contenu en ADN. B) Comme pour (A), les cellules sont synchronisées après transfection par pcDNA ou pcDNA-p19 et récoltées 12 h après leur relargage. Les chiffres correspondent à la proportion des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire : G1/S/G2-M (en % des cellules totales).

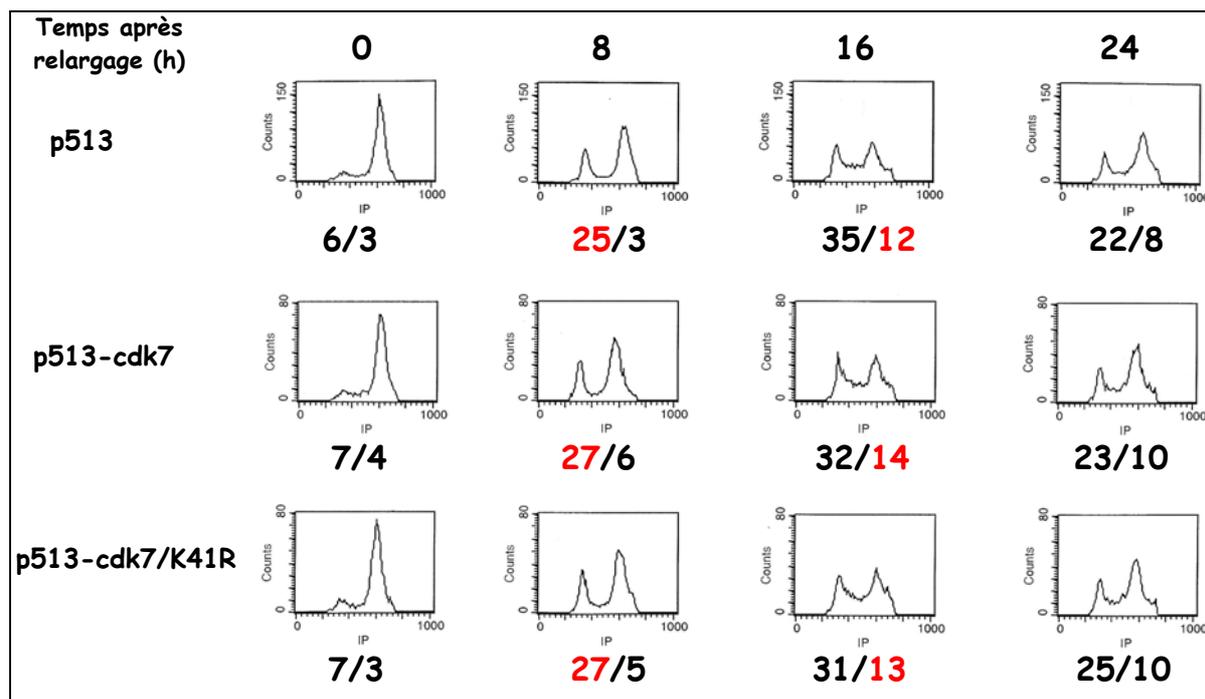


Figure 37 : Effet du traitement au nocodazole sur des cellules sur-exprimant une forme mutée de *cdk7*. Après transfection par le vecteur p513, p513-cdk7 ou p513cdk7/K41R, les cellules HeLa sont synchronisées par traitement au nocodazole puis relarguées et récoltées 0, 8, 16 ou 24 heures plus tard pour analyse par FACS de leur contenu en ADN. Les chiffres correspondent à la proportion des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire : G1/S/G2-M (en % des cellules totales).

De la même manière, après synchronisation des cellules en phase G1 par l'aphidicoline, certaines d'entre-elles arrivent à redémarrer un cycle et il n'est pas possible d'observer des différences entre les cellules transfectées par p513, p513-cdk7 ou p513-cdk7/K41R (figure 38), suggérant que *cdk7* ne participe pas au contrôle du cycle cellulaire. L'analyse par western-blot des extraits totaux de cellules transfectées montre que les protéines *cdk7* et *cdk7/KR* sont effectivement sur-exprimées dans celles-ci (figure 39), démontrant que l'on ne peut pas attribuer l'absence d'effet de la mutation dans *cdk7* sur le cycle cellulaire à un défaut de sur-expression de la protéine.

Il faut noter que la sur-expression de p19 (l'inhibiteur de *cdk4*) est suffisante pour arrêter le cycle en phase G1 (figure 38), ce qui montre que la sur-expression d'une protéine régulatrice du cycle cellulaire est une approche efficace pour observer son effet sur le déroulement du cycle.

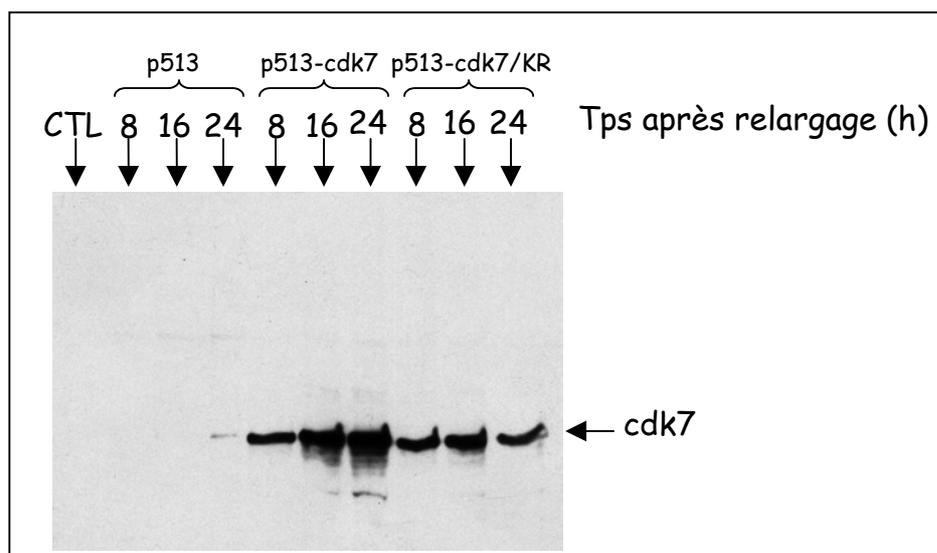


Figure 39 : Sur-expression de cdk7 dans les cellules HeLa. Western-blot sur des extraits totaux de cellules HeLa transfectées par le vecteur p513, p513-cdk7 ou p513cdk7/K41R puis synchronisées par traitement au nocodazole et récoltées 8, 16 ou 24 heures après leur relargage. CTL = extrait de cellules HeLa non transfectées.

Matériels et méthodes

Les cellules HeLa sont ensemencées sur des boîtes de pétri (diamètre 60 mm) à raison de 1.10^6 par boîte dans du milieu DMEM + 5% FCS + 40 μ g/ml gentamycine. Une heure après l'ensemencement, les cellules sont co-transfectées, par la méthode de précipitation de l'ADN au phosphate de calcium, avec 1 μ g de pSG5-GFP/spectrine et 1 μ g de p513 vide, de p513-cdk7, de p513-cdk7/K41R, de pcDNA vide ou de pcDNA-p19. 24h après le début de la transfection, les cellules sont synchronisées par traitement à l'aphidicoline (1 μ g/ml, 24h) ou au nocodazole (100 ng/ml, 15h), puis "relarguées" par remplacement du milieu de culture. Après un lavage au PBS, les cellules sont récoltées 0, 8, 12, 16 ou 24h après leur relargage. Enfin, les cellules sont fixées et perméabilisées dans l'éthanol 70% (4°C, 5 heures) puis marquées à l'iodure de propidium (4°C, O/N) pour l'analyse de leur contenu en ADN par FACS.

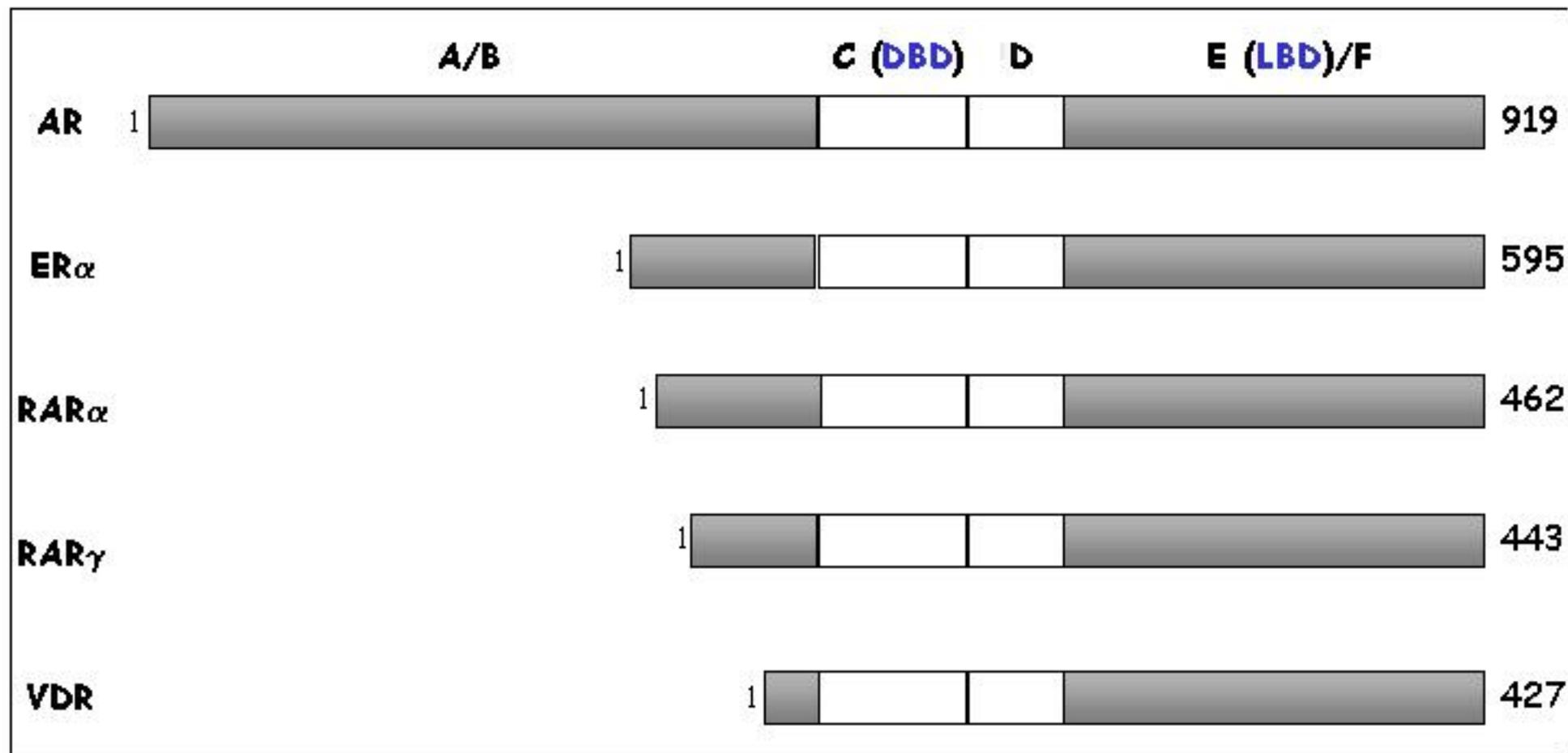


Figure 40 : **Conservation des différentes régions entre plusieurs récepteurs nucléaires.** Les différentes régions des récepteurs AR, ER α , RAR α , RAR γ et VDR sont alignées verticalement pour mettre en évidence la grande variabilité de la taille de la région A/B. Au contraire, les régions C (qui porte la fonction de liaison à l'ADN ou DBD) et E (liaison du ligand ou LBD) sont très conservées, tant en taille qu'en séquence.

2- EFFETS D'UNE MUTATION DANS SOUS-UNITE XPD DE TFIIH SUR LA TRANSACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LE RECEPTEUR DE LA VITAMINE D (VDR).

L'extrémité amino-terminale (région A/B) des récepteurs nucléaires est la région la moins conservée au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires, tant en termes de séquence (moins de 15% d'homologie) qu'en termes de taille (de 23 à plus de 600 résidus). Cette région A/B apparaît cependant de plus en plus importante pour la fonction des différents récepteurs nucléaires. A titre d'exemple, les différentes isoformes d'un récepteur donné divergent entre elles par leur extrémité amino-terminale et on sait que ces différentes isoformes ont des activités transactivatrices et des fonctions bien définies dans différents types cellulaires (voir page 25). Par ailleurs nous avons démontré que la phosphorylation par TFIIH de résidus sérine présents dans la région A/B de plusieurs récepteurs nucléaires était essentielle à leur activité transactivatrice (publication 4).

Etant donnée la grande variabilité de la région A/B, nous nous sommes posé la question de savoir si tous les récepteurs nucléaires devaient être phosphorylés par TFIIH pour pouvoir correctement activer la transcription en présence de leur ligand. Nous nous sommes donc demandé si TFIIH était également impliqué dans le mécanisme de transactivation par le récepteur de la vitamine D (VDR) car celui-ci possède la région A/B la plus courte parmi les récepteurs nucléaires (23 résidus, figure 40) et ne semble pas contenir de site de phosphorylation par TFIIH similaire à ceux observés dans le cas de $RAR\alpha$, $RAR\gamma$ ou $ER\alpha$ (figure 41).

Pour répondre à cette question, nous avons mesuré la transactivation d'un gène rapporteur placé sous la dépendance d'un élément de réponse au VDR (VDRE) dans les cellules HeLa ou les cellules HD2. Les cellules HD2 portent la mutation R683W dans la sous-unité XPD de TFIIH qui altère le pouvoir de phosphorylation de TFIIH envers plusieurs récepteurs nucléaires et, par conséquent, leur fonction transactivatrice (publication 4). Après co-transfection des cellules par le vecteur rapporteur et un vecteur de normalisation exprimant la β -galactosidase, celles-ci sont traitées avec le ligand de VDR, la vitamine D3, et l'expression du gène rapporteur est mesurée. Dans la mesure où l'expression endogène du récepteur est difficilement visualisable et quantifiable par western blot (figure 42A), nous avons également sur-exprimé VDR en co-transfectant les cellules par un vecteur d'expression de ce récepteur.

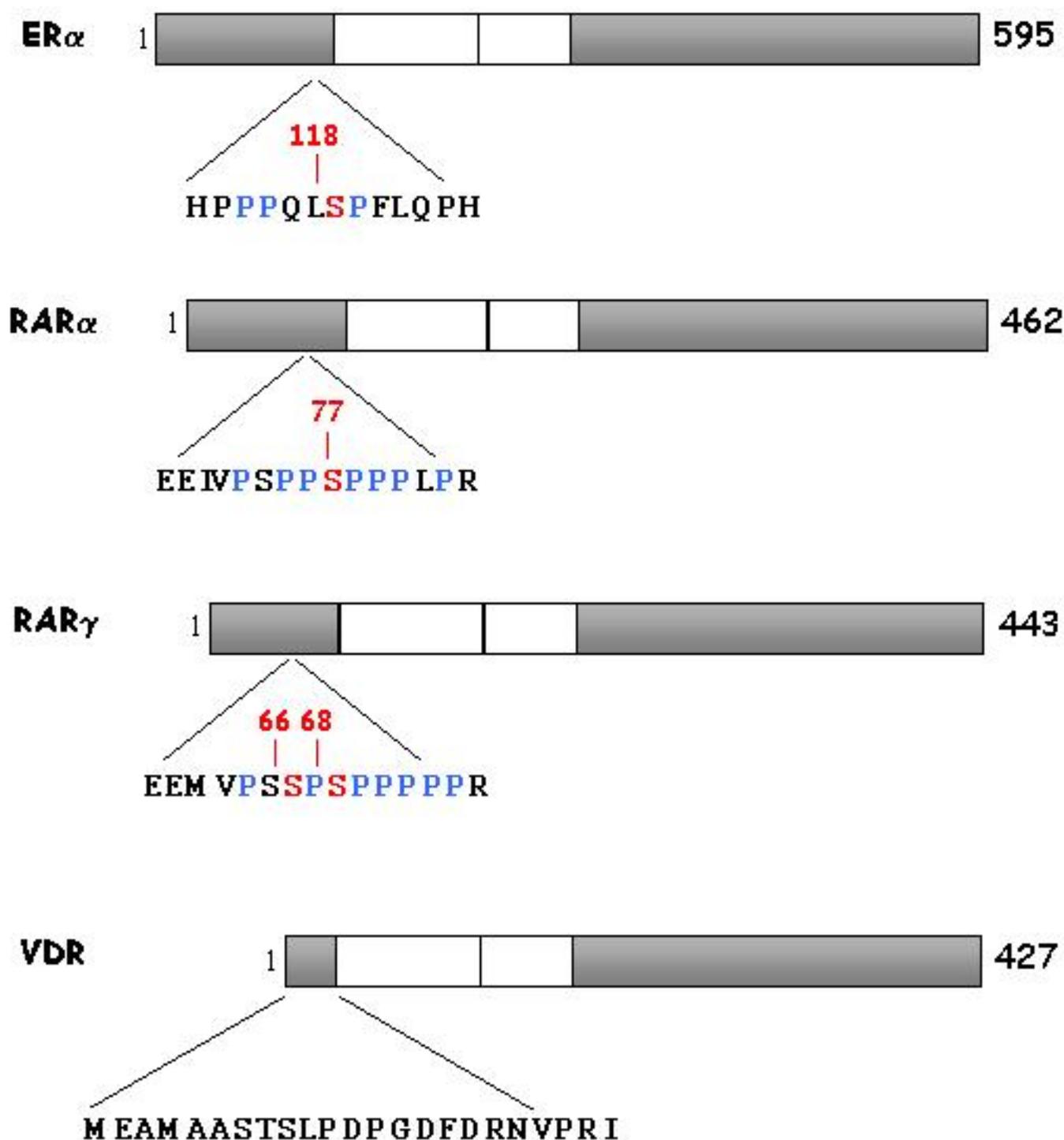


Figure 41 : **Sites de phosphorylation des récepteurs nucléaires par TFIIH.** Les sites spécifiques de phosphorylation des récepteurs ER α , RAR α et RAR γ par la kinase de TFIIH ont été identifiés. Il s'agit de résidus sérine qui ont la particularité d'être entourés de plusieurs résidus proline. En bas de la figure, la séquence complète de la région A/B du récepteur VDR montre qu'un tel site de phosphorylation ne semble pas être présent.

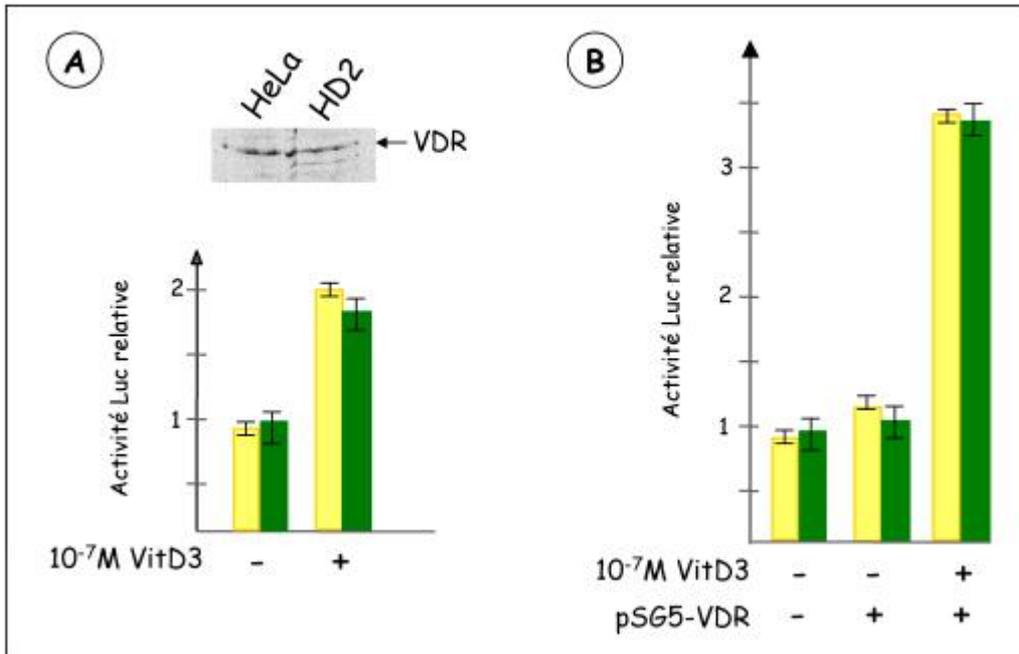


Figure 42 : **Activation de la transcription par VDR dans des cellules déficientes en TFIIH.** A) Mesure de l'activité transactivatrice du récepteur VDR exprimé endogènement dans les cellules HeLa (sauvage) et HD2 (portant une mutation dans la sous-unité XPD de TFIIH). L'analyse par western-blot montre de les cellules contiennent une quantité faible mais équivalente de VDR endogène. B) Mesure de l'activité transactivatrice du récepteur VDR sur-exprimé dans les cellules HeLa et HD2.

Dans des cellules ne sur-exprimant pas VDR, la présence de la vitamine D stimule l'expression du gène rapporteur de l'ordre de 2 fois dans les cellules sauvages et les cellules HD2 (figure 42A). La sur-expression de VDR permet une plus grande transactivation (environ 3,5 fois) que ce soit dans les cellules sauvages ou les cellules déficientes en XPD (figure 42B). L'activation de la transcription d'un gène cible de VDR n'est donc pas significativement différente que le TFIIH soit altéré ou non, suggérant qu'il ne participe pas au mécanisme de transactivation par ce récepteur nucléaire.

