HAL
open science

Etude des interactions entre le Médiateur et les facteurs généraux de la transcription par l'ARN polymérase II.

Cyril Esnault

To cite this version:

Cyril Esnault. Etude des interactions entre le Médiateur et les facteurs généraux de la transcription par l'ARN polymérase II.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT : . tel-00553498

HAL Id: tel-00553498

https://theses.hal.science/tel-00553498v1

Submitted on 7 Jan 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PARIS-SUD U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

École doctorale « Gènes, Génomes, Cellules »

Présentée et soutenue publiquement le 25 septembre 2007

par

Cyril Esnault

Étude des interactions entre le Médiateur et les facteurs généraux de la transcription par l'ARN polymérase II.

Jury

Pr. Suzane Sommer, Présidente

Dr. Jean-Christophe Andrau, Rapporteur

Dr. Henri-Marc Bourbon, Rapporteur

Pr. Jean-Marc Egly, Examinateur

Dr. Laurent Kuras, Examinateur

Dr. Michel Werner, Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier Suzanne Sommer, Jean-Christophe Andrau, Henri-Marc Bourbon, Laurent Kuras et Jean-Marc Egly de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie tout particulièrement Michel Werner de m'avoir accueilli dans son laboratoire, d'avoir dirigé ma thèse et d'avoir su me communiquer son sens de la rigueur et de l'organisation. Merci, grâce à toi, j'ai réussi à évoluer d'un étudiant en DEA un peu maladroit de temps en temps, vers un étudiant beaucoup plus sûr de lui et sans doute plus réfléchi en fin de thèse.

Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe que j'ai croisés au cours de ma thèse. Benjamin, Mehdi, et Gabrielle qui composaient l'équipe de Michel lors de mon arrivée, qui m'ont encadré et qui m'ont appris les rudiments du laboratoire à mes débuts. Sylvain qui a fait un passage écourté dans l'équipe, avec qui les moments de franche rigolade et de fou rire n'était pas rare (Ouille ouille ouille). Claire que j'ai côtoyée tout au long de ma thèse, qui m'a aidé techniquement et avec qui il est toujours agréable de travailler, même si elle a fui sa paillasse à côté de la mienne sous prétexte que mon désordre empiétait sur sa partie. Julie, avec qui il est toujours agréable de discuter, qui est également toujours disponible et prête à faire partager son expérience et donner son point de vue, et dont l'arrivée dans l'équipe de Michel a coïncidé avec celles de résultats de plus en plus prometteurs au cours de mes expériences. Et enfin, Yad (ou Yadou), la dernière à être arrivée qui est notre spécialiste des tableaux Excel, qui parle régulièrement avec son ordinateur et qui a supporté toutes nos blagues avec Sylvain.

Merci aux membres de la pièce située de l'autre côté de la pièce bruit, dit les « Thuriaux ». Pierre, pour l'ensemble de nos échanges scientifiques passionnants et passionnés. Cécile, Daphnée, Gwénaëlle et Léna, qui étaient là au début et qui m'ont accueillie chaleureusement. Sylvie, toujours au poste et prête à discuter ou rendre service et qui fait de merveilleuses pâtisseries. Maxime (ou Max ou Maxouille) tout droit venu de Belgique, incomparable dans ses imitations de Benoît Poelvoorde et avec qui j'ai passé de très bons moments. Marta, notre polonaise, toujours de bonne humeur et pétillante. Et enfin

Frederic (Fred) qui a commencé sa thèse en même temps que moi, et avec qui j'ai partagé tous les moments agréables, stressants et enthousiasmants d'une thèse.

Merci également à tous les membres du RDC du bâtiment 144, et plus particulièrement : Nico, toujours prêt à rendre service, Camille, toujours prête à critiquer (je charrie, j'aurais pu dire toujours prête à boire un coup ou jamais prête pour aller manger), Gilles (ou Gillou, expatrié au 142), toujours prêt pour jouer au billard, au foot et à boire un coup, Marie-claude, toujours prête à bavarder, Jean-Marc, toujours prêt à rire, Arlette, toujours prête à laver de la verrerie dans l'urgence et même à rapporter des sandwichs de la cantine.

Je remercie également les membres du premier étage du bâtiment 144, et particulièrement, Emilie, Céline, Willy et Gigi avec qui j'ai passé de très bons moments, Stéphane (exilé au 142) pour l'ensemble de ses conseils, Benoît l'instigateur des sessions bières du vendredi et Nayla et Vivienne, les fidèles de ces sessions.