Matériels et méthodes

L'élément de réponse du récepteur à la vitamine D (VDRE) de type DR4 (AGGTCAcaggAGGTCA) est généré par hybridation de deux oligonucléotides (5'-cTTCAGGTCAcaggAGGTCAgagac-3' et 5'-tcgagctctcTGACCTcctgTGACCTGAaggta-3') puis inséré entre les sites KpnI et XhoI du vecteur pGL3-promoter (Promega), en amont du promoteur SV40 et du gène Luc.

Les cellules Hela et HD2 sont entretenues dans le milieu DMEM + 10% FCS + 40µg/ml gentamycine et sont ensemencées 1 heure avant la transfection à raison de 1.10⁶ cellules/boîte

de 60mm. Les cellules sont ensuite co-transfectées, par la méthode de précipitation au phosphate de calcium, avec 1µg de vecteur rapporteur (pVDRE-Luc), 100ng de pSG5 vide ou de pSG5-VDR et, comme contrôle interne de l'efficacité de transfection, 1µg du vecteur pCH110 (Invitrogen) qui code pour la β-galactosidase. Après 16 heures d'incubation, les cellules sont traitées à l'éthanol ou par 10⁻⁷M de 1,25-dihydroxyvitamine D3 (VitD3) pendant 24h dans du milieu sans rouge de phénol et contenant 10% de sérum traité au charbon de bois. Les cellules sont ensuite récoltées et lysées, et l'activité luciférase est mesurée grâce à un luminomètre (Microlumat LB96P luminometer, EG&G Berthold, Germany) et ajustée à l'activité β-galactosidase.

3- EFFETS D'UNE MUTATION A L'EXTREMITE AMINO-TERMINALE DE LA SOUS-UNITE XPD DE TFIIH SUR LA TRANSACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LE RECEPTEUR A L'ACIDE RETINOIQUE (RAR).

Nous avons montré que des mutations dans la sous-unité XPD de TFIIH inhibait l'activation de la transcription par le récepteur nucléaire RAR (publication 4). Cet effet est dû à une défaillance structurale de TFIIH. En effet, l'ancrage du CAK au cœur de TFIIH, une fonction dévolue en partie à la sous-unité XPD, est affaibli. Nous savons par ailleurs que les deux mutations étudiées, toutes deux localisées à l'extrémité carboxy-terminale de XPD, ont pour effet d'affaiblir l'interaction entre XPD et la sous-unité p44, qui maintien XPD associée au cœur de TFIIH (S. Dubaele, manuscrit en préparation). Nous avons donc voulu savoir si une mutation à l'extrémité amino-terminale de XPD (dont on sait qu'elle n'affecte pas l'interaction XPD-p44) pouvait également avoir un effet sur la fonction transactivatrice de RAR.

Pour cela, nous avons mesuré la transactivation d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de RAR dans différentes lignées cellulaires portant une mutation à l'extrémité carboxy- ou amino-terminale de XPD. Après insertion du vecteur rapporteur dans les cellules, celles-ci sont traitées avec l'acide rétinoïque et l'expression du gène rapporteur est mesurée.

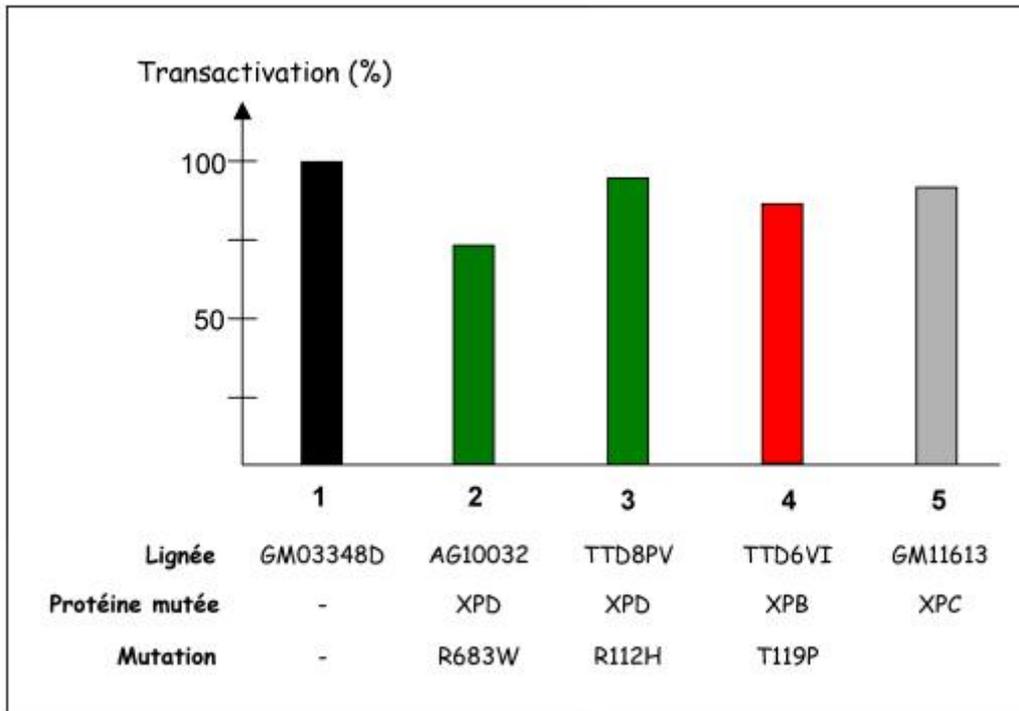


Figure 43 : **Activation de la transcription par RAR dans différentes lignées cellulaires.** Mesure de la transactivation de l'expression d'un gène rapporteur en réponse à l'acide rétinoïque (10^{-6} M t-RA) dans des fibroblastes primaires portant des mutations dans différentes protéines. Les valeurs de transactivation sont exprimées en pourcentages, 100% étant la valeur d'activation de la transcription (rapport absence/présence ligand) observée dans les cellules sauvages.

En accord avec nos précédentes observations, la mutation R683W (également présente dans la lignée HD2) inhibe l'activation de la transcription du gène rapporteur (figure 43, ligne 1). Il faut noter que cette lignée cellulaire est issue du patient atteint de *Xeroderma pigmentosum* qui ne répond pas au traitement à l'acide rétinoïque qui vise à freiner l'apparition de cancers de la peau chez ces patients (voir discussion de la publication 4). A l'inverse, une lignée cellulaire portant une mutation à l'extrémité amino-terminale de XPD ne semble pas présenter de défaut d'activation de la transcription par RAR (ligne 3). Nous avons également mesuré la transactivation du gène rapporteur dans des lignées portant une mutation dans la sous-unité XPB de TFIIH ou dans XPC, une protéine qui est aussi impliquée dans l'apparition du *Xeroderma pigmentosum*, et constaté que la transactivation par RAR n'y était pas altérée (lignes 4 et 5). Ces observations suggèrent que seules les mutations à l'extrémités carboxy-terminale de la sous-unité XPD de TFIIH, qui déstabilisent le complexe, affectent l'activation de la transcription par RAR.

Matériels et méthodes

Les fibroblastes sont entretenus dans du milieu DMEM + 10% FCS + 40 μ g/ml gentamycine et sontensemencées à raison de 200000 cellules/puit (30 mm de diamètre). Lorsqu'elles atteignent 60-70% de confluence, les cellules sont transfectées par la Lipofectamine (Invitrogen) avec 1 μ g de vecteur rapporteur (pRARE-Luc) puis sont traitées à l'éthanol ou par 10⁻⁶M d'acide rétinoïque tout-trans (t-RA) pendant 24h dans du milieu sans rouge de phénol et contenant 10% de sérum traité au charbon de bois. Les cellules sont ensuite récoltées et lysées, et les activités luciférase sont mesurées grâce à un luminomètre (Microumat LB96P luminometer, EG&G Berthol). Chaque point est répété 4 fois et les valeurs représentent les moyennes des valeurs obtenues lors de 4 expériences indépendantes.

CHAPITRE VII- DISCUSSION

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire de thèse illustre l'importance de l'intégrité de TFIIH, un complexe multiprotéique impliqué dans plusieurs phénomènes essentiels à la survie d'une cellule, pour la fonction d'une seule de ces sous-unités : la kinase cdk7. Ces études ne nous ont cependant pas permis de répondre à deux questions : 1) cette kinase est-elle responsable du contrôle du cycle cellulaire dans les cellules animales ? et 2) quelle est sa fonction précise dans le mécanisme de régulation de la transcription par les activateurs transcriptionnels de la famille des récepteurs nucléaires ? Ces deux questions sont abordées successivement ci-dessous.

1- CDK7 CONTROLE T'ELLE LE CYCLE CELLULAIRE DANS LES CELLULES ANIMALES ?

Chez les eucaryotes, les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire sont contrôlées, en grande partie, par les kinases dépendantes des cyclines (cdk). Pour être actives, les cdk doivent s'associer à une cycline et être phosphorylées par une kinase portant le nom générique "CAK" (*cdk-activating kinase*). En 1993, plusieurs équipes travaillant sur des cellules animales ont isolé simultanément la CAK (Fesquet *et al.*, 1993; Poon *et al.*, 1993; Solomon *et al.*, 1993). La kinase identifiée présente plusieurs caractéristiques remarquables : elle est capable d'activer, *in vitro*, un spectre assez large de cdk (cdk1, 2, 4 et 6), elle appartient elle-même à la famille des cdk et, en tant que telle, son activité dépend d'une cycline et d'une phosphorylation activatrice. Cette kinase, déjà connue chez le Xénope sous le nom de MO15 (Shuttelworth *et al.*, 1990), a été renommée cdk7. Dans les années qui ont suivi cette découverte, il a été démontré que cdk7 forme un complexe ternaire avec la cycline H et un troisième partenaire, MAT1 (Fisher et Morgan, 1994; Devault *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1995; Tassan *et al.*, 1995; Adamczewski *et al.*, 1996). La découverte que cdk7, cycline H et MAT1 sont trois sous-unités de TFIIH (Feaver *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1995; Serizawa *et al.*, 1995; Shiekhattar *et al.*, 1995; Adamczewski *et al.*, 1996) laissa alors penser que ce facteur de transcription-réparation pourrait jouer un rôle direct dans la régulation du cycle cellulaire.

Cependant, des observations permettent de douter de la réalité du rôle de cdk7 dans l'activation des cdk *in vivo*, chez les eucaryotes supérieurs. Premièrement, l'activité de cdk7 et les niveaux protéiques de cdk7, cycline H et MAT1 restent constants au cours du cycle cellulaire

(Tassan *et al.*, 1994 et Levedakou *et al.*, 1994) ce qui implique que les cdk pourraient être phosphorylées par cdk7 à tout moment du cycle. L'activité de cdk7 en elle-même ne serait donc pas limitante pour la progression du cycle cellulaire. Deuxièmement, CAK est exclusivement nucléaire, excepté pendant la mitose où la membrane nucléaire disparaît et où la CAK est redistribuée dans toute la cellule (Darbon *et al.*, 1994 et Tassan *et al.*, 1994). Or, paradoxalement l'un des substrats de CAK (cdk1), qui est cytoplasmique, est phosphorylée peu avant la mitose.

La situation semble différente chez la levure *S. cerevisiae*. En effet, Kin28, l'homologue de cdk7, appartient également à TFIIH et est responsable de la phosphorylation du CTD de l'ARN pol II (Simon *et al.*, 1986; Valay *et al.*, 1993). Kin28 est donc essentielle à la transcription *in vivo* (Cismowski *et al.*, 1995; Valay *et al.*, 1995) mais ne joue aucun rôle dans la division cellulaire (Cismowski *et al.*, 1995). Chez *S. cerevisiae*, l'activité CAK est dévolue à une kinase appelée Civ1 (pour CAK *in vivo* 1) ou Cak1 (Esponza *et al.*, 1996; Kaldis *et al.*, 1996, Thuret *et al.*, 1996) (table 8). Civ1/Cak1 est une protéine monomérique de 43 kDa qui n'a aucun lien avec TFIIH et est incapable de phosphoryler le CTD de l'ARN pol II (Kaldis *et al.*, 1998). Par contre, cette kinase est essentielle à la viabilité de la cellule et des mutations thermosensibles dans cette protéine provoquent un retard de la phase G2 accompagné d'une diminution, voire une abolition de l'activité kinase de cdc28 (Esponza *et al.*, 1998). Civ1/Cak1 est majoritairement cytoplasmique et son activité ainsi que son niveau protéique restent constants au cours du cycle cellulaire (Kaldis *et al.*, 1998). Il est intéressant de noter que Civ1/Cak1 est également capable de phosphoryler et d'activer Kin28 (Espinoza *et al.*, 1998 et Kimmelman *et al.*, 1999). Chez *S. cerevisiae*, Kin28 est donc la kinase qui est associée à TFIIH, et impliquée dans la régulation de la transcription, alors que Civ1/Cak1 porte la fonction CAK qui contrôle le cycle cellulaire.

Chez la levure *S. pombe*, dont la régulation du cycle cellulaire est plus proche de celle des eucaryotes supérieurs que de celle de *S. cerevisiae*, la situation semble similaire à celle observée dans les cellules animales. Les homologues de cdk7 et de la cycline H sont Mcs6 (aussi appelé Crk1 ou Mop1) et Mcs2, respectivement (Molz et Beach, 1993, Buck *et al.*, 1995; Damagnez *et al.*, 1995). *In vitro*, le complexe Mcs6-Mcs2 phosphoryle aussi bien cdk1 (et l'active en présence de la cycline A) que le CTD de l'ARN pol II et fait partie du complexe TFIIH. Récemment, une protéine capable de phosphoryler et d'activer Mcs6 a cependant été caractérisée et appelée Csk1 (Hermant *et al.*, 1998). Cette protéine est également capable de phosphoryler cdc2 (Lee *et al.*, 1999). Csk1 semble donc jouer à la fois le rôle de CAK et de CAKAK (CAK-Activating Kinase). *S. pombe* semble donc posséder deux activités CAK distinctes.

CAK	Espèce	Références
MO15	Xénope	Shuttleworth <i>et al.</i> , 1990 Poon <i>et al.</i> , 1993 Solomon <i>et al.</i> , 1993
MO15	Etoile de mer (<i>starfish</i>)	Fesquet <i>et al.</i> , 1993
cdk7	Homme	Darbon <i>et al.</i> , 1994 Levedakou <i>et al.</i> , 1994 Tassan <i>et al.</i> , 1994 Williams <i>et al.</i> , 1994 Wu <i>et al.</i> , 1994
cdk7	Souris	Fisher et Morgan, 1994 Matsuoka <i>et al.</i> , 1994
Mcs6	<i>S. pombe</i>	Buck <i>et al.</i> , 1995 Damagnez <i>et al.</i> , 1995
Csk1	<i>S. pombe</i>	Hermand <i>et al.</i> , 1998
Civ1/Cak1	<i>S. cerevisiae</i>	Esponiza <i>et al.</i> , 1996 Kaldis <i>et al.</i> , 1996 Thuret <i>et al.</i> , 1996
Cak1A†	<i>A. thaliana</i>	Umeda <i>et al.</i> , 1998
cdk7	Drosophile	Larochelle <i>et al.</i> , 1998

Table 9. Les sous-unités catalytiques du CAK de différentes espèces.

Chez les plantes, la protéine kinase jouant le rôle de CAK a été identifiée chez *A. thaliana* et chez le riz. La kinase CAK caractérisée chez *A. thaliana*, appelée Cak1A†, montre une activité CAK mais pas d'activité CTD kinase (Umeda *et al.*, 1998). Fonctionnellement, Cak1A† serait donc apparentée à Cak1 de *S. cerevisiae*, mais sa séquence primaire montre plus de similarité avec celle de cdk7. Il n'est donc pas clairement défini si Cak1A† appartient à la famille de Cak1 ou de cdk7. A l'inverse, la kinase CAK caractérisée chez le riz phosphoryle à la fois les cdk et le CTD et s'apparente ainsi fonctionnellement à cdk7 (Yamaguchi *et al.*, 1998).

Il était donc légitime de se poser la question de savoir si cdk7 avait un rôle direct dans le contrôle du cycle cellulaire des cellules animales. Nos expériences ont montré que la sur-expression d'une forme mutante de cdk7 est sans effet sur la progression du cycle cellulaire (page 101). Il faut noter que l'effet inhibiteur de la sur-expression de cette forme mutante de cdk7 avait précédemment été démontré quant à la phosphorylation d'un autre substrat de cdk7, le récepteur nucléaire RAR α (Rochette-Egly *et al.*, 1997). Ces observations semblent indiquer que l'activité de cdk7 n'est pas limitante pour la progression du cycle cellulaire. Nos résultats vont dans le sens des travaux de Vincent Leclerc et ses collaborateurs, qui ont démontré que la sur-expression d'une forme "kinase-dead" de cdk7 chez la drosophile inhibe la transcription mais

n'induit pas de défaut du cycle cellulaire dans l'embryon précoce (Leclerc *et al.*, 2000). Ces observations pourraient trouver une explication dans le fait que, comme chez la levure *S. Pombe*, il existe dans les cellules animales une seconde activité CAK qui est redondante à celle de cdk7. En effet, en 2000, Philip Kaldis et Mark Solomon ont identifié une nouvelle activité CAK dans les cellules humaines (Kaldis et Solomon, 2000). Il s'agit d'une protéine monomérique de 30-40 kDa qui s'apparente plus à Civ1/Cak1 de *S. Cerevisiae* ou à Csk1 de *S. Pombe* qu'à cdk7 en ce sens qu'elle n'est pas capable de phosphoryler l'ARN Pol II.

Cependant, de nombreuses études visant à invalider l'activité de cdk7 dans des organismes animaux ont démontré un rôle de cdk7 dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, l'immunodéplétion de cdk7 supprime l'activité CAK dans des extraits d'œufs de Xénope et engendre l'arrêt de leur cycle cellulaire avant la mitose (Fesquet *et al.*, 1997). La fonction CAK de cdk7 a également été confirmée *in vivo* lors du développement embryonnaire de la Drosophile (Larochelle *et al.*, 1998) et de *C. elegans* (Wallenfang *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'abrogation de l'expression de MAT1, une des deux partenaires de cdk7, par des ARN anti-sens est à l'origine d'un retard de prolifération des cellules musculaires lisses (Wu *et al.*, 1999), des kératinocytes de lapin et des cellules épithéliales humaines fœtales du cristallin (Kampmeier *et al.*, 2000). Cet effet est dû à la fois à un arrêt des cellules en phase G1, à cause d'une inhibition de la phosphorylation pRB par CAK et de l'expression de la cycline E (Wu *et al.*, 2001), et à leur mort par apoptose (Wu *et al.*, 1999). Enfin, l'inactivation du gène de MAT1 chez la souris est létale et mène à la fois à un arrêt du cycle cellulaire en phase S et à un défaut de phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II (Rossi *et al.*, 2001). Il semble donc que cdk7 joue effectivement le rôle de CAK *in vivo* dans les cellules animales. Il reste cependant une question : si cdk7 est la CAK, comment une enzyme qui est exclusivement nucléaire peut activer une cdk qui, elle, est majoritairement cytoplasmique ? Ce problème d'accessibilité des substrats de cdk7 semble être résolu par le fait que, depuis plusieurs années, de nombreuses études ont montré que les complexes cdk-cycline sont relocalisées vers le noyau à différentes phases du cycle cellulaire (pour une revue : Yang et Kornbluth, 1999).

Une autre question qui reste problématique est de savoir si TFIIH est lui-même impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. Cette hypothèse semble écartée par le fait que, lorsqu'elle est intégrée à TFIIH, cdk7 change de spécificité de substrat : au sein du complexe ternaire CAK libre, cdk7 phosphoryle préférentiellement les cdk, alors qu'associée au facteur TFIIH, elle phosphoryle préférentiellement des substrats liés à la transcription (Rossignol *et al.*, 1997; Yankulov et Bentley; 1997). Un rôle direct de TFIIH dans le cycle cellulaire semble donc écarté,

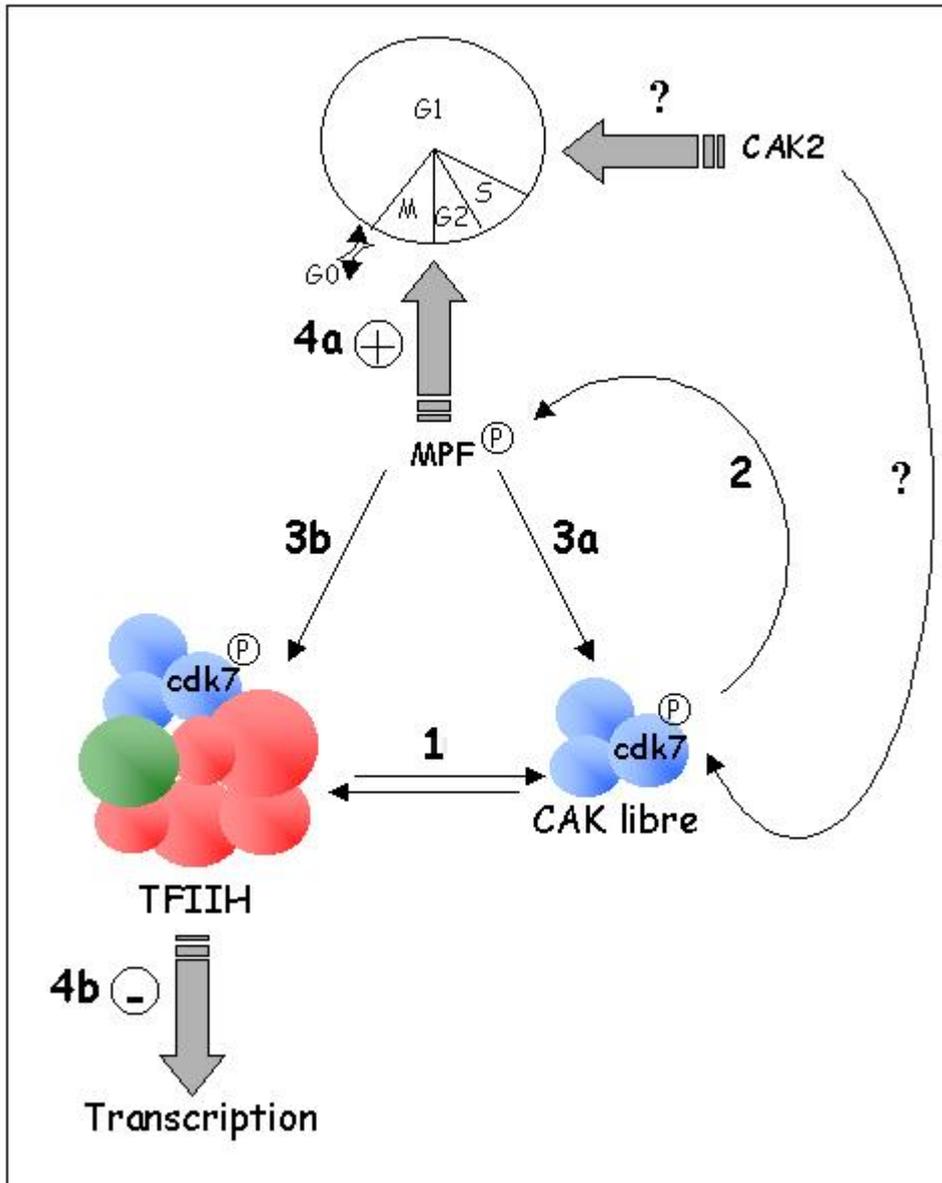


Figure 44 : **Implications de cdk7 dans la régulation du cycle cellulaire.** Ce modèle est basé sur l'existence d'un équilibre entre la forme libre du complexe CAK et sa forme associée à TFIID. Un signal favorisant la dissociation du complexe CAK (1) permettrait une phosphorylation du complexe MPF (cdk1-cyclineB) par cdk7 (2). La phosphorylation de MPF induit l'entrée en mitose (4a) et la phosphorylation de cdk7 (3a et 3b), ce qui stimule l'activité kinase du complexe CAK libre par une boucle rétroactive positive (3a) et inhibe l'activité transcriptionnelle de TFIID (4b). "CAK2" est la seconde activité CAK identifiée dans des cellules animales (Kaldis et Solomon, 2000).

ce qui n'exclut cependant pas un rôle indirect. En effet, si on considère que l'intégration de CAK dans TFIIH diminue la population de CAK libre dans la cellule et constitue donc un moyen de contrôler le cycle cellulaire.

Récemment, il a été montré que l'activité transcriptionnelle de TFIIH est inhibée lors de la mitose et que cette inhibition est concomitante avec une inhibition de l'activité kinase de TFIIH envers le CTD de l'ARN Pol II (Akoulitchev et Reinberg, 1998 et Long *et al.*, 1998). L'inhibition de l'activité kinase de cdk7 à la mitose est due à la phosphorylation de la sérine 164, un résidu situé dans sa boucle T à proximité de la Ser170 (dont la phosphorylation est essentielle à l'activation des cdk, voir page 49) (Akoulitchev et Reinberg, 1998). Il est intéressant de noter qu'au contraire, dans le contexte du complexe CAK libre, la phosphorylation des ces deux résidus (Ser164 et Ser170) par le complexe cdk1-cycline B (ou MPF, pour *mitose promoting factor*) stabilise le complexe ternaire (Larochelle *et al.*, 2001) ce qui stimule en retour la phosphorylation de cdk1 par cdk7 (Garrett *et al.*, 2001). On peut donc en conclure que la phosphorylation de cdk7 par cdk1 affecte différemment l'activité de cdk7 selon qu'elle est présente ou non au sein de TFIIH. Il est en effet concevable que l'activité de cdk7 associée à TFIIH (envers les éléments de la machinerie transcriptionnelle) soit régulée au cours du cycle cellulaire alors que son activité au sein du CAK libre (envers les cdk) reste constante.

On peut donc imaginer un modèle où le lien entre la régulation du cycle cellulaire et la transcription est constitué par un équilibre instable entre la forme libre du complexe CAK et sa forme associée à TFIIH. Un signal favorisant la dissociation du complexe CAK permettrait une phosphorylation préférentielle des cdk, dont le complexe MPF (cdk1-cyclineB), par cdk7 (figure 44). La phosphorylation de MPF induit l'entrée en mitose et la phosphorylation de cdk7 par une boucle rétroactive, ce qui 1) stimule l'activité kinase du complexe CAK libre et 2) inhibe l'activité transcriptionnelle de TFIIH. On peut enfin imaginer que le cycle cellulaire puisse également être sous le contrôle de la seconde activité CAK (appelée "CAK2" pour ce modèle) identifiée dans les cellules animales (Kaldis et Solomon, 2000). On peut aussi se demander si, comme dans le cas de Csk1 chez *S. Pombe*, CAK2 est également capable d'activer cdk7 par phosphorylation (activité CAKAK). Il reste enfin à déterminer si l'équilibre instable entre la forme libre et la forme associée à TFIIH existe ou si ces deux complexes sont des entités stables et indépendantes dans la cellule.

2- RÔLE DE TFIIH DANS LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LES RÉCEPTEURS NUCLEAIRES.

L'apparition de cancers résulte de l'accumulation de mutations et/ou d'aberrations chromosomiques qui peuvent mener à un défaut d'expression des gènes. La rapidité d'évolution en cancer ("carcinogénèse") est déterminée par le nombre de mutations génétiques et épigénétiques produites et par la rapidité avec laquelle celles-ci sont reproduites. Des maladies génétiques liées au défaut d'un des facteurs qui réparent des lésions de l'ADN, avant que celles-ci ne soient introduites dans le génome sous la forme de mutations, sont donc d'excellents modèles d'étude du développement des cancers.

Le *Xeroderma pigmentosum* (XP), qui est lié à une déficience de TFIIH et se caractérise par l'apparition fréquente et précoce de tumeurs cutanées, était donc considéré comme un bon modèle d'étude des cancers de la peau. Mais les cellules issues de patients XP se sont également révélées être d'excellents modèles pour l'étude du mode d'action des récepteurs nucléaires dans la régulation de la transcription. En effet, TFIIH ayant déjà montré sa capacité à phosphoryler *in vitro* certains récepteurs nucléaires et le fait que le XP se caractérise également par des anomalies du développement, des problèmes de stérilité et diverses formes de troubles neurologiques, nous nous sommes demandé si des mutations dans TFIIH pouvaient altérer le mode de régulation de la transcription par ces récepteurs nucléaires. Ainsi, nous avons démontré que :

1) Des mutations dans la sous-unité XPD de TFIIH perturbent la fonction de certains récepteurs nucléaires (publication 4). En effet, l'activation de la transcription des gènes placés sous leur contrôle est restreinte dans des lignées cellulaires issues de malades. Cette déficience est directement liée à l'altération de la sous-unité XPD puisque la sur-expression d'une forme sauvage de cette protéine restaure la réponse hormonale et, donc, le mécanisme de transactivation.

2) Ce défaut est également lié à l'altération de la fonction de phosphorylation de TFIIH envers les récepteurs nucléaires. En effet, ayant constaté une diminution du niveau de phosphorylation de certains récepteurs nucléaires dans les cellules de ces patients, nous étions à même de restaurer la régulation hormonale en sur-exprimant une forme constitutivement phosphorylée de l'un d'entre eux.

Ainsi, nous avons établi une corrélation directe entre une mutation dans la sous-unité XPD de TFIIH, un défaut d'activation de la transcription en réponse à des hormones et un manque de phosphorylation des récepteurs nucléaires par TFIIH. Ces observations permettent de décrypter une partie du mécanisme de transactivation par les récepteurs nucléaires, en particulier la

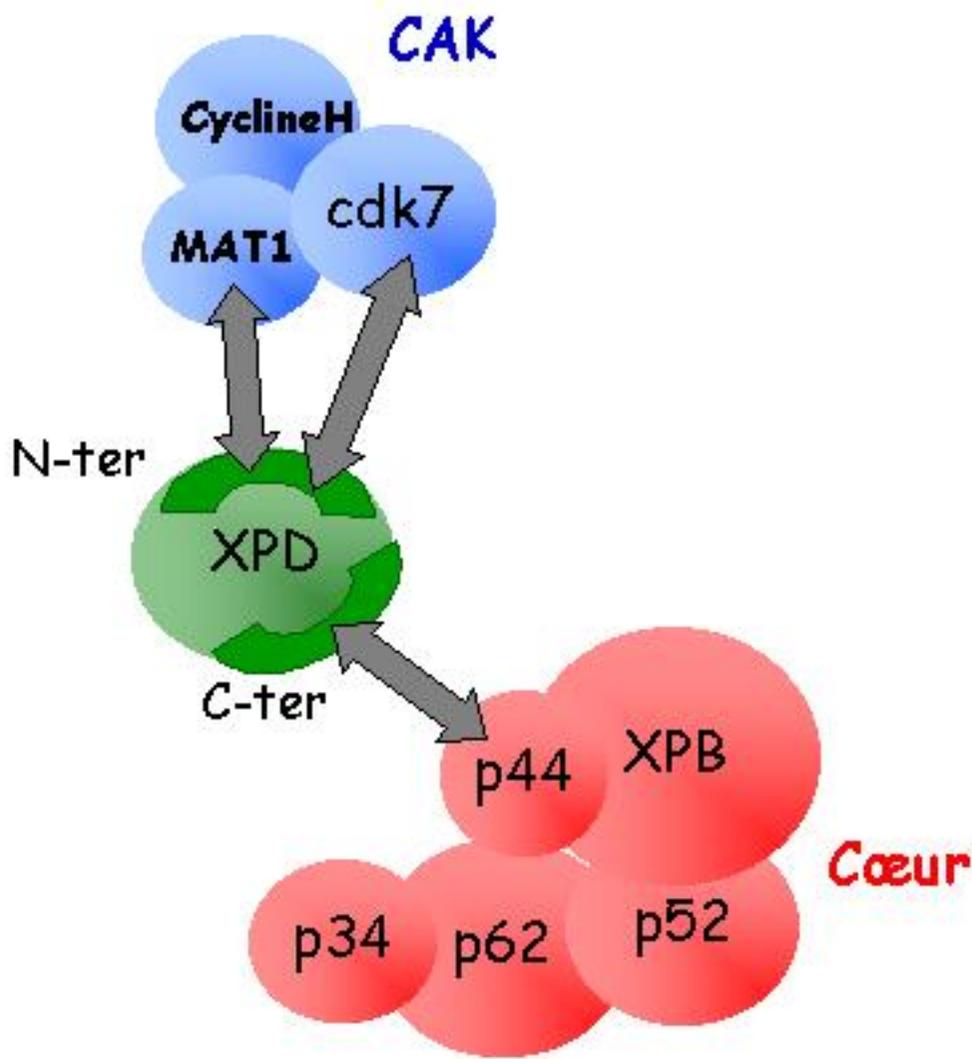


Figure 45 : **Modèle d'ancrage des deux sous-complexes de TFIIH par sa sous-unité XPD.**

nécessité de leur phosphorylation par TFIIH pour l'activation de la transcription en réponse à leur ligand. Par ailleurs, l'altération de la régulation des gènes dépendants des hormones pourrait fournir une explication à certaines manifestations observées chez les patients portant des mutations dans la protéine XPD.

Dans cette étude, nous avons conforté le rôle de la protéine XPD comme facteur de pontage entre les deux sous-complexes de TFIIH et démontré qu'une mutation dans cette protéine altère la fonction spécifique d'une sous-unité distincte de TFIIH, la kinase cdk7. Ces résultats mettent donc en évidence un rôle à cette fonction structurale, pas seulement au niveau du complexe TFIIH, mais dans un contexte plus large et complexe qui est celui de la régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires. Enfin, ces observations nous ont conduit à nous poser deux questions : 1) est-ce que toutes les mutations identifiées dans la protéine XPD altèrent l'activité transactivatrice d'un récepteur nucléaire donné ? et 2) est-ce que tous les récepteurs nucléaires sont affectés par une altération de TFIIH ?

Nous avons par la suite démontré que, contrairement aux mutations carboxy-terminales, une mutation située à l'extrémité amino-terminale de la protéine XPD n'affecte pas la régulation de la transcription par RAR. Nous savons également que seules les mutations carboxy-terminales dans XPD affectent son interaction avec la sous-unité p44 de TFIIH (S. Dubaele, manuscrit en préparation). Il avait par ailleurs déjà été montré dans notre laboratoire que les mutations dans p44 qui affectent son interaction avec XPD affectent également la capacité du sous-complexe CAK à s'intégrer à TFIIH et à stimuler son activité transcriptionnelle *in vitro* (Seroz *et al.*, 2000). On peut donc en déduire un modèle conformationnel dans lequel l'ancrage des deux sous-complexes de TFIIH fait appel à la sous-unité XPD qui interagit d'une part avec la sous-unité p44 du cœur de TFIIH, par le biais de son extrémité carboxy-terminale, et avec les sous-unités cdk7 et MAT1 du CAK d'autre part, par le biais de son extrémité amino-terminale (B. Sandrock, communication personnelle) (figure 45). Il reste cependant à comprendre de quelle manière la fragilisation de cet ancrage peut affecter la phosphorylation des récepteurs nucléaires (voir plus bas).

Par ailleurs, il semble que la fonction transactivatrice du récepteur à la vitamine D (VDR), qui a peu de chance d'être la cible d'une phosphorylation par TFIIH (voir page 104), n'est pas affecté par une mutation dans TFIIH. Des approches de phosphorylation *in vitro* nous permettront de déterminer si ce récepteur nucléaire n'est effectivement pas un substrat pour la kinase de TFIIH. La vitamine D régule l'homéostasie du calcium et ses fonctions lors de la prolifération et la différenciation cellulaire (Haussler *et al.*, 1998) et son récepteur est impliqué

dans le développement du squelette (Masuyama *et al.*, 2001). Or, un des phénotypes marquant de certains patients portant une mutation dans TFIIH sont des problèmes de développement du squelette et une fragilité osseuse (due à une mauvaise calcification). L'absence de corrélation entre ces phénotypes et le fait que la fonction de VDR ne semble pas affectée dans des cellules déficientes en TFIIH pourrait s'expliquer par le fait que le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR) contrôle également le développement du squelette. Les études en cours nous permettront de déterminer si TFIIH est aussi intimement lié à la fonction transactivatrice de ce récepteur.

Il reste désormais à déterminer précisément la fonction de la phosphorylation de certains récepteurs nucléaires par TFIIH dans ce mécanisme complexe qu'est la transactivation de la transcription. Il faut en effet déterminer précisément 1) l'étape du mécanisme à laquelle cette phosphorylation se produit et 2) quelle est la fonction de celle-ci.

La première question pose un problème quant à la chronologie des événements. En effet, il semble vraisemblable que cette phosphorylation n'ait lieu qu'après que TFIIH ait été recruté sur le site d'initiation (en même temps que la machinerie transcriptionnelle) suite à la fixation du ligand à son récepteur. Ceci suggère que, contrairement au modèle séquentiel où l'activateur recrute la machinerie transcriptionnelle, il peut également exister une boucle rétroactive où cette machinerie (via TFIIH) active à son tour l'activateur. Plusieurs études semblent cependant indiquer que cette phosphorylation est indépendante de la présence du ligand *in vitro* (Rochette-Egly *et al.*, 1997 et Bastien *et al.*, 2000). Toutefois, on peut imaginer que cette phosphorylation soit limitée par l'accessibilité du substrat, c'est-à-dire que TFIIH ne soit capable de phosphoryler le récepteur nucléaire qu'après avoir été recruté sur le site d'initiation par celui-ci. Dans ce cas, même si la réaction enzymatique en elle-même n'est pas directement dépendante du ligand, la phosphorylation du récepteur par TFIIH dépendrait de la présence du ligand *in vivo*, puisque le recrutement de TFIIH est une des conséquences de la fixation du ligand sur le récepteur. Ce modèle pose néanmoins un autre problème : comment TFIIH, qui est lié à l'ADN au niveau du site d'initiation de la transcription, peut-il interagir avec et phosphoryler le récepteur nucléaire qui, lui, est fixé sur un élément de réponse qui peut être situé à plusieurs kilobases de ce site d'initiation ?

La seconde question est assurément le défi des futures études visant à comprendre le rôle de la phosphorylation des récepteurs nucléaires dans le mécanisme de transactivation. Si on considère que cette phosphorylation a lieu après le recrutement de TFIIH sur le site d'initiation,

on peut d'ores et déjà exclure qu'elle puisse influencer la liaison du ligand, la dimérisation des récepteurs nucléaires ou leur fixation sur leur élément de réponse. Cette conclusion est confortée par le fait que ni la fixation du ligand ni la dimérisation des récepteurs ne requièrent la présence de leur région A/B (Bourguet *et al.*, 2000) et que la phosphorylation de cette région par TFIIH est indépendante de la fixation du récepteur à l'ADN puisque qu'elle a lieu *in vitro* en absence de celui-ci (Publication 4). Une autre hypothèse serait que cette phosphorylation régule le recrutement de co-activateurs transcriptionnels. Il a en effet été montré que l'état de phosphorylation de la région A/B des récepteurs ER α et SF-1 influence leur interaction avec certains de leurs co-activateurs respectifs (Hammer *et al.*, 1999 et Tremblay *et al.*, 1999). Cette idée pose cependant un problème dans le sens où, selon les modèles actuels, le rôle des co-activateurs est de faciliter l'accès à l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle, et le recrutement de ces co-activateurs précède donc celui de TFIIH. Enfin, cette phosphorylation pourrait contrôler une étape de la transactivation qui n'est pas encore connue, mais qui est forcément commune aux différents récepteurs nucléaires RAR, ER et AR qui ont chacun un mode de fonctionnement particulier. Cette étape pourrait par exemple se situer au sein des complexes médiateurs, dont la composition est encore obscure. On sait en effet que le rôle de ces complexes ne se limite pas à un simple recrutement de la machinerie transcriptionnelle, mais qu'ils ont également une activité régulatrice sur la transcription. On sait par exemple que, au sein du complexe médiateur NAT, la kinase cdk8 phosphoryle la sous-unité cycline H de TFIIH ce qui a pour effet d'inhiber la transcription (Akoulitchev *et al.*, 2000). Il est donc envisageable qu'à l'inverse, la fonction limitante qui requiert la phosphorylation de la région A/B de certains récepteurs nucléaires par TFIIH soit portée par une des sous-unités encore non-identifiée de ces complexes médiateurs.

La récente reconstitution de l'activation de la transcription *in vitro* (Dilworth *et al.*, 2000) pourrait permettre de répondre à une partie des questions qui restent en suspens. La réponse à la question "quel est le rôle précis de la phosphorylation des récepteurs nucléaires par TFIIH ?" pourrait clarifier l'implication de la fonction activatrice AF-1 des récepteurs nucléaires. Par ailleurs, l'émergence de la génétique "physiologique", c'est-à-dire l'étude de la fonction des gènes à l'échelle de l'organisme grâce aux souris transgéniques, apportera vraisemblablement des réponses quant à une éventuelle relation génotype-phénotype chez les patients portant des mutations à différentes positions des gènes *xpd* ou *xpb* et atteints de *Xeroderma pigmentosum*, de Trichothiodystrophie ou du syndrome de Cockayne.

LISTE DES PUBLICATIONS

Keriel A., Stary A., Sarasin A., Rochette-Egly C. and Egly J-M. (2002) XPD mutation prevents TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RAR α . *Cell*. 109(1):125-135.

Keriel A. and Egly J-M. (2002) Activation of Cdks by CAK : CAK in TFIIH. In "The CDK-Activating Kinase (CAK)", Ed. P. Kaldis (sous presse).

Busso D.*, **Keriel A.***, Sandrock B., Poterszman A., Gileadi O. and Egly J-M. (2000) Distinct regions of MAT1 regulate cdk7 kinase and TFIIH transcription activities. *J Biol Chem*. 275(30):22815-23 (*co-premiers auteurs).

Lin H., **Keriel A.**, Morales C.R., Bedard N., Zhao Q., Hingamp P., Lefrancois S., Combaret L., Wing S.S. (2000) Divergent N-terminal sequences target an inducible testis deubiquitinating enzyme to distinct subcellular structures. *Mol Cell Biol*. 20(17):6568-78.