Enfin je remercie les personnes qui m'ont entouré en dehors du laboratoire.

Je remercie l'ensemble de mes amis avec une intention particulière pour mes amis de Vélizy, Arnaud, JP et Manu, pour les PTP alias les Dédés, Bayne et Aurélie, pour les chatenaysiens, Agnès, Candide, Jen et Martin, pour les Nantais, Maud, Fabien et Caroline, pour les anciennes du DEUG, Marie et Cécile et pour les anciens de Médecine, Aude-Hélène, Sabine, Thomas et Zaher.

Je remercie également les Glotin and Co, Jackie, Gérard, Guéna, Bert, Nina, François et Sylvie pour leur accueil et pour les moments passés ensemble.

Pour terminer je tiens à remercier l'ensemble de ma famille qui m'a toujours soutenu et Anne-Lise qui fait de mon quotidien un véritable bonheur.

Table des matières

AVANT-PROPOS 5
INTRODUCTION.....7
Chapitre I : La transcription des gènes de classe II.....9
I.1 Séquences régulatrices de l'ADN 9
I.1.1 Structure du promoteur 9
I.1.2 Les éléments de régulation.....11
I.2 Les facteurs généraux de la transcription par l'ARN polymérase II.....11
I.2.1 TFIID 12
I.2.2 TFIIA 12
I.2.3 TFIIB.....12
I.2.4 TFIIF 13
I.2.5 TFIIE.....13
I.2.6 TFIIH 14
I.3 L'ARN Polymérase II 14
I.3.1 Organisation de l'ARN polymérase II.....14
I.3.3 Le domaine Carboxy-terminal de Rpb1 (CTD) 15
I.3.2 Structure de l'ARN Polymérase II 16
I.4 La transcription par l'ARN polymérase II.....18
I.4.1 Initiation de la transcription 18
I.4.2 Elongation de la transcription.....20
I.4.3 Terminaison de la transcription.....21
I.5 La transcription dans un contexte chromatinien 21
I.5.1 Variants et modifications des histones associées à la transcription.....21
I.5.2 Initiation de la transcription dans un contexte chromatinien 23
I.5.3 L'élongation de la transcription dans un contexte chromatinien.....24
I.6 La régulation de la transcription.....25
I.6.1 Les répresseurs 25
I.6.2 Les activateurs.....26
I.6.3 Les coactivateurs 26
Chapitre II: Le facteur général de la transcription TFIIH.....31
II.1 Les sous-unités de TFIIH 31
II.1.1 Le cœur de TFIIH.....31
II.1.2 Le sous-complexe TFIIK/CAK.....35
II.2 La structure de TFIIH.....36
II.3 Les fonctions de TFIIH 38
II.3.1 Rôle dans la réparation de l'ADN.....38
II.3.2 Rôle dans le cycle cellulaire.....40
II.2.3 Rôle dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II 41
Chapitre III: Le facteur d'élongation TFIIS.....43
III.1 Identification et caractérisation de TFIIS.....43
III.2 Structure et mode d'action de TFIIS.....45
Chapitre IV: Le Médiateur de la transcription par l'ARN polymérase II 49
IV.1 Le Médiateur de *Saccharomyces cerevisiæ* 49
IV.1.1 Découverte et caractérisation du Médiateur.....49
IV.1.2 Organisation et structure du Médiateur de *S. cerevisiae*.....50
IV.2 Le Médiateur des animaux.....53
IV.2.1 Identification et composition.....53
IV.2.2 Conservation du Médiateur 55

IV.2.3 Etudes fonctionnelles et pathologies.....56
IV.3 Mécanismes de la régulation de l'expression des gènes par le Médiateur.....59
IV.3.1 Interactions entre le Médiateur et les activateurs spécifiques.....59
IV.3.2 Interactions entre le Médiateur et l'ARN polymérase II.....60
IV.3.3 Interaction entre le Médiateur et les facteurs généraux.....62
IV.3.4 Etudes du recrutement du Médiateur sur l'ADN *in vivo*.....64
IV.3.5 Le Médiateur et les autres coactivateurs.....65
IV.3.6 Le Médiateur, une plateforme pour la réinitiation.....67
IV.3.7 Activité de modification des histones du Médiateur.....67
IV.3.8 Régulation négative de la transcription par le Médiateur.....68
IV.3.9 Le Médiateur : un facteur général de la transcription.....69
RESULTATS ET DISCUSSION.....71
I Rôle du Médiateur et de TFIIS dans l'étape d'initiation.....73
I.1 Contexte du travail.....73
I.2 Article 1.....76
II Rôle du Médiateur dans la mise en place du PIC in vivo.....111
II.1 Contexte du travail.....111
II.2 Article 2.....114
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....157
BIBLIOGRAPHIE.....173