Rossignol M., **Keriel A.**, Staub A. and Egly J-M. (1999) Kinase activity and phosphorylation of the largest subunit of TFIIIF transcription factor. *J Biol Chem*. 274(32):22387-92.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hübscher, U., Egly, J. M., and Wood, R. D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified components, *Cell* **80**, 859-868.
- Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B., and Stark, G. R. (1998). The p53 network, *J Biol Chem* **273**, 1-4.
- Akoulitchev, S., Mäkelä, T. P., Weinberg, R. A., and Reinberg, D. (1995). Requirement for TFIIH kinase activity in transcription by RNA polymerase II, *Nature* **377**, 557-560.
- Akoulitchev, S., and Reinberg, D. (1998). The molecular mechanism of mitotic inhibition of TFIIH is mediated by phosphorylation of CDK7., *Genes Dev* **12**(22), 3541-3550.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S., and Reinberg, D. (2000). TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes, *Nature* **407**, 102-6.
- Ali, S., Metzger, D., Bornert, J. M., and Chambon, P. (1993). Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region, *Embo J* **12**, 1153-60.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression, *Nature* **387**, 49-55.
- Allison, L. A., Moyle, M., Shales, M., and Ingles, C. J. (1985). Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases, *Cell* **42**, 599-610.
- Alphey, L., Jimenez, J., White-Cooper, H., Dawson, I., Nurse, P., and Glover, D. M. (1992). *twine*, a *cdc25* homolog that functions in the male and female germline of *Drosophila*, *Cell* **69**, 977-88.
- Althaus, F. R. (1992). Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair, *J Cell Sci* **102**, 663-70.
- Althaus, F. R., Hofferer, L., Kleczkowska, H. E., Malanga, M., Naegeli, H., Panzeter, P. L., and Realini, C. A. (1994). Histone shuttling by poly ADP-ribosylation, *Mol Cell Biochem* **138**, 53-9.
- Andersen, G., Poterszman, A., Egly, J. M., Moras, D., and Thierry, J. C. (1996). The crystal structure of human cyclin H, *FEBS letters* **397**, 65-69.
- Andersen, G., Busso, D., Poterszman, A., Hwang, J. R., Wurtz, J. M., Ripp, R., Thierry, J.-C., Egly, J.-M., and Moras, D. (1997). The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features, *EMBO J* **16**, 958 - 967.
- Andrulis, E. D., Guzman, E., Doring, P., Werner, J., and Lis, J. T. (2000). High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation, *Genes Dev* **14**, 2635-49.
- Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer, *Science* **277**, 965-8.
- Aoyagi, S., Narlikar, G., Zheng, C., Sif, S., Kingston, R. E., and Hayes, J. J. (2002). Nucleosome remodeling by the human SWI/SNF complex requires transient global disruption of histone-DNA interactions, *Mol Cell Biol* **22**, 3653-62.
- Apfel, C. M., Kamber, M., Klaus, M., Mohr, P., Keidel, S., and LeMotte, P. K. (1995). Enhancement of HL-60 differentiation by a new class of retinoids with selective activity on retinoid X receptor, *J Biol Chem* **270**, 30765-72.
- Araujo, S. J., Tirorde, F., Coin, F., Pospiech, H., Syvaaja, J. E., Stucki, M., Hübscher, U., Egly, J. M., and Wood, R. D. (2000). Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK, *Genes Dev* **14**, 349-359.
- Archambault, J., Pan, G., Dahmus, G. K., Cartier, M., Marshall, N., Zhang, S., Dhamus, M. E., and Greenblatt, J. (1998). FCP1, the Rap74-Interacting Subunit of a Human Protein Phosphatase That Dephosphorylates the Carboxy-terminal Domain of RNA Polymerase II, *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 27593-27601.
- Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix, *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10148-52.

- Aso, T., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1995). The RNA polymerase II elongation complex, *FASEB J* 9, 1419-1428.
- Balajee, A. S., DeSantis, L. P., Brosh, R. M., Jr., Selzer, R., and Bohr, V. A. (2000). Role of the ATPase domain of the Cockayne syndrome group B protein in UV induced apoptosis, *Oncogene* 19, 477-89.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., and Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1, *Genes Dev* 7, 812-21.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase, *Nature* 384, 641-3.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain, *Nature* 410, 120-4.
- Barnes, D. E., Tomkinson, A. E., Lehmann, A. R., Webster, A. D., and Lindahl, T. (1992). Mutations in the DNA ligase I gene of an individual with immunodeficiencies and cellular hypersensitivity to DNA-damaging agents, *Cell* 69, 495-503.
- Bartolomei, M. S., Halden, N. F., Cullen, C. R., and Corden, J. L. (1988). Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II, *Mol Cell Biol* 8, 330-339.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J. M., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). TFIIF interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7, *J Biol Chem* 275, 21896-904.
- Baynton, K., Bresson-Roy, A., and Fuchs, R. P. (1998). Analysis of damage tolerance pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: a requirement for Rev3 DNA polymerase in translesion synthesis, *Mol Cell Biol* 18, 960-6.
- Beckett, D. (2001). Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation, *J Mol Biol* 314, 335-52.
- Bell, B., and Tora, L. (1999). Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes, *Experimental Cell Research* 246, 11-19.
- Bentley, D. (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing, *Curr Opin Cell Biol* 11, 347-51.
- Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation, *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-8.
- Bergmann, E., and Egly, J. M. (2001). Trichothiodystrophy, a transcription syndrome, *Trends Genet* 17, 279-86.
- Berneburg, M., Clingen, P. H., Harcourt, S. A., Lowe, J. E., Taylor, E. M., Green, M. H., Krutmann, J., Arlett, C. F., and Lehmann, A. R. (2000). The cancer-free phenotype in trichothiodystrophy is unrelated to its repair defect, *Cancer Res* 60, 431-8.
- Bessho, T., Sancar, A., Thompson, L. H., and Thelen, M. P. (1997). Reconstitution of human excision nuclease with recombinant XPF-ERCC1 complex, *J Biol Chem* 272, 3833-3837.
- Beyer, A. L., and Osheim, Y. N. (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcript, *Genes Dev* 2, 754-765.
- Blanco, J. C., Wang, I. M., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W., Jurutka, P. W., Haussler, M. R., and Ozato, K. (1995). Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1535-9.
- Bocquel, M. T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1989). The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific, *Nucleic Acids Res* 17, 2581-95.
- Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S., and Hanawalt, P. C. (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall, *Cell* 40, 359-369.
- Booher, R. N., Deshaies, R. J., and Kirschner, M. W. (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae wee1* and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins, *Embo J* 12, 3417-26.
- Bootsma, D., Weeda, G., Vermeulen, W., van Vuuren, H., Troelstra, C., van der Spek, P., and Hoeijmakers, J. H. J. (1995). Nucleotide excision repair syndromes: molecular basis and clinical symptoms, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 347, 75-81.
- Bootsma, D., Kraemer, K. H., Cleaver, J. E., and Hoeijmakers, J. H. J. (1998). Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy (New York, Mc Graw-Hill).

- Boudjelal, M., Wang, Z., Voorhees, J. J., and Fisher, G. J. (2000). Ubiquitin/proteasome pathway regulates levels of retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha in human keratinocytes, *Cancer Res* 60, 2247-52.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha, *Nature* 375, 377-82.
- Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J. M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (2000). Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains, *Mol Cell* 5, 289-98.
- Bradsher, J. N., Tan, S., McLaury, H. J., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1993). RNA polymerase II transcription factor SIII, *J Biol Chem* 268, 25594-25603.
- Bregman, D. B., R, H., van Gool, A. J., Henning, K. A., Friedberg, E. C., and Warren, S. (1996). UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: A novel modification deficient in Cockayne syndrome cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11586-11590.
- Broughton, B. C., Thompson, A. F., Harcourt, S. A., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H. J., Botta, E., Stefanini, M., King, M., Weber, C., Cole, J., *et al.* (1995). Molecular and cellular analysis of the DNA repair defect in a patient with xeroderma pigmentosum complementation group D with the clinical features of xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome., *Am J Hum Genet* 56, 167-174.
- Brown, N. R., Noble, M. E., Endicott, J. A., Garman, E. F., Wakatsuki, S., Mitchell, E., Rasmussen, B., Hunt, T., and Johnson, L. N. (1995). The crystal structure of cyclin A, *Structure* 3, 1235-1247.
- Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation, *Curr Opin Genet Dev* 6, 176-84.
- Buck, V., Russell, P., and Millar, J. B. A. (1995). Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast, *EMBO J* 14, 6173-6183.
- Budd, M. E., and Campbell, J. L. (1995). DNA polymerases required for repair of UV-induced damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* 15, 2173-9.
- Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation, *Embo J* 15, 2174-83.
- Buratowski, S., Sopta, M., Greenblatt, J., and Sharp, P. A. (1991). RNA polymerase II-associated proteins are required for a DNA conformation change in the transcription initiation complex, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7509-13.
- Burglen, L., Seroz, T., Miniou, P., Lefebvre, S., Bulet, P., Munnich, A., Pequignot, E. V., Egly, J. M., and Melki, J. (1997). The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease, *American Journal of Human Genetics* 60, 72-9.
- Burke, T. W., and Kadonaga, J. T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*, *Genes & Development* 11, 3020-31.
- Burley, S. K., and Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID), *Annu Rev Biochem* 65, 769-799.
- Cadena, D. L., and Dahmus, M. E. (1987). Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II, *J Biol Chem* 262, 12468-12474.
- Campbell, S. D., Sprenger, F., Edgar, B. A., and O'Farrell, P. H. (1995). *Drosophila* Wee1 kinase rescues fission yeast from mitotic catastrophe and phosphorylates *Drosophila* Cdc2 in vitro, *Mol Biol Cell* 6, 1333-47.
- Chadee, D. N., Allis, C. D., Wright, J. A., and Davie, J. R. (1997). Histone H1b phosphorylation is dependent upon ongoing transcription and replication in normal and ras-transformed mouse fibroblasts, *J Biol Chem* 272, 8113-6.
- Chadee, D. N., Hendzel, M. J., Tylipski, C. P., Allis, C. D., Bazett-Jones, D. P., Wright, J. A., and Davie, J. R. (1999). Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts, *J Biol Chem* 274, 24914-20.
- Chalkley, G. E., and Verrijzer, C. P. (1999). DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator, *EMBO Journal* 18, 4835-45.
- Chambers, R. S., and Dahmus, M. E. (1994). Purification and characterization of a phosphatase from HeLa cells which dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II, *J Biol Chem* 269, 26243-26248.
- Chambers, R. S., and Kane, C. M. (1996). Purification and characterization of an RNA polymerase II phosphatase from yeast, *J Biol Chem* 271, 24408-24504.

- Chao, D. M., Gadbois, E. L., Murray, P. J., Anderson, S. F., Sonu, M. S., Parvin, J. D., and Young, R. A. (1996). A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme, *Nature* **380**, 82-5.
- Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors, *Nature* **377**, 454-7.
- Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300, *Cell* **90**, 569-80.
- Chen, D., and Zhou, Q. (1999a). Tat activates human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation independent of TFIIH kinase, *Molecular & Cellular Biology* **19**, 2863-71.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., and Stallcup, M. R. (1999b). Regulation of transcription by a protein methyltransferase, *Science* **284**, 2174-7.
- Chen, D., Pace, P. E., Coombes, R. C., and Ali, S. (1999c). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization, *Mol Cell Biol* **19**, 1002-15.
- Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P. E., Coombes, R. C., Egly, J. M., and Ali, S. (2000). Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7, *Mol Cell* **6**, 127-37.
- Chesnut, J. D., Stephens, J. H., and Dahmus, M. E. (1992). The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit IIa, *J Biol Chem* **267**, 10500-6.
- Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M., and Allis, C. D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation, *Mol Cell* **5**, 905-15.
- Cho, E., Tagaki, T., Moore, C. R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain, *Genes Dev* **11**, 3319-3326.
- Cho, H., Kim, T. K., Mancebo, H., Lane, W. S., Flores, O., and Reinberg, D. (1999). A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II, *Genes & Development* **13**, 1540-52.
- Chu, G. (1997). Double strand break repair, *J Biol Chem* **272**, 24097-24100.
- Chun, R. F., and Jeang, K. T. (1996). Requirements for RNA polymerase II carboxyl-terminal domain for activated transcription of human retroviruses human T-cell lymphotropic virus I and HIV-1, *J Biol Chem* **271**, 27888-27894.
- Cismowski, M. J., Laff, G. M., Solomon, M. J., and I, R. S. (1995). Kin28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lack cyclin-dependant kinase-activating activity, *Mol Cell Biol* **15**, 2983-2992.
- Clayton, A. L., Rose, S., Barratt, M. J., and Mahadevan, L. C. (2000). Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation, *Embo J* **19**, 3714-26.
- Cleaver, J. E., and Kraemer, K. H. (1989). Xeroderma pigmentosum. In *The metabolic basis of inherited disease*, C. E. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, eds. (New York, McGraw-Hill), pp. 2949-2970.
- Cleaver, J. E., and Kraemer, K. H. (1995). Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, C. E. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, eds. (New York, McGraw-Hill), pp. 4393-4419.
- Cockayne, E. A. (1936). Dwarfism with retinal atrophy and deafness, *Arch Dis Child* **11**, 1-8.
- Coin, F., Marinoni, J. C., Rodolfo, C., Fribourg, S., Pedrini, A. M., and Egly, J. M. (1998). Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH, *Nat Genet* **20**, 184-8.
- Coleman, R. A., and Pugh, B. F. (1997). Slow dimer dissociation of the TATA binding protein dictates the kinetics of DNA binding, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 7221-6.
- Coleman, R. A., Taggart, A. K., Burma, S., Chicca, J. J., 2nd, and Pugh, B. F. (1999). TFIIA regulates TBP and TFIID dimers, *Molecular Cell* **4**, 451-7.
- Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1989). A multisubunit transcription factor essential for accurate initiation by RNA polymerase II, *J Biol Chem* **264**, 2357-2362.
- Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1993). General initiation factor for RNA polymerase II, *Annu Rev Biochem* **62**, 161-190.

- Connell-Crowley, L., Solomon, M. J., Wei, N., and Harper, J. W. (1993). Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro, *Mol Biol Cell* *4*, 79-92.
- Connelly, S., and Manley, J. L. (1988). A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II, *Genes Dev* *2*, 440-452.
- Constantinou, A., Gunz, D., Evans, E., Lalle, P., Bates, P. A., Wood, R. D., and Clarkson, S. G. (1999). Conserved residues of human XPG protein important for nuclease activity and function in nucleotide excision repair, *J Biol Chem* *274*, 5637-48.
- Corden, J., Cadena, D. L., Ahearn, J. M., and Dahmus, M. E. (1985). A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of the eukaryotic RNA polymerase II, *Proc Natl Acad Sci USA* *82*, 7934-7938.
- Coulombe, B., Li, J., and Greenblatt, J. (1994). Topological localization of the human transcription factors IIA, IIB, TATA box-binding protein, and RNA polymerase II-associated protein 30 on a class II promoter, *J Biol Chem* *269*, 19962-19967.
- Cox, S., Radzio-Andzelm, E., and Taylor, S. S. (1994). Domain movements in protein kinases, *Curr Opin Struct Biol* *4*, 893-901.
- Cujec, T., Okamoto, H., Fujinaga, K., Meyer, J., Chamberlin, H., Morgan, D. O., and Peterlin, B. M. (1997a). The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II, *Genes Dev* *11*, 2645-2657.
- Cujec, T. P., Cho, H., Maldonado, E., Meyer, J., Reinberg, D., and Peterlin, B. M. (1997b). The human immunodeficiency virus transactivator Tat interacts with the RNA polymerase II holoenzyme, *Mol Cell Biol* *17*, 1817-23.
- Dace, A., Zhao, L., Park, K. S., Furuno, T., Takamura, N., Nakanishi, M., West, B. L., Hanover, J. A., and Cheng, S. (2000). Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 8985-90.
- Dahmus, M. E. (1981). Phosphorylation of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerase. Identification of calf thymus RNA polymerase subunits phosphorylated by two purified protein kinases, correlation with in vivo sites of phosphorylation in HeLa cell RNA polymerase II, *J Biol Chem* *256*, 3332-3339.
- Dahmus, M. E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II, *J Biol Chem* *271*, 19009-19012.
- Damagnez, V., Mäkelä, T., and Cottarel, G. (1995). *Schizosaccharomyces pombe* Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK, *EMBO J* *14*, 6164-6172.
- Darbon, J. M., Devault, A., Taviaux, S., Fesquet, D., Martinez, A. M., Galas, S., Cavadore, J. C., Dorée, M., and Blanchard, J. M. (1994). Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40^{MO15} catalytic subunit of cdk-activating kinase, *Oncogene* *9*, 3127-3138.
- Davie, J. R., and Murphy, L. C. (1990). Level of ubiquitinated histone H2B in chromatin is coupled to ongoing transcription, *Biochemistry* *29*, 4752-7.
- Davie, J. R., and Murphy, L. C. (1994). Inhibition of transcription selectively reduces the level of ubiquitinated histone H2B in chromatin, *Biochem Biophys Res Commun* *203*, 344-50.
- Davison, B. L., Egly, J.-M., Mulvihill, H. R., and Chambon, P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences, *Nature* *301*, 680-686.
- de Boer, J., Donker, I., de Wit, J., Hoeijmakers, J. H., and Weeda, G. (1998). Disruption of the mouse xeroderma pigmentosum group D DNA repair/basal transcription gene results in preimplantation lethality, *Cancer Res* *58*, 89-94.
- de Boer, J., and Hoeijmakers, J. H. (1999). Cancer from the outside, aging from the inside: mouse models to study the consequences of defective nucleotide excision repair, *Biochimie* *81*, 127-37.
- de Boer, J., and Hoeijmakers, J. H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes, *Carcinogenesis* *21*, 453-60.
- De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., and Kim, S. H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2, *Nature* *363*, 595-602.
- de Laat, W. L., Appeldoorn, E., Jaspers, N. G. J., and Hoeijmakers, J. H. J. (1998a). DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity, *J Biol Chem* *273*, 7835-42.
- de Laat, W. L., Appeldoorn, E., Sugasawa, K., Weterings, E., Jaspers, N. G., and Hoeijmakers, J. H. (1998b). DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair, *Genes Dev* *12*, 2598-609.

- Delmotte, M. H., Tahayato, A., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (1999). Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity, *J Biol Chem* 274, 38225-31.
- DeManno, D. A., Cottom, J. E., Kline, M. P., Peters, C. A., Maizels, E. T., and Hunzicker-Dunn, M. (1999). Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10, *Mol Endocrinol* 13, 91-105.
- Dennis, A. P., Haq, R. U., and Nawaz, Z. (2001). Importance of the regulation of nuclear receptor degradation, *Front Biosci* 6, D954-9.
- Desai, D., Gu, Y., and Morgan, D. O. (1992). Activation of human cyclin-dependent kinases in vitro, *Mol Biol Cell* 3, 571-82.
- Devault, A., Martinez, A. M., Fesquet, D., Labbé, J. C., Morin, N., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Cavadore, J. C., and Dorée, M. (1995). MAT1 ('ménage à trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cuclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK, *EMBO J* 14, 5027-5036.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain, *Nature* 399, 491-6.
- Dianov, G. L., Houle, J. F., Iyer, N., Bohr, V. A., and Friedberg, E. C. (1997). Reduced RNA polymerase II transcription in extracts of cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome cells, *Nucleic Acids Res* 25, 3636-42.
- Dikstein, R., Ruppert, S., and Tjian, R. (1996). TAFII250 is bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74, *Cell* 84, 781-790.
- Dilworth, F. J., Fromental-Ramain, C., Yamamoto, K., and Chambon, P. (2000). ATP-driven chromatin remodeling activities and coactivator histone acetyltransferases act sequentially during transcriptional activation by RAR α /RXR α heterodimers *in vitro*, *Mol Cell* 6, 1049-1058.
- DiRenzo, J., Soderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliaastro, M. H., Ricote, M., Ingrey, S., Horlein, A., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors, *Mol Cell Biol* 17, 2166-76.
- Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E., and Seiser, C. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1, *Molecular & Cellular Biology* 19, 5504-11.
- Donahue, B. A., Yin, S., Taylor, J. S., Reines, D., and Hanawalt, P. C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8502-8506.
- Drapkin, R., Sancar, A., and Reinberg, D. (1994). Where transcription meets repair, *Cell* 77, 9-12.
- Drapkin, R., Le Roy, G., Cho, H., Akoulitchev, S., and Reinberg, D. (1996). Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes, *Proc Natl Acad Sci* 93, 6488-6493.
- Du, L., and Warren, S. L. (1997). A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing, *J Cell Biol* 136, 5-18.
- Dubois, M. F., Ngyuen, V. T., Dahmus, M. E., Pagès, G., Pouysségur, J., and Bensaude, O. (1994). Enhanced phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II upon serum stimulation of quiescent cells: possible involvement of MAPK kinases, *EMBO J* 13, 4787-4797.
- Dubois, M. F., Vincent, M., Vigneron, M., Adamczewski, J., Egly, J. M., and Bensaude, O. (1997). Heat-shock inactivation of the TFIIF-associated kinase and change in the phosphorylation sites on the C-terminal domain of RNA polymerase II, *Nucleic Acids Res* 25, 694-700.
- Dubrovskaya, V., Lavigne, A. C., Davidson, I., Acker, J., Staub, A., and Tora, L. (1996). Distinct domains of hTAFII100 are required for functional interaction with transcription factor TFIIF β (RAP30) and incorporation into the TFIID complex, *EMBO J* 15, 3702-3712.
- Edgar, B. A., and O'Farrell, P. H. (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo, *Cell* 57, 177-87.
- Elmazar, M. M., Ruhl, R., Reichert, U., Shroot, B., and Nau, H. (1997). RARalpha-mediated teratogenicity in mice is potentiated by an RXR agonist and reduced by an RAR antagonist: dissection of retinoid receptor-induced pathways, *Toxicol Appl Pharmacol* 146, 21-8.
- Emami, K. H., Jain, A., and Smale, S. T. (1997). Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIF-induced isomerization, *Genes & Development* 11, 3007-19.

- Espinoza, F. H., Farrell, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Morgan, D. O. (1996). A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK, *Science* *273*, 1714-1717.
- Espinoza, F. H., Farrell, A., Nourse, J. L., Chamberlin, H. M., Gileadi, O., and Morgan, D. O. (1998). Cak1 is required for Kin28 phosphorylation and activation in vivo, *Mol Cell Biol* *18*, 6365-73.
- Evans, E., Fellows, J., Coffey, A., and Wood, R. D. (1997a). Open complex formation around lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein, *EMBO J* *16*, 625-638.
- Evans, E., Moggs, J. G., Hwang, J. R., Egly, J.-M., and Wood, R. D. (1997b). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors, *EMBO J* *16*, 6559-6573.
- Faye, G., Simon, M., Valay, J. G., Fesquet, D., and Facca, C. (1997). Rig2, a RING finger protein that interacts with the Kin28/Ccl1 CTD kinase in yeast, *Mol Gen Genet* *255*, 460-466.
- Featherstone, M. (2002). Coactivators in transcription initiation: here are your orders, *Curr Opin Genet Dev* *12*, 149-55.
- Feaver, W. J., Gileadi, O., and Kornberg, R. (1991). Purification and characterization of yeast RNA polymerase II transcription factor b, *J Biol Chem* *266*, 19000-19005.
- Feaver, W. J., Henry, N. L., Wang, Z., Wu, X., Svejstrup, J. Q., Bushnell, D. A., Friedberg, E. C., and Kornberg, R. D. (1997). Genes for Tfb2, Tfb3, and Tfb4 subunits of yeast transcription/repair factor IIH. Homology to human cyclin-dependent kinase activating kinase and IIH subunits, *J Biol Chem* *272*, 19319-19327.
- Fesquet, D., Labbé, J. C., Derancourt, J., Capony, J. P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Dorée, M., and Cavadore, J. C. (1993). The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues, *EMBO J* *12*, 3111-3121.
- Fesquet, D., Morin, N., Doree, M., and Devault, A. (1997). Is Cdk7/cyclinH/MAT1 the genuine cdk activating kinase in cycling xenopus egg extracts?, *Oncogene* *15*.
- Finkelstein, A., Kostrub, C. F., Li, J., Chavez, D. P., Wang, B. Q., Fang, S. M., Greenblatt, J., and Burton, Z. F. (1992). A cDNA encoding RAP74, a general initiation factor for transcription by RNA polymerase II, *Nature* *355*, 464-7.
- Fischer, L., Gérard, M., Chalut, C., Lutz, Y., Humbert, S., Kanno, M., Chambon, P., and Egly, J. M. (1992). Cloning of the 62-kilodalton component of basic transcription factor BTF2, *Science* *257*, 1392-1395.
- Fisher, R. P., Jin, P., Chamberlin, H. M., and Morgan, D. O. (1995). Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase, *Cell* *83*, 47-57.
- Fisher, R. P., and Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-Activating Kinase, *Cell* *78*, 713-724.
- Floyd, Z. E., and Stephens, J. M. (2002). Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes, *J Biol Chem* *277*, 4062-8.
- Fondell, J., Ge, H., and Roeder, R. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex., *Proc Natl Acad Sci* *93*(16), 8329-33.
- Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J., and Evans, R. M. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors, *Cell* *81*, 541-50.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis (Washington, DC, ASM Press).
- Friedberg, E. C. (1996). Cockayne syndrome-a primary defect in DNA repair, transcription, both or neither?, *BioEssays* *18*, 731-738.
- Frouin, I., Montecucco, A., Biamonti, G., Hubscher, U., Spadari, S., and Maga, G. (2002). Cell cycle-dependent dynamic association of cyclin/Cdk complexes with human DNA replication proteins, *Embo J* *21*, 2485-95.
- Galaktionov, K., and Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins, *Cell* *67*, 1181-94.
- Gampe, R. T., Jr., Montana, V. G., Lambert, M. H., Wisely, G. B., Milburn, M. V., and Xu, H. E. (2000). Structural basis for autorepression of retinoid X receptor by tetramer formation and the AF-2 helix, *Genes Dev* *14*, 2229-41.

- Gannon, F., O'Hare, K., Perrin, F., LePennec, J. P., Benoist, C., Cochet, M., Breathnach, R., Royal, A., Garapin, A., Cami, B., and Chambon, P. (1979). Organisation and sequences at the 5' end of a cloned complete ovalbumin gene, *Nature* *278*, 428-34.
- Garrett, S., Barton, W. A., Knights, R., Jin, P., Morgan, D. O., and Fisher, R. P. (2001). Reciprocal activation by cyclin-dependent kinases 2 and 7 is directed by substrate specificity determinants outside the T loop, *Mol Cell Biol* *21*, 88-99.
- Garriga, J., Peng, J., Parreno, M., Price, D. H., Henderson, E. E., and Grana, X. (1998). Upregulation of cyclin T1/CDK9 complexes during T cell activation, *Oncogene* *17*, 3093-102.
- Gaub, M. P., Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Ali, S., Matthes, H., Scheuer, I., and Chambon, P. (1992). Immunodetection of multiple species of retinoic acid receptor alpha: evidence for phosphorylation, *Exp Cell Res* *201*, 335-46.
- Gavin, I., Horn, P. J., and Peterson, C. L. (2001). SWI/SNF chromatin remodeling requires changes in DNA topology, *Mol Cell* *7*, 97-104.
- Gebara, M. M., Sayre, M. H., and Corden, J. L. (1997). Phosphorylation of the carboxy-terminal repeat domain in RNA polymerase II by cyclin-dependent kinases is sufficient to inhibit transcription, *J Cell Biochem* *64*, 390-402.
- Gerard, M., Fischer, L., Moncollin, V., Chipoulet, J. M., Chambon, P., and Egly, J. M. (1991). Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2, *J Biol Chem* *266*, 20940-5.
- Gervais, V. V., Busso, D., Wasielewski, E., Poterszman, A., Egly, J. M., Thierry, J. C., and Kieffer, B. (2001). Solution structure of the N-terminal domain of the human TFIIH MAT1 subunit: new insights into the RING finger family, *J Biol Chem* *276*, 7457-7464.
- Gileadi, O., Feaver, W. J., and Kornberg, R. D. (1992). Cloning of a subunit of yeast RNA polymerase II transcription factor b and CTD kinase, *Science* *257*, 1389-1392.
- Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z. H., and Tjian, R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 192-6.
- Gillepsie, J. M., and Marshall, R. C. (1983). Comparison of the proteins of normal and trichothiodystrophy human hair, *J Invest Dermatol* *80*, 195-205.
- Glass, C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers, *Endocr Rev* *15*, 391-407.
- Glass, C. K., Rose, D. W., and Rosenfeld, M. G. (1997). Nuclear receptor coactivators, *Curr Opin Cell Biol* *9*, 222-32.
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors, *Genes Dev* *14*, 121-141.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway, *Nature* *349*, 132-8.
- Gold, M. O., Yang, X., Herrmann, C. H., and Rice, A. P. (1998). PITALRE, the catalytic subunit of TAK, is required for human immunodeficiency virus Tat transactivation in vivo, *J Virol* *72*, 4448-53.
- Goldsborough, A. S., and Kornberg, T. B. (1996). Reduction of transcription by homologue asynapsis in Drosophila imaginal discs, *Nature* *381*, 807-10.
- Gottlicher, M., Heck, S., Doucas, V., Wade, E., Kullmann, M., Cato, A. C., Evans, R. M., and Herrlich, P. (1996). Interaction of the Ubc9 human homologue with c-Jun and with the glucocorticoid receptor, *Steroids* *61*, 257-62.
- Gould, K. L., and Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis, *Nature* *342*, 39-45.
- Gould, K. L., Moreno, S., Owen, D. J., Sazer, S., and Nurse, P. (1991). Phosphorylation at Thr167 is required for Schizosaccharomyces pombe p34cdc2 function, *Embo J* *10*, 3297-309.
- Grana, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P. P., Rosenblatt, J., Morgan, D. O., and Giordano, A. (1994). PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3834-8.
- Grana, X., and Reddy, E. P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs), *Oncogene* *11*, 211-9.

- Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates, J. R., 3rd, and Workman, J. L. (1998). A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation, *Cell* *94*, 45-53.
- Grant, P. A., and Berger, S. L. (1999). Histone acetyltransferase complexes, *Semin Cell Dev Biol* *10*, 169-77.
- Gronemeyer, H., and Laudet, V. (1995a). Transcription factors 3: nuclear receptors, *Protein Profile* *2*, 1173-308.
- Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995b). Nuclear receptors. How to finger DNA, *Nature* *375*, 190-1.
- Grunstein, M. (1990). Nucleosomes: regulators of transcription, *Trends Genet* *6*, 395-400.
- Gu, Y., Rosenblatt, J., and Morgan, D. O. (1992). Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15, *Embo J* *11*, 3995-4005.
- Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain, *Cell* *90*, 595-606.
- Gu, W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C. X., Fondell, J. D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J., and Roeder, R. G. (1999). A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation [published erratum appears in *Mol Cell* 1999 Apr;3(4):following 541], *Mol Cell* *3*, 97-108.
- Guzder, S. N., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S. (1996). RAD26, the yeast homolog of human Cockayne's syndrome group B gene, encodes a DNA-dependent ATPase, *J Biol Chem* *271*, 18314-18317.
- Hamiche, A., Sandaltzopoulos, R., Gdula, D. A., and Wu, C. (1999). ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF, *Cell* *97*, 833-42.
- Hammer, G. D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B. D., Simpson, K., Weigel, N. L., and Ingraham, H. A. (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress, *Mol Cell* *3*, 521-6.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of catalytic domains, *Science* *241*, 42-52.
- Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L. (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes, *Cell* *104*, 817-27.
- Hausler, M. R., Whitfield, G. K., Hausler, C. A., Hsieh, J. C., Thompson, P. D., Selznick, S. H., Dominguez, C. E., and Jurutka, P. W. (1998). The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed, *J Bone Miner Res* *13*, 325-49.
- Hawkes, N. A., Otero, G., Winkler, G. S., Marshall, N., Dahmus, M. E., Krappmann, D., Scheidereit, C., Thomas, C. L., Schiavo, G., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2002). Purification and characterization of the human elongator complex, *J Biol Chem* *277*, 3047-52.
- He, Z., Henricksen, L. A., Wold, M. S., and Ingles, C. J. (1995). RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair, *Nature* *374*, 566-569.
- Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., *et al.* (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression, *Nature* *387*, 43-8.
- Henzel, M. J., Sun, J. M., Chen, H. Y., Rattner, J. B., and Davie, J. R. (1994). Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix, *J Biol Chem* *269*, 22894-901.
- Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., and Young, R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases, *Molecular Cell* *2*, 43-53.
- Henning, K. A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L. D., Reagan, M. S., Legerski, R., Shultz, R. A., Stefanini, M., Lehmann, A. R., Mayne, L. V., and Friedberg, E. C. (1995). The Cockayne syndrome group A genes encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH, *Cell* *82*, 555-564.
- Hermans, D., Pihlak, A., Westerling, T., Damagnez, V., Vandenhoute, J., Cottarel, G., and Makela, T. P. (1998). Fission yeast Csk1 is a CAK-activating kinase (CAKAK), *Embo J* *17*, 7230-8.
- Herrmann, C. H., and Rice, A. P. (1993). Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase, *Virology* *197*, 601-8.
- Herrmann, C. H., and Rice, A. P. (1995). Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor, *J Virol* *69*, 1612-20.
- Hirose, Y., and Manley, J. L. (1998). RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor [see comments], *Nature* *395*, 93-6.

- Hirose, Y., Tacke, R., and Manley, J. L. (1999). Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing, *Genes Dev* 13, 1234-9.
- Ho, C. K., Sriskanda, V., McCracken, S., Bentley, D., Schwer, B., and Shuman, S. (1998). The guanylyltransferase domain of mammalian mRNA capping enzyme binds to the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II, *J Biol Chem* 273, 9577-85.
- Ho, C. K., and Shuman, S. (1999). Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme, *Mol Cell* 3, 405-11.
- Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis, *Embo J* 12, 53-63.
- Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition, *Embo J* 13, 4302-10.
- Holstege, F. C., van der Vliet, P. C., and Timmers, H. T. (1996). Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH, *EMBO J* 15, 1666-77.
- Holstege, F. C. P., Fiedler, U., and Timmers, M. H. T. (1997). Three transitions in the RNA polymerase II transcripton complex during initiation, *EMBO J* 16, 7468-7480.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L., and Stallcup, M. R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4948-52.
- Housley, P. R., Sanchez, E. R., Danielsen, M., Ringold, G. M., and Pratt, W. B. (1990). Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. A two-site model for hsp90 binding to the steroid binding domain, *J Biol Chem* 265, 12778-81.
- Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D. L., and Hager, G. L. (1996). Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4845-50.
- Huang, J. C., Svoboda, D. L., Reardon, J. T., and Sancar, A. (1992). Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22 nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3664-3668.
- Hudson, B. P., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2000). Solution structure and acetyllysine binding activity of the GCN5 bromodomain, *J Mol Biol* 304, 355-70.
- Humbert, S., van Vuuren, H., Lutz, Y., Hoeijmakers, J. H. J., Egly, J. M., and Moncollin, V. (1994). p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL, a yeast protein involved in DNA repair, *EMBO J* 13, 2393-2398.
- Hwang, B. J., and Chu, G. (1993). Purification and characterization of a human protein that binds to damaged DNA, *Biochemistry* 32, 1657-1666.
- Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 424-8.
- Imhof, A., Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., Wolffe, A., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases, *Current Biol* 7, 689-692.
- Inamoto, S., Segil, N., Pan, Z. Q., Kimura, M., and Roeder, R. G. (1997). The cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly factor, MAT1, targets and enhances CAK activity on the POU domains of octamer transcription factors, *Journal of Biological Chemistry* 272, 29852-8.
- Isel, C., and Karn, J. (1999). Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation, *Journal of Molecular Biology* 290, 929-41.
- Ito, M., Yuan, C., Malik, S., Gu, W., Fondell, J., Yamamura, S., Fu, Z., Zhang, X., Qin, J., and Roeder, R. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators., *Mol Cell* 3(3), 361-70.
- Ivanov, D., Kwak, Y. T., Nee, E., Guo, J., Garcia-Martinez, L. F., and Gaynor, R. B. (1999). Cyclin T1 domains involved in complex formation with Tat and TAR RNA are critical for tat-activation, *J Mol Biol* 288, 41-56.

- Iyer, N., Reagan, M. S., Wu, K. J., Canagarajah, B., and Friedberg, E. C. (1996). Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein, *Biochemistry* *35*, 2157-67.
- Jackman, M., Firth, M., and Pines, J. (1995). Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus, *Embo J* *14*, 1646-54.
- Jackson-Fisher, A. J., Chitikila, C., Mitra, M., and Pugh, B. F. (1999). A role for TBP dimerization in preventing unregulated gene expression, *Molecular Cell* *3*, 717-27.
- Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S., and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module, *Science* *288*, 1422-5.
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by estrogen receptor, *Cell* *79*, 107-117.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex, *Nature* *376*, 313-320.
- Jenster, G., Spencer, T. E., Burcin, M. M., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 7879-84.
- Jerzmanowski, A., and Cole, R. D. (1992). Partial displacement of histone H1 from chromatin is required before it can be phosphorylated by mitotic H1 kinase in vitro, *J Biol Chem* *267*, 8514-20.
- Jiang, Y., Yan, M., and Gralla, J. D. (1996). A three-step pathway of transcription initiation leading to promoter clearance at an activated RNA polymerase II promoter, *Mol Cell Biol* *16*, 1614-1621.
- Johnson, A. D. (1995). The price of repression, *Cell* *81*, 655-8.
- Johnson, C. A., and Turner, B. M. (1999). Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals, *Semin Cell Dev Biol* *10*, 179-88.
- Johnson, R. E., Kondratick, C. M., Prakash, S., and Prakash, L. (1999). hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum [see comments], *Science* *285*, 263-5.
- Jones, K. A., and Peterlin, B. M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter, *Annu Rev Biochem* *63*, 717-43.
- Jones, K. A. (1997). Taking a new TAK on Tat transactivation, *Genes Dev* *11*, 2593-2599.
- Joseph, B., Lefebvre, O., Mereau-Richard, C., Danze, P. M., Belin-Plancot, M. T., and Formstecher, P. (1998). Evidence for the involvement of both retinoic acid receptor- and retinoic X receptor-dependent signaling pathways in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis in the human myeloma cell line RPMI 8226, *Blood* *91*, 2423-32.
- Kaiser, K., and Meisterernst, M. (1996). The human general co-factors, *Trends Biochem Sci* *21*, 342-345.
- Kaldis, P., Sutton, A., and Solomon, M. J. (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast, *Cell* *86*, 553-564.
- Kaldis, P., Russo, A. A., Chou, H. S., Pavletich, N. P., and Solomon, M. J. (1998). Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities, *Mol Biol Cell* *9*, 2545-60.
- Kaldis, P., and Solomon, M. J. (2000). Analysis of CAK activities from human cells, *Eur J Biochem* *267*, 4213-21.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors, *Cell* *85*, 403-14.
- Kampmeier, J., Behrens, A., Wang, Y., Yee, A., Anderson, W. F., Hall, F. L., Gordon, E. M., and McDonnell, P. J. (2000). Inhibition of rabbit keratocyte and human fetal lens epithelial cell proliferation by retrovirus-mediated transfer of antisense cyclin G1 and antisense MAT1 constructs, *Hum Gene Ther* *11*, 1-8.
- Kang, M. K., and Dahmus, M. E. (1995). The Photoactivated Cross-Linking of Recombinant C-terminal Domain to Proteins in HeLa Cell Transcription Extract That Comigrate with Transcription Factors IIE and IIF, *The Journal of Biological Chemistry* *270*, 23390-23397.
- Kaplan, C. D., Morris, J. R., Wu, C., and Winston, F. (2000). Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*, *Genes Dev* *14*, 2623-34.

- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., and et al. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen- activated protein kinase, *Science* *270*, 1491-4.
- Keenan, S. M., Bellone, C., and Baldassare, J. J. (2001). Cyclin-dependent kinase 2 nucleocytoplasmic translocation is regulated by extracellular regulated kinase, *J Biol Chem* *276*, 22404-9.
- Kersten, S., Pan, L., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Noy, N. (1995). Role of ligand in retinoid signaling. 9-cis-retinoic acid modulates the oligomeric state of the retinoid X receptor, *Biochemistry* *34*, 13717-21.
- Kersten, S., Dong, D., Lee, W., Reczek, P. R., and Noy, N. (1998). Auto-silencing by the retinoid X receptor, *J Mol Biol* *284*, 21-32.
- Killeen, M., and Greenblatt, J. (1992). The general transcription RAP30 binds to RNA polymerase II and prevents it from binding nonspecifically to DNA, *Mol Cell Biol* *12*, 30-37.
- Kim, W. Y., and Dahmus, M. E. (1989). The major late promoter of adenovirus-2 is accurately transcribed by RNA polymerases IIO, IIA, and IIB, *J Biol Chem* *264*, 3169-3176.
- Kim, Y. J., Björklund, S., Li, Y., Sayre, M. H., and Kornberg, R. D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II, *Cell* *77*, 599-608.
- Kim, K. K., Chamberlin, H. M., Morgan, D. O., and Kim, S. H. (1996). Three-dimensional structure of human cyclin H, a positive regulator of the CDK-activating kinase, *Nature Structural Biology* *3*, 849-55.
- Kim, E., Du, L., Bregman, D. B., and Warren, S. L. (1997). Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA, *J Cell Biol* *136*, 19-28.
- Kim, J. H., Lane, W. S., and Reinberg, D. (2002). Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin, *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1241-6.
- Kimmelman, J., Kaldis, P., Hengartner, C. J., Laff, G. M., Koh, S. S., Young, R. A., and Solomon, M. J. (1999). Activating phosphorylation of the Kin28p subunit of yeast TFIIF by Cak1p, *Mol Cell Biol* *19*, 4774-87.
- Kingston, R. E., and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity, *Genes Dev* *13*, 2339-52.
- Kitajima, S., Chibazakura, T., Yonaha, M., and Yasukochi, Y. (1994). Regulation of the human general transcription initiation factor TFIIF by phosphorylation, *J Biol Chem* *269*, 29970-29977.
- Ko, L. J., and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm, *Genes Dev* *10*, 1054-1072.
- Ko, L. J., Shieh, S. Y., Chen, X., Jayaraman, L., Tamai, K., Taya, Y., Prives, C., and Pan, Z. Q. (1997). p53 is phosphorylated by cdk7-cyclin H in a p36MAT1-dependent manner, *Mol Cell Biol* *17*, 7220-7229.
- Kobor, M. S., Archambault, J., Lester, W., Holstege, F. C., Gileadi, O., Jansma, D. B., Jennings, E. G., Kouyoumdjian, F., Davidson, A. R., Young, R. A., and Greenblatt, J. (1999). An unusual eukaryotic protein phosphatase required for transcription by RNA polymerase II and CTD dephosphorylation in *S. cerevisiae*, *Mol Cell* *4*, 55-62.
- Kogel, D., Plottner, O., Landsberg, G., Christian, S., and Scheidtmann, K. H. (1998). Cloning and characterization of DIK, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones, *Oncogene* *17*, 2645-54.
- Koh, J., Enders, G. H., Dynlacht, B. D., and Harlow, E. (1995). Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition, *Nature* *375*, 506-10.
- Koleske, A. J., and Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators, *Nature* *368*, 466-469.
- Koleske, A. J., and Young, R. A. (1995). The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation, *TIBS* *20*, 113-116.
- Komissarova, N., and Kashlev, M. (1997). RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA, *Journal of Biological Chemistry* *272*, 15329-38.
- Kopf, E., Plassat, J. L., Vivat, V., de The, H., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway, *J Biol Chem* *275*, 33280-8.
- Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (1999). Chromatin-modifying and -remodeling complexes, *Curr Opin Genet Dev* *9*, 148-51.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions, *Science* *279*, 703-7.