Table des illustrations

Figure 1: Cycle de transcription.....8
Figure 2: Position des différents éléments d'un promoteur eucaryote.....10
Figure 3: Profil de phosphorylation du CTD dicté par les facteurs associés à Pol II au cours de la transcription.....17
Figure 4: Structure de l'ARN polymérase II obtenue par diffraction des rayons X. 17
Figure 5: Schéma de la mise en place du complexe de préinitiation *in vitro*. 19
Figure 6: Complexe de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP. 29
Figure 7: Organisation et polymorphisme de XPD associé aux maladies génétiques. 33
Figure 8: Modèle de microscopie électronique des complexes TFIIH humain et de levure. ...37
Figure 9: Schéma des différentes étapes de la NER et de la TCR. 39
Figure 10: Schéma du cycle arrêt/redémarrage de la transcription par l'ARN polymérase II. 44
Figure 11: Architecture de TFIIS associée à l'ARN polymérase II de *S. cerevisiae*. 46
Figure 12: Structure du Médiateur. 51
Figure 13**:** Organisation du Médiateur. 52
Figure 14: Comparaison des modèles des Médiateurs de levure, murin et humain.....55
Figure 15: Modèle de microcopie électronique du complexe Médiateur/Pol II. 61
Figure 16: Carte d'interactions génétiques du Médiateur chez *S. cerevisiae*. 70
Figure 17: Influence du Médiateur sur l'assemblage du PIC et sur la phosphorylation du CTD. 163
Figure 18: Modèle structural de XPD et localisation des mutations impliquées dans XP, CS et TTD. 165
Figure 19**:** Analyse par double-hybride des interactions entre Med11 et Med22.....169
Figure 20: Schéma des interactions entre les protéines essentielles du Médiateur et des protéines impliquées dans les processus nucléaires. 171

Table 1: Composition en sous-unités de l'ARN Polymérase II 15
Table 2: Modifications des histones associées à la transcription.....22
Table 3: Variants d'histone impliqués dans la régulation de la transcription.....23
Table 4: Le complexe TFIIH 30
Table 5: Nomenclature unifiée du Médiateur. 57

Abréviations

3AT: 3-aminotriazole
6-AU : 6-azauracil
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messger
ATP: Adenosine Triphosphate
BRE: Elément de reconnaissance par TFIIB
ChIP : Immunoprécipitation de chromatine (« Chromatin ImmunoPrecipitation »)
CS: syndrome de Cokayne
CTD : Domaine carboxy-terminal de Rpb1 (« Carboxy Terminal Domain »)
DPE: Elément du promoteur aval (« Downstream Promoter Element »)
GTF: Facteurs Généraux de la Transcription
HAT : Histone Acetyl-Transférase
Inr : Séquence initiatrice
MPA : Mycophénolate
MudPIT : Technologie multidimensionnelle d'identification de protéines (« Multidimensional Protein Identification Technology »)
NER: Réparation par excision de nucléotide (« Nucleotide excision repair »)
ORF : Phase ouverte de lecture (« Open Reading Frame »)
PIC: Complexe de préinitiation (« PreInitiation Complex »)
Pol I : ARN polymérase I
Pol II : ARN polymérase II
Pol III : ARN polymérase III
S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*
S. pombe : *Schizosaccharomyces pombe*
TAF : Facteurs associés à TBP (« TBP Associated Factors »)
TBP : Protéine de fixation à la boîte TATA (« TATA Binding Protein »)
TCR: Réparation couplée la transcription (« Transcription coupled repair »)
TTD: Trichotiodystrophie
UAS : Elément activateur amont (« Upstream activating Element »)
URS : Séquence répressive amont (« upsteam repressing sequence »)
XP: *Xeroderma pigmentosum*

AVANT-PROPOS

Le Médiateur de la transcription par l'ARN polymérase II a été découvert chez *Saccharomyces cerevisiae* au cours des années 90. C'est un complexe conservé chez les eucaryotes qui joue un rôle clef dans la régulation de l'expression génétique. Chez l'Homme, il est impliqué dans des maladies très invalidantes comme le syndrome d'Opitz-Kaveggia et des cancers. En raison de son rôle de régulateur, il pourrait servir de cible thérapeutique pour de nombreuses maladies liées à des défauts d'expression. Cependant, son mécanisme d'action reste mal connu.