- Kraemer, K. H., Levy, D. D., Parris, C. N., Gozukara, E. M., Moriwaki, S., Adelberg, S., and Seidman, M. M. (1994). Xeroderma pigmentosum and related disorders: examining the linkage between defective DNA repair and cancer., *J Invest Dermatol* *103*, 96S-101S.
- Krek, W., and Nigg, E. A. (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites, *Embo J* *10*, 305-16.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts, *Cell* *70*, 139-51.
- Kuo, M., Brownell, J., Sobel, R., Ranalli, T., Cook, R., Edmondson, D., Roth, S., and Allis, C. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines., *Nature* *383*, 269-72.
- Kuo, M., and Allis, C. (1998). Roles of histone acetyltransferase and deacetylases in gene regulation, *BioEssays* *20*, 615-626.
- Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M. G., Heyman, R. A., and Glass, C. K. (1994). Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding, *Nature* *371*, 528-31.
- Kwak, Y. T., Ivanov, D., Guo, J., Nee, E., and Gaynor, R. B. (1999). Role of the human and murine cyclin T proteins in regulating HIV-1 tat- activation, *J Mol Biol* *288*, 57-69.
- Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D., and Ebricht, R. (1998). New core promoter element in RNA polymerase-II dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB, *Genes Dev* *12*, 34-44.
- Lania, L., Majello, B., and Napolitano, G. (1999). Transcriptional control by cell-cycle regulators: a review, *J Cell Physiol* *179*, 134-41.
- Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Satz, H. K., and Suter, B. (1998). Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity, *Genes Dev* *12*, 370-381.
- Larochelle, S., Chen, J., Knights, R., Pandur, J., Morcillo, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Suter, B., and Fisher, R. P. (2001). T-loop phosphorylation stabilizes the CDK7-cyclin H-MAT1 complex in vivo and regulates its CTD kinase activity, *Embo J* *20*, 3749-59.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stehelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily, *Embo J* *11*, 1003-13.
- Laybourn, P. J., and Dahmus, M. E. (1989). Transcription-dependent structural changes in the C-terminal domain of mammalian RNA polymerase subunit IIa/o, *J Biol Chem* *264*, 6693-6698.
- Laybourn, P. J., and Dahmus, M. E. (1990). Phosphorylation of RNA polymerase IIA occurs subsequent to interaction with the promoter and before the initiation of transcription, *J Biol Chem* *265*, 13165-13173.
- Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J., and Sarasin, A. (2000). BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells [In Process Citation], *Cancer Res* *60*, 5548-52.
- Leclerc, V., Tassan, J. P., O'Farrell, P. H., Nigg, E. A., and Leopold, P. (1996). *Drosophila* cdk8, a kinase partner of cyclin C that interacts with the large subunit of RNA polymerase II, *Mol Biol Cell* *7*, 505-513.
- Leclerc V, Raisin S and Leopold P. (2000) Dominant-negative mutants reveal a role for the Cdk7 kinase at the mid-blastula transition in *Drosophila* embryos. *Embo J* *19*(7):1567-75.
- Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., and Wolfe, A. P. (1993a). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA, *Cell* *72*, 73-84.
- Lee, M. S., Klierer, S. A., Provencal, J., Wright, P. E., and Evans, R. M. (1993b). Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding, *Science* *260*, 1117-21.
- Lee, D., and Lis, J. T. (1998). Transcriptional activation independent of TFIIH kinase and the RNA polymerase II mediator in vivo, *Nature* *393*, 389-92.
- Lee, S. K., Kim, H. J., Na, S. Y., Kim, T. S., Choi, H. S., Im, S. Y., and Lee, J. W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1- mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits, *J Biol Chem* *273*, 16651-4.
- Lee, K. M., Saiz, J. E., Barton, W. A., and Fisher, R. P. (1999). Cdc2 activation in fission yeast depends on Mcs6 and Csk1, two partially redundant Cdk-activating kinases (CAKs), *Curr Biol* *9*, 441-4.
- Lee, B. S., Bi, L., Garfinkel, D. J., and Bailis, A. M. (2000a). Nucleotide excision Repair/TFIIH helicases rad3 and ssl2 inhibit short- sequence recombination and Ty1 retrotransposition by similar mechanisms [In Process Citation], *Mol Cell Biol* *20*, 2436-45.

- Lee, D. K., Duan, H. O., and Chang, C. (2000b). From androgen receptor to the general transcription factor TFIIH. Identification Of cdk activating kinase (cak) as an androgen receptor nh(2)-terminal associated coactivator [In Process Citation], *J Biol Chem* *275*, 9308-13.
- Lei, L., Finkelstein, A., and Burton, Z. F. (1998). Functions of the N- and C-terminal domains of human RAP74 in transcriptional initiation, elongation, and recycling of RNA polymerase II., *Molecular and Cellular Biology* *18*, 2130-42.
- Lei, L., Ren, D., and Burton, Z. F. (1999). The RAP74 subunit of human transcription factor IIF has similar roles in initiation and elongation, *Molecular & Cellular Biology* *19*, 8372-82.
- Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways, *Trends Biochem Sci* *17*, 427-33.
- Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control, *Genes Dev* *14*, 2551-69.
- Levedakou, E. N., He, M., Baptist, E. W., Craven, R. J., Cance, W. G., Welcsh, P. L., Simmons, A., Naylor, S. L., Leach, R. J., Lewis, T. B., and et al. (1994). Two novel human serine/threonine kinases with homologies to the cell cycle regulating *Xenopus* MO15, and NIMA kinases: cloning and characterization of their expression pattern, *Oncogene* *9*, 1977-88.
- Léveillard, T., Andera, L., Bissonnette, N., Schaeffer, L., Bracco, L., Egly, J. M., and Wasyluk, B. (1996). Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations, *EMBO J* *15*, 1615-1624.
- Lew, D. J., and Kornbluth, S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control, *Curr Opin Cell Biol* *8*, 795-804.
- Li, H., Gomes, P. J., and Chen, J. D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 8479-84.
- Li, L., Elledge, S. J., Peterson, C. A., Bales, E. S., and Legerski, R. J. (1994). Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1, *Proc Natl Acad Sci USA* *91*, 5012-5016.
- Li, L., Lu, X., Peterson, C. A., and Legerski, R. J. (1995a). An interaction between the DNA repair factor XPA and replication protein A appears essential for nucleotide excision repair, *Mol Cell Biol* *15*, 5396-5402.
- Li, L., Peterson, C. A., Lu, X., and Legerski, R. J. (1995b). Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nuclear excision repair, *Mol Cell Biol* *15*, 1993-1998.
- Li, R. Y., Calsou, P., Jones, C. J., and Salles, B. (1998). Interactions of the transcription/DNA repair factor TFIIH and XP repair proteins with DNA lesions in a cell-free repair assay, *J Mol Biol* *281*, 211-8.
- Li, X., Li, J., Harrington, J., Lieber, M. R., and Burgers, P. M. (1995c). Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen, *J Biol Chem* *270*, 22109-12.
- Liao, S. M., Zhang, J., Jeffrey, D. A., Koleske, A. J., Thompson, C. M., Chao, D. M., Viljoen, M., van Vuuren, H. J. J., and Young, R. A. (1995). A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme, *Nature* *374*, 193-196.
- Lieber, M. R., Grawunder, U., Wu, X., and Yaneva, M. (1997). Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks, *Curr Opin Genet Dev* *7*, 99-104.
- Lindahl, T., Karran, P., and Wood, R. D. (1997). DNA excision repair pathways, *Curr Opin Genet Dev* *7*, 158-169.
- Lo, W. S., Duggan, L., Tolga, N. C., Emre, Belotserkovskya, R., Lane, W. S., Shiekhattar, R., and Berger, S. L. (2001). Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription, *Science* *293*, 1142-6.
- Lonard, D. M., Nawaz, Z., Smith, C. L., and O'Malley, B. W. (2000). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation, *Mol Cell* *5*, 939-48.
- Long, J. J., Leresche, A., Kriwacki, R. W., and Gottesfeld, J. M. (1998). Repression of TFIIH transcriptional activity and TFIIH-associated cdk7 kinase activity at mitosis, *Mol Cell Biol* *18*, 1467-1476.
- Lu, H., Fisher, R. P., Bailey, P., and Levine, A. J. (1997a). The cdk7-cycH-p36 complex of transcription factor IIF phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity *in vitro*, *Mol Cell Biol* *17*, 5923-5934.
- Lu, H., Flores, O., Weinmann, R., and Reinberg, D. (1991). The non-phosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex, *Proc Natl Acad Sci USA* *88*, 10004-10008.

- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J. M., and Reinberg, D. (1992). Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II, *Nature* *358*, 641-5.
- Lu, H. C., Revelli, J. P., Goering, L., Thaller, C., and Eichele, G. (1997b). Retinoid signaling is required for the establishment of a ZPA and for the expression of Hoxb-8, a mediator of ZPA formation, *Development* *124*, 1643-51.
- Ma, L., Siemssen, E. D., Noteborn, M. H. M., and van der Eb, A. J. (1994a). The xeroderma pigmentosum group B protein ERCC3 produced in the baculovirus system exhibit DNA helicase activity, *Nucleic Acids Res* *22*, 4095-4102.
- Ma, L., Westbroek, A., Jochemsen, A. G., Weeda, G., Bosch, A., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J., and Van Der EB, A. J. (1994b). Mutational analysis of ERCC3, which is involved in DNA repair and transcription initiation: Identification of domains essential for the DNA repair function, *Mol Cell Biol* *14*, 4126-4134.
- Mahadevan, L. C., Willis, A. C., and Barratt, M. J. (1991). Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors, *Cell* *65*, 775-83.
- Maines, S., Negritto, M. C., Wu, X., Manthey, G. M., and Bailis, A. M. (1998). Novel mutations in the RAD3 and SSL1 genes perturb genome stability by stimulating recombination between short repeats in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* *150*, 963-76.
- Makela, T. P., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Frutiger, S., Hughes, G. J., and Weinberg, R. (1994). A cyclin associated with the CDK-associated kinase MO15, *Nature* *371*, 254-257.
- Makela, T. P., Parvin, J. D., Kim, J., Huber, L. J., Sharp, P. A., and Weinberg, R. A. (1995). A kinase-deficient transcription factor TFIIH is functional in basal and activated transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5174-8.
- Maldonado, E., Ha, I., Cortes, P., Weis, L., and Reinberg, D. (1990). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex, *Molecular & Cellular Biology* *10*, 6335-47.
- Maldonado, E., Shiekhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C. W., Linn, S., and Reinberg, D. (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins, *Nature* *381*, 86-89.
- Malik, S., and Roeder, R. G. (2000). Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells, *Trends Biochem Sci* *25*, 277-83.
- Mancebo, H. S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D., and Flores, O. (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro, *Genes Dev* *11*, 2633-44.
- Mangelsdorf, D. J. (1994). Vitamin A receptors, *Nutr Rev* *52*, 532-44.
- Manning, E. T., Ikehara, T., Ito, T., Kadonaga, J. T., and Kraus, W. L. (2001). p300 forms a stable, template-committed complex with chromatin: role for the bromodomain, *Mol Cell Biol* *21*, 3876-87.
- Marinoni, J. C., Roy, R., Vermeulen, W., Miniou, P., Lutz, Y., Weeda, G., Seroz, T., Molina Gomez, D., Hoeijmakers, J. H. J., and Egly, J. M. (1997). Cloning and characterization of p52, the fifth subunit of the core of the transcription/DNA repair factor TFIIH, *EMBO J* *16*, 1093-1102.
- Marshall, N. F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D. H. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase, *J Biol Chem* *271*, 27176-27183.
- Masutani, C., Araki, M., Yamada, A., Kusumoto, R., Nogimori, T., Maekawa, T., Iwai, S., and Hanaoka, F. (1999a). Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity, *Embo J* *18*, 3491-501.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. (1999b). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta [see comments], *Nature* *399*, 700-4.
- Masuyama, R., Nakaya, Y., Tanaka, S., Tsurukami, H., Nakamura, T., Watanabe, S., Yoshizawa, T., Kato, S., and Suzuki, K. (2001). Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice, *Endocrinology* *142*, 494-7.
- Matsui, P., DePaulo, J., and Buratowski, S. (1995). An interaction between the Tfb1 and Ssl1 subunits of yeast TFIIH correlates with DNA repair activity, *Nucleic Acids Res* *23*, 767-772.
- Matsuoka, M., Kato, J. Y., Fisher, R. P., Morgan, D. O., and Sherr, C. J. (1994). Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase, *Mol Cell Biol* *14*, 7265-75.

- Mavankal, G., Ignatius Ou, S. H., Oliver, H., Sigman, D., and Gaynor, R. B. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 and 2 Tat proteins specifically interact with RNA polymerase II, *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 2089-94.
- Maxon, M. E., and Tjian, R. (1994). Transcriptional activity of transcription factor IIE is dependent on zinc binding, *Proc Natl Acad Sci USA* *91*, 9529-9533.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., program, A. E., Shuman, S., and Bentley, D. L. (1997a). 5'-capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II, *Genes Dev* *11*, 3306-3318.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., and Bentley, D. L. (1997b). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription., *Nature* *365*, 357-361.
- McDonald, J. P., Levine, A. S., and Woodgate, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism, *Genetics* *147*, 1557-68.
- McEwan, I. J., and Gustafsson, J. A. (1997). Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF, *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 8485-8490.
- McGowan, C. H., and Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15, *Embo J* *12*, 75-85.
- McKnight, S. L. (1996). Transcription revisited: a commentary on the 1995 Cold Spring Harbor laboratory meeting, "mechanisms of eukaryotic transcription", *Genes Dev* *10*, 367-381.
- McKune, K., Moore, P. A., Hull, M. W., and Woychik, N. A. (1995). Six human RNA polymerase subunits functionally substitute for their yeast counterparts, *Mol Cell Biol* *15*, 6895-6900.
- Meijer, M., and Smerdon, M. J. (1999). Accessing DNA damage in chromatin: insights from transcription, *Bioessays* *21*, 596-603.
- Mellon, I., Spivak, G., and Hanawalt, P. C. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene, *Cell* *51*, 241-249.
- Mengus, G., May, M., Jacq, X., Staub, A., Tora, L., Chambon, P., and Davidson, I. (1995). Cloning and characterization of hTAFII18, hTAFII20, and hTAFII28: three subunits of the human transcription factor TFIID, *EMBO J* *14*, 1520-1531.
- Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., *et al.* (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity, *Cell* *87*, 1261-70.
- Moggs, J. G., Yarema, K. J., Essigmann, J. M., and Wood, R. D. (1996). Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct, *J Biol Chem* *271*, 7177-7186.
- Moncollin, V., Fisher, L., Cavallini, B., Egly, J. M., and Chambon, P. (1992). ClassII(B) general transcription factor (TFIIB) that binds to the template-committed preinitiation complex is different from general transcription factor BTF3, *Proc Natl Acad Sci USA* *89*, 397-401.
- Moncollin, V., Roy, R. D. W., and Egly, J. M. (1994). The TATA saga. Structure and function of the TATA binding factor. In *Transcription: Mechanism and Regulation*, R. C. a. J. Conaway, ed. (New-York, Raven Press, Ltd), pp. 45-62.
- Moore, J. D., Yang, J., Truant, R., and Kornbluth, S. (1999). Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1, *J Cell Biol* *144*, 213-24.
- Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function, *Curr Opin Cell Biol* *10*, 384-91.
- Morgan, D. O., Fisher, R. P., Espinoza, F. H., Farrell, A., Nourse, J., Chamberlin, H., and Jin, P. (1998). Control of eukaryotic cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinases, *Cancer J Sci Am* *4 Suppl 1*, S77-83.
- Morris, J. R., Chen, J. L., Geyer, P. K., and Wu, C. T. (1998). Two modes of transvection: enhancer action in trans and bypass of a chromatin insulator in cis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 10740-5.
- Mu, D., Park, C. H., Matsunaga, T., Hsu, D. S., Reardon, J. T., and Sancar, A. (1995). Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system, *J Biol Chem* *270*, 2415-2418.

- Mu, D., and Sancar, A. (1997a). DNA excision repair assays, *Prog Nucleic Acid Res Mol Bio* 56, 63-81.
- Mu, D., and Sancar, A. (1997b). Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans, *J Biol Chem* 272, 7570-3.
- Mu, D., Tursun, M., Duckett, D. R., Drummond, J. T., Modrich, P., and Sancar, A. (1997c). Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems, *Mol Cell Biol* 17, 760-9.
- Mu, D., Wakasugi, M., Hsu, D. S., and Sancar, A. (1997d). Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease, *J Biol Chem* 272, 28971-9.
- Muchardt, C., and Yaniv, M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor, *EMBO J* 12, 4279-4290.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., and Dunphy, W. G. (1995a). Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase, *Mol Biol Cell* 6, 119-34.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1995b). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15, *Science* 270, 86-90.
- Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G. E., and Paterniti, J. R., Jr. (1997). Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists, *J Biol Chem* 272, 8071-6.
- Murray, A. (1995). Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis, *Cell* 81, 149-52.
- Na, S. Y., Lee, S. K., Han, S. J., Choi, H. S., Im, S. Y., and Lee, J. W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations, *J Biol Chem* 273, 10831-4.
- Naar, A. M., Boutin, J. M., Lipkin, S. M., Yu, V. C., Holloway, J. M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors, *Cell* 65, 1267-79.
- Naar, A. M., Beaurang, P. A., Robinson, K. M., Oliner, J. D., Avizonis, D., Scheek, S., Zwicker, J., Kadonaga, J. T., and Tjian, R. (1998). Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro, *Genes Dev* 12, 3020-31.
- Naar, A. M., Lemon, B. D., and Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes, *Annu Rev Biochem* 70, 475-501.
- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase, *Cell* 89, 373-80.
- Nakshatri, H., and Chambon, P. (1994). The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol-binding protein II genes are promiscuous binding sites for RAR, RXR, HNF-4, and ARP-1 homo- and heterodimers, *J Biol Chem* 269, 890-902.
- Nasmyth, K. (1996). Viewpoint: putting the cell cycle in order, *Science* 274, 1643-5.
- Naumovski, L., Chu, G., Berg, P., and Friedberg, E. C. (1985). RAD3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence of wild-type and mutant alleles, transcript mapping, and aspects of gene regulation, *Mol Cell Biol* 5, 17-26.
- Nawaz, Z., Lonard, D. M., Dennis, A. P., Smith, C. L., and O'Malley, B. W. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1858-62.
- Neish, A., Anderson, S. F., Shlegel, B. P., Wei, W., and Parvin, J. D. (1998). Factor associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme, *Nucleic Acids Res* 26, 847-853.
- Nickel, B. E., Allis, C. D., and Davie, J. R. (1989). Ubiquitinated histone H2B is preferentially located in transcriptionally active chromatin, *Biochemistry* 28, 958-63.
- Nigg, E. (1996). Cyclin-dependant kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control?, *Curr Opin Cell Biol* 8, 312-317.
- Nikolov, D. B., and Burley, S. K. (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 15-22.
- Nirmala, P. B., and Thampan, R. V. (1995). Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol, *Biochem Biophys Res Commun* 213, 24-31.

- Nishiwaki, E., Turner, S. L., Harju, S., Miyazaki, S., Kashiwagi, M., Koh, J., and Serizawa, H. (2000). Regulation of CDK7-carboxyl-terminal domain kinase activity by the tumor suppressor p16(INK4A) contributes to cell cycle regulation, *Mol Cell Biol* *20*, 7726-34.
- Nocentini, S., Coin, F., Saijo, M., Tanaka, K., and Egly, J.-M. (1997). DNA damage recognition by XPA protein promotes efficient recruitment of transcription factor II H, *J Biol Sci* *272*, 22991-22994.
- Nonet, M. L., and Young, R. A. (1987). Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II, *Genetics* *123*, 715-724.
- Norbury, C., Blow, J., and Nurse, P. (1991). Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates, *Embo J* *10*, 3321-9.
- Nouspikel, T., Lalle, P., Leadon, S. A., Cooper, P. K., and Clarkson, S. G. (1997). A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for a second XPG function, *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 3116-3121.
- Nowak, S. J., and Corces, V. G. (2000). Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci, *Genes Dev* *14*, 3003-13.
- Nudler, E., Goldfarb, A., and Kashlev, M. (1994). Discontinuous mechanism of transcription elongation, *Science* *265*, 793-796.
- O'Donovan, A., Davies, A. A., Moggs, J. G., West, S. C., and Wood, R. D. (1994). XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair, *Nature* *371*, 432-435.
- O'Shea-Greenfield, A., and Smale, S. T. (1992). Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription.
- Obaya, A. J., and Sedivy, J. M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells, *Cell Mol Life Sci* *59*, 126-42.
- Ogryzko, V., Kotani, T., Zhang, X., Schlitz, R., Howard, T., Yang, X., Howard, B., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex., *Cell* *94*(1), 35-44.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases, *Cell* *87*, 953-9.
- Ohkuma, Y., and Roeder, R. G. (1994). Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation, *Nature* *368*, 160-163.
- Ohkuma, Y., Hashimoto, S., Wang, C. K., Horikoshi, M., and Roeder, R. G. (1995). Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIF-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE- α , *Mol Cell Biol* *15*, 4856-4866.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., and Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition, *Mol Cell Biol* *15*, 2612-24.
- Okamoto, H., Sheline, C. T., Corden, J. L., Jones, K. A., and Peterlin, B. M. (1996). Trans-activation by human immunodeficiency virus Tat protein requires the C-terminal domain of RNA polymerase II, *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 11575-11579.
- Okinaka, R. T., Perez-Castro, A. V., Sena, A., Laubscher, K., Strniste, G. F., Park, M. S., Hernandez, R., MacInnes, M. A., and Kraemer, K. H. (1997). Heritable genetic alterations in a xeroderma pigmentosum group G/Cockayne syndrome pedigree, *Mutat Res* *385*, 107-114.
- Oliva, R., Bazett-Jones, D. P., Locklear, L., and Dixon, G. H. (1990). Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle, *Nucleic Acids Res* *18*, 2739-47.
- Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily, *Science* *270*, 1354-7.
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II, *Genes Dev* *10*, 2657-83.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes, *Cell* *92*, 105-16.
- Orphanides, G., Wu, W. H., Lane, W. S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins, *Nature* *400*, 284-8.
- Osburn, D. L., Shao, G., Seidel, H. M., and Schulman, I. G. (2001). Ligand-dependent degradation of retinoid X receptors does not require transcriptional activity or coactivator interactions, *Mol Cell Biol* *21*, 4909-18.
- Ossipow, V., Tassan, J. P., Nigg, E. A., and Schibler, U. (1995). A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all the components required for promoter-specific transcription initiation, *Cell* *83*, 137-146.

- Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A. M., Gustafsson, C. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (1999). Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation, *Molecular Cell* **3**, 109-18.
- Ozer, J., Moore, P. A., Bolden, A. H., Lee, A., Rosen, C. A., and Leiberman, P. M. (1994). Molecular cloning of the small (γ) subunit of human TFIIA reveals functions critical for activated transcription, *Genes dev* **8**, 2324-2335.
- Parada, C. A., and Roeder, R. G. (1996). Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain, *Nature* **384**, 375-378.
- Parge, H. E., Arvai, A. S., Murtari, D. J., Reed, S. I., and Tainer, J. A. (1993). Human CksHs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control, *Science* **262**, 387-95.
- Park, C. H., Mu, D., Reardon, J. T., and Sancar, A. (1995). The general transcription-repair factor TFIIH is recruited to the excision repair complex by the XPA protein independent of the TFIIIE transcription factor, *J Biol Chem* **270**, 4896-4902.
- Park, C. H., and Sancar, A. (1994). Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5017-21.
- Parker, L. L., Atherton-Fessler, S., and Piwnica-Worms, H. (1992). p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15, *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2917-21.
- Parker, L. L., and Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase, *Science* **257**, 1955-7.
- Parvin, J. D., Shykind, B. M., Meyers, R. E., Kim, J., and Sharp, P. (1994). Multiple sets of basal factors initiate transcription by RNA polymerase II, *J Biol Chem* **268**, 18414-18421.
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors, *J Mol Biol* **287**, 821-8.
- Pazin, M. J., Bhargava, P., Geiduschek, E. P., and Kadonaga, J. T. (1997). Nucleosome mobility and the maintenance of nucleosome positioning, *Science* **276**, 809-12.
- Pazin, M. J., and Kadonaga, J. T. (1997). SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions?, *Cell* **88**, 737-40.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J. T., and Price, D. H. (1998). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb, *Genes Dev* **12**, 755-62.
- Perez, C., Auriol, J., Seroz, T., and Egly, J. M. (1998). Genomic organization and promoter characterization of the mouse and human genes encoding p62 subunit of the transcription/DNA repair factor TFIIH, *Gene*.
- Perissi, V., Staszewski, L. M., McInerney, E. M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D. W., Lambert, M. H., Milburn, M. V., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction, *Genes Dev* **13**, 3198-208.
- Peter, M. (1997). The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs), *Prog Cell Cycle Res* **3**, 99-108.
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J., and Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization, *Embo J* **18**, 396-410.
- Pham, A. D., and Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*, *Science* **289**, 2357-60.
- Picard, D., and Yamamoto, K. R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor, *Embo J* **6**, 3333-40.
- Pines, J., and Hunter, T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B, *Embo J* **13**, 3772-81.
- Pinto, I., Ware, D. E., and Hampsey, M. (1992). The yeast *SUA7* gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIIB and is required for normal start site selection in yeast, *Cell* **68**, 977-988.
- Pinto, I., Wu, W. H., Na, J. G., and Hampsey, M. (1994). Characterization of *sua7* mutations defines a domain of TFIIIB involved in transcription start site selection in yeast, *J Biol Chem* **269**, 30569-30573.
- Pollitt, R. J., Jenner, F. A., and Davies, M. (1968). Sibs with mental and physical retardation and trichorrhexis nodosa with abnormal amino acid composition of the hair, *Arch Dis Child* **43**, 211-6.
- Poon, R. Y. C., Yamashita, K., Adamczewski, J. P., Hunt, T., and Shuttleworth, J. (1993). The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2, *EMBO J* **12**, 3123-3132.
- Poon, R. Y. C., Yamashita, K., Howell, M., Ershler, M. A., Belyavsky, A., and Hunt, T. (1994). Cell cycle regulation of the p34cdc2/p33cdk2 activating kinase p40MO15, *J Cell Sci* **107**, 2789-2799.

- Poon, R. Y. C., and Hunter, T. (1995). Innocent bystanders or chosen collaborators?, *Curr Biol* 5, 1243-1247.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work, *Nature* 335, 683-9.
- Rachez, C., Lemon, B. D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Naar, A. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L. P. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex, *Nature* 398, 824-8.
- Rachez, C., and Freedman, L. P. (2001). Mediator complexes and transcription, *Curr Opin Cell Biol* 13, 274-80.
- Rawling, J. M., and Alvarez-Gonzalez, R. (1997). TFIIF, a basal eukaryotic transcription factor, is a substrate for poly(ADP-ribosylation), *Biochem J* 342, 249-253.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., and Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases, *Nature* 406, 593-9.
- Reardon, J. T., Ge, H., Gibbs, E., Sancar, A., Hurwitz, J., and Pan, Z.-Q. (1996). Isolation and characterization of two human transcription factor IIH (TFIIH)-related complexes: ERCC2/CAK and TFIIH, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6482-6487.
- Reardon, J. T., Bessho, T., Kung, H. C., Bolton, P. H., and Sancar, A. (1997). In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9463-8.
- Reines, D., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1996). The RNA polymerase II general elongation factors, *Trends Biochem Sci* 21, 351-355.
- Ren, Y., Behre, E., Ren, Z., Zhang, J., Wang, Q., and Fondell, J. D. (2000). Specific structural motifs determine TRAP220 interactions with nuclear hormone receptors, *Mol Cell Biol* 20, 5433-46.
- Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all- trans retinoic acid, *Nature* 378, 681-9.
- Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H., and Lees, E. (1996). Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II, *Oncogene* 12, 2631-2640.
- Rickert, P., Corden, J. L., and Lees, E. (1999). Cyclin C/CDK8 and cyclin H/CDK7/p36 are biochemically distinct CTD kinases, *Oncogene* 18, 1093-102.
- Rietveld, L. E., Caldenhoven, E., and Stunnenberg, H. G. (2001). Avian erythroleukemia: a model for corepressor function in cancer, *Oncogene* 20, 3100-9.
- Robert, F., Douziech, M., Forget, D., Egly, J. M., Greenblatt, J., Burton, Z. F., and Coulombe, B. (1998). Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIF, *Molecular Cell* 2, 341-51.
- Robles, A. I., Wang, X. W., and Harris, C. C. (1999). Drug-induced apoptosis is delayed and reduced in XPD lymphoblastoid cell lines: possible role of TFIIH in p53-mediated apoptotic cell death, *Oncogene* 18, 4681-8.
- Robyr, D., Wolffe, A. P., and Wahli, W. (2000). Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks, *Mol Endocrinol* 14, 329-47.
- Robzyk, K., Recht, J., and Osley, M. A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast, *Science* 287, 501-4.
- Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Saunders, M., Scheuer, I., Gaub, M. P., and Chambon, P. (1991). Retinoic acid receptor gamma: specific immunodetection and phosphorylation, *J Cell Biol* 115, 535-45.
- Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Staub, A., Pfister, V., Scheuer, I., Chambon, P., and Gaub, M. P. (1995). Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A, *Mol Endocrinol* 9, 860-71.
- Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J. M., and Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIIH and phosphorylation by CDK7, *Cell* 90, 97-107.
- Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II, *Trends Biochem Sci* 21, 327-334.
- Rossi, D. J., Londesborough, A., Korsisaari, N., Pihlak, A., Lehtonen, E., Henkemeyer, M., and Makela, T. P. (2001). Inability to enter S phase and defective RNA polymerase II CTD phosphorylation in mice lacking Mat1, *Embo J* 20, 2844-2856.
- Rossignol, M., Kolb-Cheynel, I., and Egly, J. M. (1997). Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIIH, *Embo J* 16, 1628-37.

- Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1992). Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role?, *Trends Biochem Sci* *17*, 93-8.
- Roy, R., Adamczewski, J. P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J. P., Schaeffer, L., Hoeijmakers, J. H. J., and Egly, J. M. (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor, *Cell* *79*, 1093-1101.
- Roy, B., Taneja, R., and Chambon, P. (1995). Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RA receptor alpha (RAR alpha)-, RAR beta-, or RAR gamma-selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand, *Mol Cell Biol* *15*, 6481-7.
- Rudd, M. D., Izban, M. G., and Luse, D. S. (1994). The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 8057-61.
- Russell, P., Moreno, S., and Reed, S. I. (1989). Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts, *Cell* *57*, 295-303.
- Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast, *Cell* *45*, 145-53.
- Russell, P., and Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog, *Cell* *49*, 559-67.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1996a). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex, *Nature* *382*, 325-331.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1996b). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation, *Nat Struct Biol* *3*, 696-700.
- Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A. G., and Tjian, R. (1999). The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1, *Nature* *397*, 446-50.
- Sadhu, K., Reed, S. I., Richardson, H., and Russell, P. (1990). Human homolog of fission yeast *cdc25* mitotic inducer is predominantly expressed in G2, *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 5139-43.
- Sadovsky, Y., Webb, P., Lopez, G., Baxter, J. D., Fitzpatrick, P. M., Gizang-Ginsberg, E., Cavailles, V., Parker, M. G., and Kushner, P. J. (1995). Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein, *Mol Cell Biol* *15*, 1554-63.
- Saijo, M., Kuraoka, I., Masutani, C., Hanaoka, F., and Tanaka, K. (1996). Sequential binding of DNA repair proteins RPA and ERCC1 to XPA in vitro, *Nucleic Acids Res* *24*, 4719-24.
- Sassone-Corsi, P., Mizzen, C. A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A., and Allis, C. D. (1999). Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3, *Science* *285*, 886-91.
- Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H. J., Chambon, P., and Egly, J. M. (1993). DNA repair helicase: A component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor, *Science* *260*, 58-63.
- Schaeffer, L., and Egly, J. M. (1994). BTF2/TFIIH, un facteur entre transcription et réparation est impliqué dans les maladies de la réparation de l'ADN, *Médecine/Science* *10*, 973-978.
- Schneider, E., Montenarh, M., and Wagner, P. (1998). Regulation of CAK kinase activity by p53, *Oncogene* *17*, 2733-41.
- Schulman, I. G., Chakravarti, D., Juguilon, H., Romo, A., and Evans, R. M. (1995). Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation, *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 8288-92.
- Schurter, B. T., Koh, S. S., Chen, D., Bunick, G. J., Harp, J. M., Hanson, B. L., Henschen-Edman, A., Mackay, D. R., Stallcup, M. R., and Aswad, D. W. (2001). Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1, *Biochemistry* *40*, 5747-56.
- Schwabe, C. (1990). New thoughts on the evolution of hormone-receptor systems, *Comp Biochem Physiol A* *97*, 101-6.
- Schwerk, C., Klotzbucher, M., Sachs, M., Ulber, V., and Klein-Hitpass, L. (1995). Identification of a transactivation function in the progesterone receptor that interacts with the TAFII110 subunit of the TFIID complex, *J Biol Chem* *270*, 21331-8.

- Selby, C. P., Witkin, E. M., and Sancar, A. (1991). *Escherichia coli mfd* mutant deficient in "mutation frequency decline" lacks strand-specific repair: *in vitro* complementation with purified coupling factor, *Proc Natl Acad Sci USA* *88*, 11574-11578.
- Selby, C. P., and Sancar, A. (1993). Molecular mechanism of transcription-repair coupling, *Science* *260*, 53-60.
- Selby, C. P., and Sancar, A. (1997a). Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II, *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 11205-11209.
- Selby, C. P., Drapkin, R., Reinberg, D., and Sancar, A. (1997b). RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair, *Nucleic Acids Res* *25*, 787-793.
- Serizawa, H., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1993). Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription, *Nature* *363*, 371-374.
- Serizawa, H. (1998). Cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A inhibits phosphorylation of RNA polymerase II by general transcription factor TFIIH, *Journal of Biological Chemistry* *273*, 5427-30.
- Seroz, T., Perez, C., Bergmann, E., Bradsher, J., and Egly, J. M. (2000). p44/SSL1, the regulatory subunit of the XPD/RAD3 helicase, plays a crucial role in the transcriptional activity of TFIIH, *J Biol Chem* *275*, 33260-6.
- Serrano, M., Hannon, G. J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4, *Nature* *336*, 704-707.
- Sheflin, L., Keegan, B., Zhang, W., and Spaulding, S. W. (2000). Inhibiting proteasomes in human HepG2 and LNCaP cells increases endogenous androgen receptor levels, *Biochem Biophys Res Commun* *276*, 144-50.
- Shen, S., van der Saag, P. T., and Kruijer, W. (1993). Dominant negative retinoic acid receptor beta, *Mech Dev* *40*, 177-89.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases, *Genes Dev* *9*, 1149-63.
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., and Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen, *Cell* *95*, 927-37.
- Shilatifard, A., Lane, W. S., Jackson, K. W., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1996). An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene, *Science* *271*, 1873-1876.
- Shivji, M. K. K., Podust, V. N., Hubsher, U., and Wood, R. D. (1995). Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA, *Biochemistry* *34*, 5011-5017.
- Shuttelworth, J., Godfrey, R., and Colman, A. (1990). p40MO15, a cdc2-related protein kinase involved on negative regulation of meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes, *EMBO J* *9*, 3233-3240.
- Shuttleworth, J. (1995). The regulation and functions of cdk7, *Prog Cell Cycle Res* *1*, 229-40.
- Sijbers, A. M., van der Spek, P. J., Odijk, H., van den Berg, J., van Duin, M., Westerveld, A., Jaspers, N. G., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1996). Mutational analysis of the human nucleotide excision repair gene ERCC1, *Nucleic Acids Res* *24*, 3370-80.
- Simon, M., Séraphin, B., and Faye, G. (1986). KIN28, a yeast split gene coding for a putative protein kinase homologous to CDC28, *EMBO J* *5*, 2697-2701.
- Solomon, M. J., Lee, T., and Kirschner, M. W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase, *Mol Biol Cell* *3*, 13-27.
- Solomon, M. J., Harper, W. J., and Shuttleworth, J. (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase contains a protein kinase identical to or closely related to p40MO15, *EMBO J* *12*, 3133-3142.
- Solomon, M. J., and Kaldis, P. (1998). Regulation of CDKs by phosphorylation, *Results Probl Cell Differ* *22*, 79-109.
- Soufir, N., Avril, M. F., Chompret, A., Demenais, F., Bombled, J., Spatz, A., Stoppa-Lyonnet, D., Benard, J., and Bressac-de Paillerets, B. (1998). Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group, *Hum Mol Genet* *7*, 209-16.
- Soutoglou, E., Viollet, B., Vaxillaire, M., Yaniv, M., Pontoglio, M., and Talianidis, I. (2001). Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity, *Embo J* *20*, 1984-92.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase, *Nature* *389*, 194-8.

- Stefanini, M., Lagomarsini, P., Arlett, C. F., Marioni, S., Barrone, C., Crovato, F., Trevisan, G., Cordone, G., and Nuzzo, F. (1986). Xeroderma pigmentosum (complementation group D) mutation is present in patients affected with trichothiodystrophy with photosensitivity, *Hum Genet* **74**, 107-112.
- Steinmetz, E. J. (1997). Pre-mRNA processing and CTD of RNA polymerase II: the tail that wags the dog?, *Cell* **89**.
- Stern, B., and Nurse, P. (1996). A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast, *Trends Genet* **12**, 345-50.
- Studitsky, V. M., Kassavetis, G. A., Geiduschek, E. P., and Felsenfeld, G. (1997). Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase, *Science* **278**, 1960-3.
- Suen, C. S., Berrodin, T. J., Mastroeni, R., Cheskis, B. J., Lyttle, C. R., and Frail, D. E. (1998). A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity, *J Biol Chem* **273**, 27645-53.
- Sugasawa, K., Ng, J., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P., Eker, A., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair., *Mol Cell* **2**, 223-232.
- Sun, X., Zhang, Y., Cho, H., Rickert, P., Lees, E., Lane, W., and Reinberg, D. (1998). NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription, *Mol Cell* **2**, 213-22.
- Sung, P., Higgins, D., Prakash, L., and Prakash, S. (1988). Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast RAD3 protein abolishes its ATPase and DNA helicase activities but not the ability to bind ATP, *EMBO J* **7**, 3263-3269.
- Sung, P., Bailly, V., Weber, C., Thompson, L. H., Prakash, L., and Prakash, S. (1993). Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase, *Nature* **365**, 852-855.
- Sung, P., Guzder, S. N., Prakash, L., and Prakash, S. (1996). Reconstitution of TFIIH and requirement of its DNA helicase subunits, Rad3 and Rad25, in the incision step of Nucleotide Excision Repair, *J Biol Chem* **271**, 10821-10826.
- Svejstrup, J. Q., Wang, Z., Feaver, W. J., Wu, X., Bushnell, D. A., Donahue, T. F., C, F. E., and Kornberg, R. D. (1995). Different forms of TFIIH for transcription and DNA repair: holo-TFIIH and a nucleotide excision repairosome, *Cell* **80**, 21-28.
- Svejstrup, J. Q., Li, Y., Fellows, J., Gnatt, A., Bjorklund, S., and Kornberg, R. D. (1997). Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6075-8.
- Svoboda, D. L., Briley, L. P., and Vos, J. M. (1998). Defective bypass replication of a leading strand cyclobutane thymine dimer in xeroderma pigmentosum variant cell extracts, *Cancer Res* **58**, 2445-8.
- Syvala, H., Vienenon, A., Zhuang, Y. H., Kivineva, M., Ylikomi, T., and Tuohimaa, P. (1998). Evidence for enhanced ubiquitin-mediated proteolysis of the chicken progesterone receptor by progesterone, *Life Sci* **63**, 1505-12.
- Taggart, A., and Pugh, B. F. (1996). Dimerization of TFIID when not bound to DNA, *Science* **272**, 1331-1333.
- Takeshita, A., Cardona, G. R., Koibuchi, N., Suen, C. S., and Chin, W. W. (1997). TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1, *J Biol Chem* **272**, 27629-34.
- Takizawa, C. G., and Morgan, D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1- Cdk1 and Cdc25C, *Curr Opin Cell Biol* **12**, 658-65.
- Taneja, R., Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Penna, L., Gaub, M. P., and Chambon, P. (1997). Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment, *Embo J* **16**, 6452-65.
- Tantin, D., Kansal, A., and Carey, M. (1997). Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes, *Mol Cell Biol* **17**, 6803-6814.
- Tantin, D. (1998). RNA polymerase II elongation complexes containing the Cockayne syndrome group B protein interact with a molecular complex containing the transcription factor IIH components xeroderma pigmentosum B and p62, *J Biol Chem* **273**, 27794-9.
- Tassan, J. P., Shultz, S. J., Bartek, J., and Nigg, E. A. (1994). Cell cycle analysis of the activity, subcellular localisation, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase), *J Cell Biol* **127**, 467-478.
- Tassan, J. P., Jaquenoud, M., Fry, A. M., Frutiger, S., Hughes, G. J., and Nigg, E. A. (1995a). In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein, *EMBO J* **14**, 5608-5617.