Au cours de ma thèse, nous nous sommes donc intéressés aux liens entre le Médiateur et d'autres facteurs protéiques clef dans le mécanisme de la transcription par l'ARN polymérase II : les facteurs généraux. Un crible double-hybride réalisé au laboratoire à permis d'identifier des interactions physiques entre des sous-unités du Médiateur et de nombreuses protéines impliquées dans l'initiation de la transcription. Ma première année de thèse a été dévouée à la validation de ces interactions par d'autres approches biochimiques comme la coimmunoprécipitation de protéine ou le « GST pull-down » de protéines exprimées et purifiées à partir d'extrait d'*Escherichia coli* ou du système baculovirus. Ceci nous a permis d'identifier une interaction entre le Médiateur et le complexe TFIIH qui joue un rôle dans l'initiation de la transcription, la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. De plus, chez l'Homme, des mutations dans des sous-unités de TFIIH peuvent entrainer des maladies comme *xeroderma pigmentosum*, le syndrome de Cockayne et la trichothiodystrophie. Nous avons donc étudié cette interaction afin d'analyser le rôle du Médiateur dans le recrutement de TFIIH et la mise en place du complexe de préinitiation.

En parallèle de cette étude, nous avons découvert une interaction génétique entre le Médiateur et le facteur d'élongation TFIIS. De façon surprenante, l'analyse de cette interaction, nous a permis de découvrir un nouveau rôle de TFIIS conjoint au Médiateur au cours de l'étape d'initiation de la transcription.

La première partie de ce manuscrit présentera les connaissances actuelles sur la transcription par l'ARN polymérase II, sur les facteurs TFIIH et TFIIS, et sur le Médiateur. Ensuite seront présentés et discutés les résultats acquis au cours de ma thèse. Enfin, les études réalisées seront mis en perspectives, de manière à imaginer les futures analyses dans le cadre de la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par le Médiateur.

INTRODUCTION

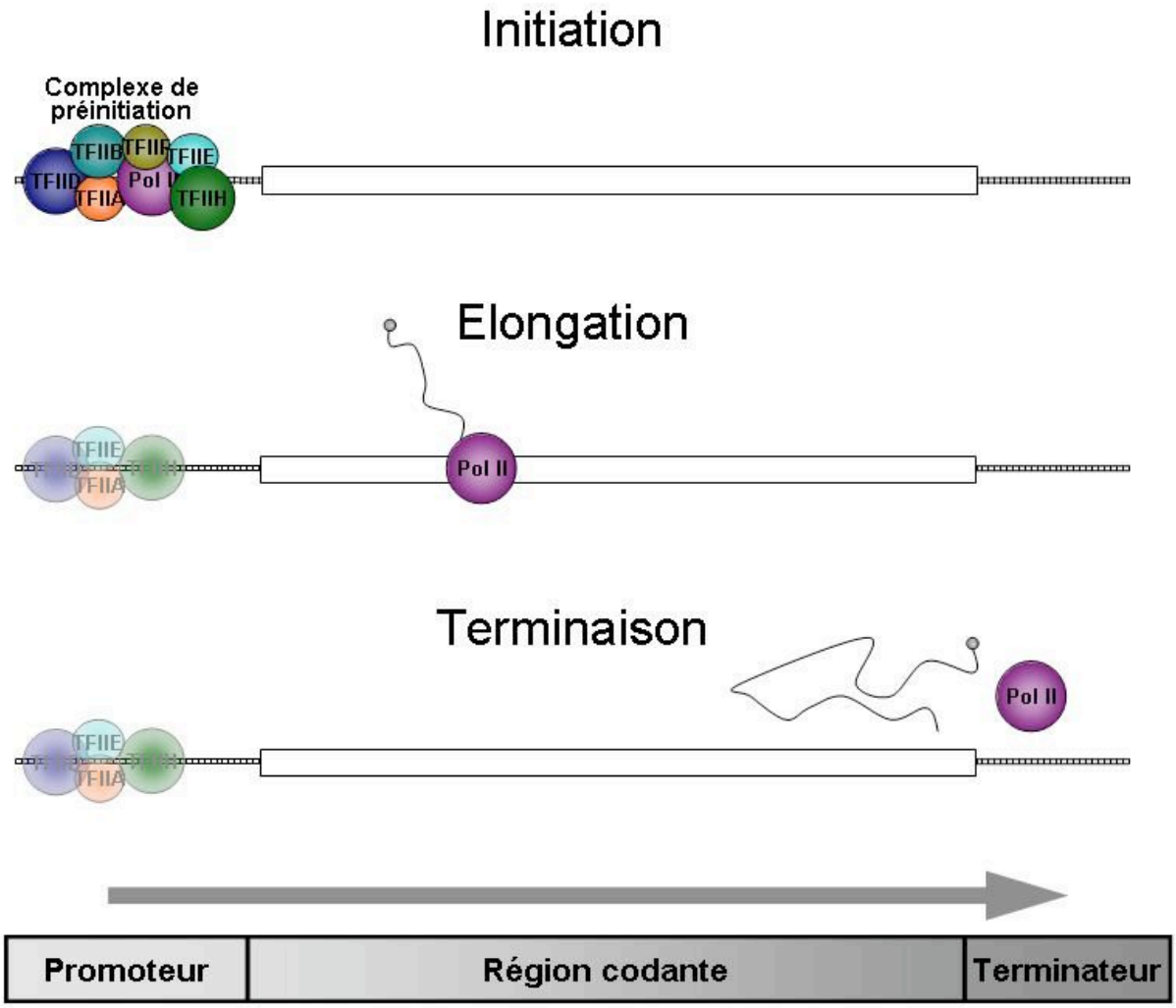


Figure 1: Cycle de transcription
Schéma simplifié représentant le cycle de transcription par l'ARN polymérase II. L'initiation est l'étape correspondant à la mise en place du complexe de préinitiation et la polymérisation des premiers nucléotides. Ensuite, au cours de l'élongation Pol II synthétise la chaine d'ARN. Le complexe de préinitiation se dissocie partiellement ou totalement du promoteur. La terminaison est l'étape où l'ARN polymérase se détache et où l'ARN est libéré. Une flèche grise indique le sens de transcription et un cadre gris défini les éléments du gène transcrit.

Chapitre I : La transcription des gènes de classe II

En fonction de son environnement, en fonction de son devenir ou en réponse à des signaux extracellulaires, une cellule eucaryote doit être capable de modifier son profil d'expression génétique. Le message de régulation est conduit dans la cellule par des voies de transduction de signal jusqu'au noyau. La molécule d'ADN sert alors de matrice au cours de l'étape de transcription pour la synthèse de l'ARN. La nouvelle molécule ainsi formée est maturée et transportée dans le cytoplasme. Elle sert à son tour de matrice pour la traduction et permet la synthèse des protéines (Orphanides and Reinberg, 2002). La transcription est le premier le point de contrôle de l'expression génétique. Chez les eucaryotes, il existe quatre ARN polymérases nucléaires. Les ARN polymérases I et III servent à la synthèse des ARN impliqués dans l'épissage des messagers et dans la traduction comme les ARN de transferts et les ARN ribosomaux. L'ARN polymérase IV a récemment été découverte chez les plantes et semble être cantonnée à ce groupe. Elle permet la transcription des petits ARN impliqués dans les phénomènes de « silencing ». Enfin l'ARN polymérase II sert à la transcription de petits ARN non codants et à la transcription des ARN messagers nécessaires à la synthèse des protéines. La transcription peut être séparée en trois grandes étapes (Figure 1). La première est l'initiation où le complexe de préinitiation va se former, les deux brins d'ADN seront ouverts et où la première liaison phosphodiester entre deux nucléotides sera formée. La deuxième est l'élongation pendant laquelle Pol II synthétise la chaine d'ARN. La dernière étape est la terminaison au cours de laquelle la machinerie de transcription se détache et où l'ARN est libéré.

I.1 Séquences régulatrices de l'ADN

I.1.1 Structure du promoteur

La séquence d'ADN qui sert à la mise en place du complexe de préinitiation (PIC) en amont du gène à transcrire est appelée promoteur. Le promoteur eucaryote est composé d'une combinaison de plusieurs éléments de base (Hampsey, 1998): la boîte TATA, l'initiateur (INR: initiator sequence), l'élément de reconnaissance par TFIIB (BRE) et l'élément promoteur aval DPE (Downstream Promotor Element) situé à environ 30 paires de base en

aval du site de démarrage de la transcription (Burke and Kadonaga, 1996) (Figure 2). Cependant, cette structure n'est pas universelle, les promoteurs de levure, par exemple, sont dépourvus d'INR, de BRE et de DPE et tous les promoteurs des autres organismes étudiés ne présentent pas tous ces éléments.