- Tassan, J. P., Jaquenoud, M., Léopold, P., Shultz, S. J., and Nigg, E. A. (1995b). Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C, *Proc Natl Acad Sci USA* *92*, 8871-8875.
- Tate, B. F., Allenby, G., Perez, J. R., Levin, A. A., and Grippo, J. F. (1996). A systematic analysis of the AF-2 domain of human retinoic acid receptor alpha reveals amino acids critical for transcriptional activation and conformational integrity, *Faseb J* *10*, 1524-31.
- Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p, *Science* *272*, 408-11.
- Taylor, S. S., and Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif, *Structure* *2*, 345-55.
- Tennyson, C. N., Klamut, H. J., and Worton, R. G. (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced, *Nature Genetics* *9*, 184-90.
- Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). NF-kappa B: a lesson in family values, *Cell* *80*, 529-32.
- Thomas, D., and Tyers, M. (2000). Transcriptional regulation: Kamikaze activators, *Curr Biol* *10*, R341-3.
- Thompson, C. M., Koleske, A. J., Chao, D. M., and Young, R. A. (1993). A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast, *Cell* *73*, 1361-1375.
- Thomson, S., Mahadevan, L. C., and Clayton, A. L. (1999). MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction, *Semin Cell Dev Biol* *10*, 205-14.
- Thuret, J.-Y., Valay, J.-G., Faye, G., and Mann, C. (1996). Civ1 (CAK In Vivo), a novel Cdk-activating kinase, *Cell* *86*, 565-576.
- Tijsterman, M., Verhage, R. A., van de Putte, P., Tasserion-de Jong, J. G., and Brouwer, J. (1997). Transitions in the coupling of transcription and nucleotide excision repair within RNA polymerase II-transcribed genes of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 8027-8032.
- Timmers, H. T. M. (1994). Transcription initiation by RNA polymerase II does not require hydrolysis of β - γ phosphoanhydride bond of ATP, *EMBO J* *13*, 391-399.
- Tirorde, F., Busso, D., Coin, F., and Egly, J. M. (1999). Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7, *Mol Cell* *3*, 87-95.
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions, *Cell* *59*, 477-87.
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function, *Nature* *387*, 677-84.
- Tremblay, A., Tremblay, G. B., Labrie, F., and Giguere, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1, *Mol Cell* *3*, 513-9.
- Tremeau-Bravard, A., Perez, C., and Egly, J. M. (2001). A role of the C-terminal part of p44 in the promoter escape activity of TFIIH, *J Biol Chem* *273*, 23.
- Treuter, E., Johansson, L., Thomsen, J. S., Warnmark, A., Leers, J., Pelto-Huikko, M., Sjoberg, M., Wright, A. P., Spyrou, G., and Gustafsson, J. A. (1999). Competition between thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) 220 and transcriptional intermediary factor (TIF) 2 for binding to nuclear receptors. Implications for the recruitment of TRAP and p160 coactivator complexes, *J Biol Chem* *274*, 6667-77.
- Trigon, S., Serizawa, H., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Jackson, S. P., and Morange, M. (1998). Characterization of the residues phosphorylated in vitro by different C-terminal domain kinases, *J Biol Chem* *273*, 6769-75.
- Troelstra, C., Heslen, W., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1993). Structure and expression of the excision repair gene ERCC6, involved in the human disorder Cockayne's syndrome group B, *Nucleic Acids Res* *21*, 419-426.
- Tsai, F. T., and Sigler, P. B. (2000). Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters, *EMBO Journal* *19*, 25-36.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., and Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes, *Embo J* *13*, 3822-31.
- Tu, Y., Bates, S., and Pfeifer, G. P. (1997). Sequence-specific and domain-specific DNA repair in xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome cells, *J Biol Chem* *272*, 20747-20755.

- Tu, Y., Bates, S., and Pfeifer, G. P. (1998). The transcription-repair coupling factor CSA is required for efficient repair only during the elongation stages of RNA polymerase II transcription, *Mutat Res* **400**, 143-151.
- Tyrrell, R. M., and Amaudruz, F. (1987). Evidence for two independent pathways of biologically effective excision repair from its rate and extent in cells cultured from sun-sensitive humans, *Cancer Res* **47**, 3725-8.
- Ucker, D. S., and Yamamoto, K. R. (1984). Early events in the stimulation of mammary tumor virus RNA synthesis by glucocorticoids. Novel assays of transcription rates, *Journal of Biological Chemistry* **259**, 7416-20.
- Umeda, M., Bhalerao, R. P., Schell, J., Uchimiya, H., and Koncz, C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5021-6.
- Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G., and Wolfe, A. P. (1997). Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression, *EMBO J* **16**, 2096-2107.
- Usheva, A., Maldonado, E., Goldring, A., Lu, H., Houbavi, C., Reinberg, D., and Aloni, J. (1992). Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein, *Cell* **69**, 871-881.
- Valay, J. G., Simon, M., and Faye, G. (1993). The Kin28 protein kinase is associated with a cyclin in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Mol Biol* **234**, 307-310.
- Valay, J. G., Simon, M., Dubois, M. F., Bensaude, O., Facca, C., and Faye, G. (1995). The Kin28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1p CTD, *J Mol Biol* **249**, 535-544.
- van den Heuvel, S., and Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control, *Science* **262**, 2050-4.
- van Gool, A. J., Verhage, R., Swagemakers, S. M., van de Putte, P., Brouwer, J., Troelstra, C., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1994). RAD26, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene ERCC6, *EMBO J* **13**, 5361-5369.
- van Gool, A. J., Citterio, E., Rademakers, S., van Os, R., Vermeulen, W., Constantinou, A., Egly, J.-M., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. J. (1997a). The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex, *EMBO J* **16**, 5955-5965.
- van Gool, A. J., van der Horst, G. T., Citterio, E., and Hoeijmakers, J. H. (1997b). Cockayne syndrome: defective repair of transcription?, *Embo J* **16**, 4155-62.
- van Hoffen, A., Kalle, W. H., de Jong-Versteeg, A., Lehmann, A. R., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. (1999). Cells from XP-D and XP-D-CS patients exhibit equally inefficient repair of UV-induced damage in transcribed genes but different capacity to recover UV-inhibited transcription, *Nucleic Acids Res* **27**, 2898-904.
- van Holde, K. E., Lohr, D. E., and Robert, C. (1992). What happens to nucleosomes during transcription?, *J Biol Chem* **267**, 2837-40.
- van Holde, K., and Zlatanova, J. (1996). What determines the folding of the chromatin fiber?, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10548-55.
- van Oosterwijk, M. F., Versteeg, A., Filon, R., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. F. (1996). The sensitivity of Cockayne's syndrome cells to DNA-damaging agents is not due to defective transcription-coupled repair of active genes, *Mol Cell Biol* **16**, 4436-4444.
- Vedeckis, W. V. (1983). Limited proteolysis of the mouse liver glucocorticoid receptor, *Biochemistry* **22**, 1975-83.
- Venema, J., Mullenders, L. H., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A., and Mayne, L. V. (1990). The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA, *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4707-4711.
- Vermeulen, W., Jaeken, J., Jaspers, N. G., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1993). Xeroderma pigmentosum complementation group G associated with Cockayne syndrome, *Am J Hum Genet* **53**, 185-192.
- Vermeulen, W., Scott, R. J., Potger, S., Müller, H. J., Cole, J., Arlett, C. F., Kleijer, W. J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J., and Weeda, G. (1994a). Clinical heterogeneity within xeroderma pigmentosum

- associated with mutations in the DNA repair and transcription gene ERCC3, *Am J Hum Genet* *54*, 191-200.
- Vermeulen, W., van Vuuren, A. J., Chipoulet, M., Schaeffer, L., Appeldoorn, E., Weeda, G., Jaspers, N. G. J., Priestley, A., Arlett, C. F., Lehmann, A. R., *et al.* (1994b). Three unusual repair deficiencies associated with transcription factor BTF2 (TFIIH). Evidence for the existence of a transcription syndrome., *Cold Spring Harbor Quant Symp* *LIX*, 317-329.
- Vermeulen, W., Bergmann, E., Auriol, J., Rademakers, S., Frit, P., Appeldoorn, E., Hoeijmakers, J. H., and Egly, J. M. (2000). Sublimiting concentration of TFIIH transcription/DNA repair factor causes TTD-A trichothiodystrophy disorder, *Nat Genet* *26*, 307-13.
- Veschambre, P., Roisin, A., and Jalinot, P. (1997). Biochemical and functional interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator with the general transcription factor TFIIB, *J Gen Virol* *78*, 2235-45.
- Vettese-Dadey, M., Grant, P. A., Hebbes, T. R., Crane-Robinson, C., Allis, C. D., and Workman, J. L. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro, *Embo J* *15*, 2508-18.
- Vivat, V., Zechel, C., Wurtz, J. M., Bourguet, W., Kagechika, H., Umemiya, H., Shudo, K., Moras, D., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1997). A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers, *Embo J* *16*, 5697-709.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors, *Embo J* *15*, 3667-75.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways, *Embo J* *17*, 507-19.
- Wade, P. A., Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1997). Histone acetylation: chromatin in action, *Trends Biochem Sci* *22*, 128-32.
- Wakasugi, M., Reardon, J. T., and Sancar, A. (1997). The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair, *J Biol Chem* *272*, 16030-4.
- Wakasugi, M., and Sancar, A. (1999). Order of assembly of human DNA repair excision nuclease, *J Biol Chem* *274*, 18759-68.
- Wallace, A. D., and Cidlowski, J. A. (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids, *J Biol Chem* *276*, 42714-21.
- Wallberg, A. E., Neely, K. E., Hassan, A. H., Gustafsson, J. A., Workman, J. L., and Wright, A. P. (2000). Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain, *Mol Cell Biol* *20*, 2004-13.
- Wallenfang, M. R., and Seydoux, G. (2002). cdk-7 is required for mRNA transcription and cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* embryos, *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 5527-32.
- Walter, P. P., Owen-Hughes, T. A., Cote, J., and Workman, J. L. (1995). Stimulation of transcription factor binding and histone displacement by nucleosome assembly protein 1 and nucleoplasmin requires disruption of the histone octamer, *Mol Cell Biol* *15*, 6178-87.
- Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Friedberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., *et al.* (1995a). p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity, *Nature Genet* *10*, 188-195.
- Wang, Z., Buratowski, S., Svejstrup, J. Q., Feaver, W. J., Wu, X., Kornberg, R. D., Donahue, T. F., and Friedberg, E. C. (1995b). The yeast TFB1 and SSL1 genes, which encode subunits of transcription factor IIH, are required for nucleotide excision repair and polymerase II transcription, *Mol Cell Biol* *15*, 2288-2293.
- Wang, J. C., Stafford, J. M., and Granner, D. K. (1998). SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4, *J Biol Chem* *273*, 30847-50.
- Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001a). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4- specific methyltransferase, *Mol Cell* *8*, 1207-17.
- Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001b). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor, *Science* *293*, 853-7.

- Weber, C. A., Salazar, E. P., Stewart, S. A., and Thompson, L. H. (1988). Molecular cloning and biological characterization of a human gene, *ERCC2*, that corrects the nucleotide excision repair defect in CHO UV5 cells, *Mol Cell Biol* *8*, 1137-114.
- Weeda, G., van Ham, R. C. A., Vermeulen, W., Bootsma, D., van der Eb, A. J., and Hoeijmakers, J. H. J. (1990). A presumed DNA helicase encoded by *ERCC-3* is involved in the human repair disorders Xeroderma Pigmentosum and Cockayne's syndrome, *Cell* *62*, 777-791.
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H., and Jones, K. A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA, *Cell* *92*, 451-62.
- Weigel, N. L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation, *Biochem J* *319*, 657-67.
- Weis, L., and Reinberg, D. (1992). Transcription by RNA polymerase II: initiator directed formation of transcription-competent complexes, *FASEB J* *6*, 3300-3309.
- Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B. R., White, M. F., Workman, J. L., and Owen-Hughes, T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex, *Nature* *400*, 784-7.
- Wieczorek, E., Brand, M., and Tora, L. (1998). RNA polymerase II transcription without TBP: a novel endogenous TBP-free TAFII-containing multiprotein complex is also able to function as TFIID, *Nature* *393*, 187-191.
- Williams, R. T., Wu, L., Carbonaro-Hall, D. A., and Hall, F. L. (1994). Identification, assay, and purification of a Cdc2-activating threonine-161 protein kinase from human cells, *Arch Biochem Biophys* *314*, 99-106.
- Wilson, C. J., Chao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., and Young, R. A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling, *Cell* *84*, 235-244.
- Winkler, G. S., Araujo, S. J., Fiedler, U., Vermeulen, W., Coin, F., Egly, J. M., Hoeijmakers, J. H., Wood, R. D., Timmers, H. T., and Weeda, G. (2000). TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair [In Process Citation], *J Biol Chem* *275*, 4258-66.
- Winston, F., and Sudarsanam, P. (1998). The SAGA of Spt proteins and transcriptional analysis in yeast: past, present, and future, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *63*, 553-61.
- Wolffe, A. P., and Hayes, J. J. (1999). Chromatin disruption and modification, *Nucleic Acids Res* *27*, 711-20.
- Wood, R. D., and Shivji, M. K. (1997). Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes?, *Carcinogenesis* *18*, 605-10.
- Wu, L., Chen, P., Hwang, J. J., Barsky, L. W., Weinberg, K. I., Jong, A., and Starnes, V. A. (1999). RNA antisense abrogation of *MAT1* induces G1 phase arrest and triggers apoptosis in aortic smooth muscle cells, *J Biol Chem* *274*, 5564-72.
- Wu, L., Chen, P., Shum, C. H., Chen, C., Barsky, L. W., Weinberg, K. I., Jong, A., and Triche, T. J. (2001). *MAT1*-modulated *CAK* activity regulates cell cycle G(1) exit, *Mol Cell Biol* *21*, 260-70.
- Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors, *Nat Struct Biol* *3*, 206.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J. L., Triezenberg, S. J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C. J., and Greenblatt, J. (1994). Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domain of VP16 and p53, *Mol Cell Biol* *14*, 7013-7024.
- Xie, Z., and Price, D. (1997). Drosophila factor 2, an RNA polymerase II transcript release factor, has DNA-dependent ATPase activity, *Journal of Biological Chemistry* *272*, 31902-7.
- Xu, L., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function, *Curr Opin Genet Dev* *9*, 140-7.
- Yamaguchi, M., Umeda, M., and Uchimiya, H. (1998). A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent protein kinases and the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II, *Plant J* *16*, 613-9.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999a). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation, *Cell* *97*, 41-51.
- Yamaguchi, Y., Wada, T., Watanabe, D., Takagi, T., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999b). Structure and function of the human transcription elongation factor DSIF, *Journal of Biological Chemistry* *274*, 8085-92.

- Yamamoto, S., Watanabe, Y., van der Spek, P. J., Watanabe, T., Fujimoto, H., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. (2001). Studies of nematode TFIIE function reveal a link between Ser-5 phosphorylation of RNA polymerase II and the transition from transcription initiation to elongation, *Mol Cell Biol* *21*, 1-15.
- Yan, M., and Gralla, J. D. (1997). Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation, *EMBO J* *26*, 7457-7467.
- Yan, M., and Gralla, J. D. (1999). The use of ATP and initiating nucleotides during postrecruitment steps at the activated adenovirus E4 promoter, *Journal of Biological Chemistry* *274*, 34819-24.
- Yan, Q., Moreland, R. J., Weliky Conaway, J., and Conaway, R. C. (1999). Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II, *Journal of Biological Chemistry* *274*, 35668-75.
- Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Watanabe, M., Kashiwagi, K., Toriyabe, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Kato, S. (1999). Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators, *Science* *283*, 1317-21.
- Yang, J., and Kornbluth, S. (1999). All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners, *Trends Cell Biol* *9*, 207-10.
- Yang, W., Rachez, C., and Freedman, L. P. (2000). Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators, *Mol Cell Biol* *20*, 8008-17.
- Yang, X., Herrmann, C. H., and Rice, A. P. (1996). The human immunodeficiency virus Tat proteins specifically associate with TAK in vivo and require the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II for function, *J Virol* *70*, 4576-84.
- Yankulov, K., and Bentley, D. L. (1997). Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIH, *EMBO J* *16*, 1638-1646.
- Yao, T. P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R., and Livingston, D. M. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300, *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 10626-31.
- Yee, A., Nichols, M. A., Wu, L., Hall, F. L., Kobayashi, R., and Xiong, Y. (1995). Molecular cloning of CDK7-associated human MAT1, a cyclin-dependant kinase-activating kinase (CAK) assembly factor, *Cancer Res* *55*, 6058-6062.
- Ylikomi, T., Bocquel, M. T., Berry, M., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors, *Embo J* *11*, 3681-94.
- Yonaha, M., Tsuchiya, T., and Yasukochi, Y. (1997). Cell-cycle-dependent phosphorylation of the basal transcription factor RAP74, *FEBS Lett* *410*, 477-480.
- Yoon, H., Miller, S. P., Pabich, E. K., and Donahue, T. F. (1992). SSL1, a suppressor of a HIS4 5'-UTR stem-loop mutation, is essential for translation initiation and affects UV resistance in yeast, *Genes Dev* *6*, 2463-77.
- Yoshinaga, S. K., Peterson, C. L., Herskowitz, I., and Yamamoto, K. R. (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors, *Science* *258*, 1598-604.
- Young, R. A. (1991). RNA polymerase II, *Annu Rev Biochem* *60*, 689-715.
- Yudkovsky, N., Ranish, J. A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator, *Nature* *408*, 225-9.
- Yue, Z., Maldonado, E., Pillutla, R., Cho, H., Reinberg, D., and Shatkin, A. J. (1997). Mammalian capping enzyme complements mutant *Saccharomyces cerevisiae* lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II, *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 12898-12903.
- Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R. M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., and Lazar, M. A. (1997). Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 14400-5.
- Zawel, L., and Reinberg, D. (1993). Initiation of transcription by RNA pol II: a multi-step process, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* *44*, 67-108.
- Zawel, L., Kumar, K. P., and Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription, *Genes Dev* *9*, 1479-90.
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1994a). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements, *Embo J* *13*, 1414-24.
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1994b). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats, *Embo J* *13*, 1425-33.

-
- Zehring, W. A., Lee, J. M., Weeks, J. R., Jokerst, R. S., and Greenleaf, A. L. (1988). The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential *in vivo* but is not required for accurate transcription initiation *in vitro*, *Proc Natl Acad Sci USA* *85*, 3698-3702.
- Zhang, J., and Corden, J. L. (1991). Phosphorylation causes a conformational change in the carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit, *J Biol Chem* *266*, 2297-2302.
- Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex, *Cell* *89*, 357-64.
- Zhang, W., Kadam, S., Emerson, B. M., and Bieker, J. J. (2001). Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Kruppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex, *Mol Cell Biol* *21*, 2413-22.
- Zhou, Z. X., Sar, M., Simental, J. A., Lane, M. V., and Wilson, E. M. (1994). A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences, *J Biol Chem* *269*, 13115-23.
- Zhu, Y., Qi, C., Calandra, C., Rao, M. S., and Reddy, J. K. (1996). Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *Gene Expr* *6*, 185-95.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Armendt, B., Mathews, M. B., and Price, D. H. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation *in vitro*, *Genes Dev* *11*, 2622-2632.

RESUME

Implications de la kinase de TFIIH dans les mécanismes de régulation de la transcription.

La régulation de l'expression des gènes est essentielle à la survie d'une cellule. Parmi les nombreuses étapes menant d'un gène à son produit, la transcription est sans doute la plus complexe et la plus contrôlée. Schématiquement, la transcription est composée d'une activité dite "de base", catalysée par l'ARN polymérase II et 6 facteurs généraux de transcription (TFIIA, B, D, E, F et H), ainsi qu'une régulation positive ou négative par des co-facteurs. Ces activateurs ou répresseurs transcriptionnels modulent l'activité basale en réponse à des stimuli, comme des signaux hormonaux, en interférant avec les activités enzymatiques de la machinerie basale.

Au cours de mes études doctorales, je me suis intéressée aux événements de phosphorylation qui participent à la régulation de la transcription, et particulièrement aux activités kinase de TFIIIF et de TFIIH. Nous avons ainsi caractérisé les sites de phosphorylation du facteur de transcription TFIIIF et défini leur rôle lors de l'élongation de la transcription. Nous avons également caractérisé la fonction des différents sous-domaines de la sous-unité MAT1 de TFIIH dans l'architecture de ce complexe et lors de l'initiation de la transcription. Enfin, nous avons démontré que des altérations de la sous-unité XPD de TFIIH perturbent son rôle lors de l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires. Cela pourrait fournir une explication à certains phénotypes observés chez les patients portant des mutations dans le gène *xpd* et atteints du *Xeroderma pigmentosum*, de la Trichothiodystrophie ou du syndrome de Cockayne.

SUMMARY

Involvements of the kinase of TFIIH in the mechanisms of transcription regulation

Regulation of genes' expression is essential for the survival of a cell. Among the numerous steps leading to the gene's product, transcription is the most complex and the most tightly regulated. Schematically, the transcription mechanism is composed of a "basal" activity, catalysed by RNA polymerase II helped by 6 general transcription factors (TFIIA, B, D, E, F and H), and a positive or negative regulation by co-factors. These transcriptional activators and repressors modulate the basal activity in response to various stimuli, such as hormonal signals, by interfering with the enzymatic activities of the basal machinery.

During my PhD studies, I have been interested in the phosphorylation events that regulate transcription, and more particularly the kinase activities of the transcription factors TFIIIF and TFIIH. We have characterized the phosphorylation sites of TFIIIF and determined their roles in the elongation of transcription. We have also characterized the function of the various sub-domains of the MAT1 subunit of TFIIH in the architecture of this complex and in the initiation of transcription. Finally, we have shown that alterations in the XPD subunit of TFIIH alters its function in the transactivation of transcription by nuclear receptors. This could explain some of the phenotypes observed in patients carrying mutations in the *xpd* gene and suffering from *Xeroderma pigmentosum*, Trichothiodystrophy or Cockayne syndrome.

Mots clefs : transcription, phosphorylation, kinase, TFIIH, récepteurs nucléaires, transactivation.

Discipline : Sciences du Vivant. **Spécialité** : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Lieu de préparation de la thèse : Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes (UPR 6520 du CNRS) et Unité de Biologie Moléculaire et de Génie Génétique (U184 INSERM), IGBMC, 1, rue Laurent Fries, Parc d'Innovation, 67404 Illkirch Cedex