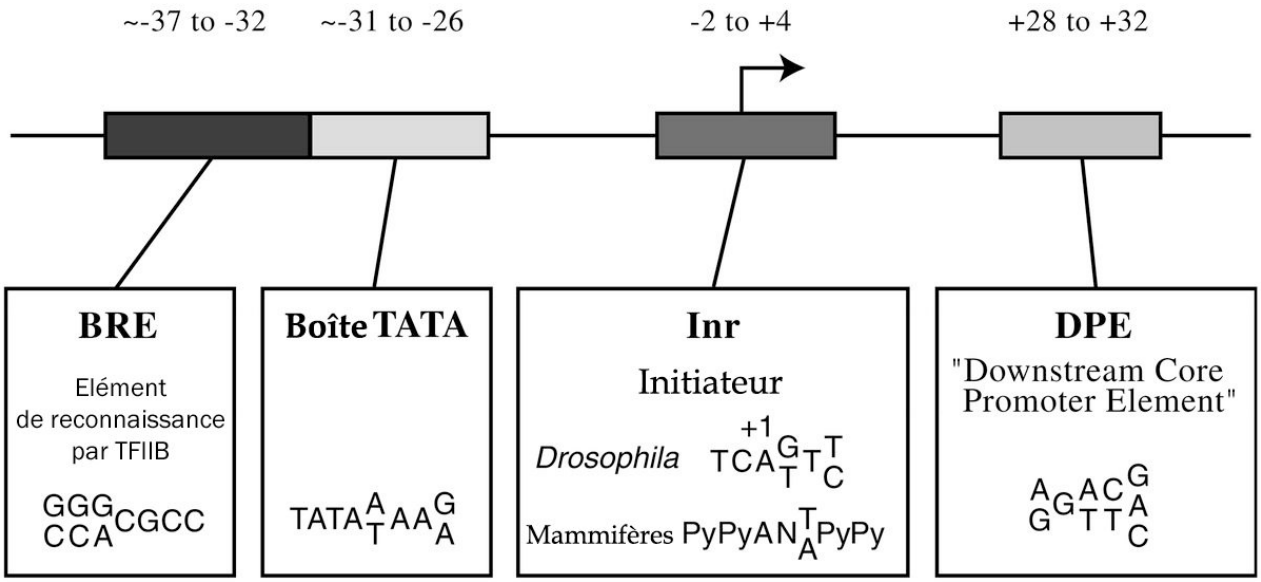


Figure 2: Position des différents éléments d'un promoteur eucaryote.
Ce schéma représente les éléments du promoteur de base qui peuvent contribuer à la transcription. Chacun de ces éléments sont retrouvés dans des promoteurs d'un sous-ensemble de gènes. Plus précisément, les promoteurs peuvent contenir : certains, quelques uns, tous ou aucuns de ces éléments. La boîte TATA peut être fixée par les acteurs de l'initiation en absence de BRE, d'INR ou de DPE. Au contraire, le DPE requiert la présence de l'INR. Le BRE est localisé à côté de la boite TATA dans un sous-ensemble de gènes. La séquence consensus du DPE a été déterminée chez la drosophile. Les séquences consensus de l'INR ont été déterminées chez la drosophile et les mammifères. D'après Smale and Kadonaga, (2003)

La boîte TATA est le premier élément à avoir été identifié, c'est la séquence où se fixe TBP (Tata Binding Protein) (Klein and Struhl, 1994). Elle est très bien conservée au cours de l'évolution (Wobbe and Struhl, 1990) et est située entre 25 et 30 paires de base en amont du site de démarrage de la transcription chez la plupart des eucaryotes (Struhl, 1995), excepté chez *Sacchromyces cerevisiae* où la distance est plus grande, variant de 40 à 120 nucléotides. La séquence consensus définie grâce à des approches de génétique chez la levure est TATAAA (Singer et al., 1990; Wobbe and Struhl, 1990). Cependant, de nombreuses autres séquences dérivant de celle-ci possèdent les mêmes propriétés. L'association entre TBP et la boîte TATA peut être limitante dans l'étape d'initiation de la transcription (Klein and Struhl,

1994). Néanmoins, TBP peut se lier à certains promoteurs qui en sont dépourvus chez *Saccharomyces cerevisiae* (Basehoar et al., 2004; Kuras and Struhl, 1999).

L'INR est un élément proche du site d'initiation de la transcription. Il agit en synergie avec boîte TATA et est impliqué dans la transcription des gènes qui en sont dépourvus (Emami et al., 1997). C'est le site de fixation de nombreuses protéines parmi lesquelles l'ARN polymérase II (Aso et al., 1994; Carcamo et al., 1991) et Taf2 du complexe TFIID (Verrijzer et al., 1995).

Le BRE est reconnu par le complexe TFIIB grâce à une séquence consensus G/C G/C G/A CGCC (Lagrange et al., 1998). Il se situe en amont de certaines boîtes TATA et peut avoir un effet négatif ou positif sur la transcription.

Enfin, le DPE est trouvé le plus souvent en aval du site d'initiation dans les promoteurs dépourvus de boîte TATA. Il est fixé par le complexe TFIID par l'intermédiaire de la sous-unité Taf6 chez la Drosophile (Burke and Kadonaga, 1996).

I.1.2 Les éléments de régulation

Des séquences d'ADN liées par des protéines impliquées dans le contrôle de l'expression génétique jouent un rôle important dans la régulation de la transcription. Les enhancers ou les UAS chez la levure (Upstream Activating Sequence) jouent un rôle activateur. Les enhancers peuvent influencer l'expression d'un gène qui se situe en amont ou en aval de leurs positions sur le génome. Alors que chez la levure, les UAS vont plus souvent être situés en amont du promoteur pour influencer le niveau transcriptionnel (Struhl, 1984). D'autre part il existe des séquences répressives, les URS (Upstream Repressing Sequence) qui peuvent avoir à distance un effet négatif sur la transcription (Johnson, 1995).

I.2 Les facteurs généraux de la transcription par l'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II (Pol II) est l'enzyme qui catalyse la réaction de transcription des gènes de classe II. Cependant, elle est incapable d'initier seule la transcription spécifique *in vitro*. Ceci est à l'origine de la découverte de complexes protéiques permettant une initiation spécifique par Pol II, appelés facteurs généraux de la transcription (GTF) (Reinberg et al., 1998). Ces facteurs sont très conservés dans le domaine eucaryote. Ils sont au nombre de six : TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIE et TFIIH.

I.2.1 TFIID

TFIID est le premier facteur à intervenir dans la mise en place du PIC, il est composé de la protéine TBP et de 14 facteurs associés appelés TAFs (TBP Associated Factors) (Sanders and Weil, 2000). TBP est la protéine qui lie la boîte TATA du promoteur. Elle est très conservée, la protéine humaine est interchangeable avec celle de levure (Buratowski et al., 1988). Elle se fixe dans le petit sillon de l'ADN induisant une forte courbure et un déroulement partiel de la double hélice, relaxation essentielle à l'initiation de la transcription (Nikolov et al., 1996). *In vitro*, la protéine TBP suffit à la transcription d'un gène contenant une boîte TATA. Les protéines TAFs deviennent nécessaires pour les promoteurs qui en sont dépourvu. Elles interagissent avec les éléments INR et DPE et permettent une transcription basale. Néanmoins, la composition de TFIID en TAFs varie en fonction du type de promoteur sur lequel le facteur se fixe (Jacq et al., 1994; Shen et al., 2003). L'analyse de la structure de certains TAFs a montré qu'ils possèdent une structure similaire à celle des histones (Gangloff et al., 2000; Hoffmann et al., 1996; Kokubo et al., 1994). Ce fait suggère qu'ils puissent s'associer à l'ADN d'une manière similaire au nucléosome.

I.2.2 TFIIA

TFIIA est constitué de 2 ou 3 sous-unités en fonction des organismes eucaryotes considérés. Il joue un rôle de stabilisation au sein du PIC. En effet, il lie le complexe TBP/ADN, ce qui augmente l'affinité de TBP pour la boîte TATA (Imbalzano et al., 1994). Cependant *in vitro*, l'importance de ce facteur dépend fortement du système utilisé. En effet, il n'est pas nécessaire dans un système qui utilise TBP recombinante, par contre il le devient lorsque TFIID est utilisé. TFIIA semble surtout jouer un rôle important dans les mécanismes de régulation de la transcription en réponse à des activateurs spécifiques ou à des coactivateurs comme SAGA et le Médiateur (DeJong et al., 1995; Johnson and Carey, 2003; Warfield et al., 2004).

I.2.3 TFIIB

TFIIB n'est composé que d'une seule protéine. Néanmoins, on peut distinguer différents domaines structuraux en son sein. La région N-terminale qui se compose d'un doigt de zinc et d'un « zinc ribbon » est séparée par un « linker » du domaine C-terminal. Ce domaine est composé de deux répétitions de 5 hélices α qui peuvent interagir avec TBP (Chen

and Hahn, 2004; Tsai and Sigler, 2000). TFIIB se lie au promoteur en interagissant à la fois avec TBP et avec la molécule d'ADN, ce qui le positionne en aval de la boîte TATA. Ceci pourrait être à l'origine de l'orientation de la transcription (Tsai and Sigler, 2000). D'autre part, Des études de mutants chez la levure ont révélé que TFIIB joue un rôle important dans la sélection du site d'initiation (Chen and Hampsey, 2004; Pinto et al., 1994). Enfin, ce facteur permet le recrutement de Pol II en interagissant directement avec TFIIF (Ha et al., 1993). Il servirait de lien entre Pol II et les facteurs généraux.

I.2.4 TFIIF

TFIIF dont la composition varie d'un hétérotétramère de 2 sous-unités chez les mammifères à 3 sous-unités chez la levure, possède de nombreuses caractéristiques similaires à celles du facteur sigma bactérien. Comme lui, il lie l'ARN polymérase et empêche les interactions non spécifiques avec l'ADN (Conaway and Conaway, 1993). Le facteur TFIIF humain est capable de lier l'ARN polymérase d'*Escherichia coli*, ce qui indique une très bonne conservation fonctionnelle entre TFIIF et son homologue bactérien (McCracken and Greenblatt, 1991). En outre, les principales fonctions de ce facteur au cours de l'initiation de la transcription semblent être le recrutement de Pol II et la stabilisation du PIC grâce à des interactions avec d'autres facteurs généraux comme TBP, TFIID, TFIIB et TFIIE (Coulombe et al., 1994; Kim et al., 1997; Robert et al., 1996). TFIIF permet d'induire un changement de conformation de l'ADN qui entraîne un repositionnement de Pol II et contrôle ainsi l'organisation topologique du complexe de préinitiation (PIC) (Forget et al., 1997). La définition d'un modèle de microscopie électronique qui l'associe à Pol II a permis d'expliquer comment TFIIF pouvait agir sur l'ARN polymérase. Il se fixe sur Pol II en englobant toute la surface supérieure de l'enzyme ce qui permet à TFIIF d'interagir avec d'autres facteurs ou d'influencer des changements de conformation de Pol II (Chung et al., 2003). Enfin, TFIIF semble être également impliqué dans l'étape d'élongation. Il éviterait les arrêts prématurés de Pol II (Lei et al., 1999).

I.2.5 TFIIE

TFIIE vient se fixer au promoteur en interagissant avec TFIIF et avec la sous-unité Rpb9 de Pol II (Flores et al., 1989; Van Mullem et al., 2002). Il peut être la cible de certains activateurs spécifiques comme Kruppel chez la drosophile et les protéines à homéodomaine

chez l'Homme (Sauer et al., 1995; Zhu and Kuziora, 1996). Le rôle principal de TFIIE semble surtout de recruter le complexe TFIIH. Il permettrait son association au promoteur en le fixant directement et stimulerait les activités kinase et hélicase de TFIIH qui sont nécessaires à la transcription (Holstege et al., 1997; Ohkuma et al., 1995; Sakurai and Fukasawa, 1999).

I.2.6 TFIIH

TFIIH sera décrit plus en détail dans le deuxième chapitre de cette introduction. Brièvement, TFIIH joue un rôle essentiel dans l'initiation de la transcription en ouvrant la molécule d'ADN et en phosphorylant le domaine carboxy-terminal de la plus grande sous-unité de Pol II (CTD). Ces activités enzymatiques sont essentielles à la transition entre l'étape d'initiation et d'élongation.

I.3 L'ARN Polymérase II

I.3.1 Organisation de l'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II est composée de 12 sous-unités codées par les gènes *RPB1* à *RPB12* chez la levure (Table 1). La structure et la composition de Pol II sont extrêmement conservées. En effet, six des sous-unités de levure peuvent être remplacées par leurs homologues humaines (McKune et al., 1995; Shpakovski et al., 1995). Les deux plus grandes sous-unités Rpb1 et Rpb2 sont les mieux conservées, elles sont respectivement homologues aux sous-unités β' et β de l'ARN polymérase bactérienne. En se basant sur des similarités partielles de séquence, sur la stœchiométrie et sur la taille des protéines, Rpb3 et Rpb11 apparaissent comme les homologues de la sous-unité α bactérienne. Les similarités de séquences et de structure montrent également que Rpb6 est l'homologue de la sous-unité ω (Minakhin et al., 2001).

Cinq sous-unités sont partagées par les trois ARN polymérases, il s'agit de Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 et Rpb12. Enfin, les sous-unités Rpb1, Rpb2, Rpb3, Rpb4, Rpb7, Rpb9 et Rpb11 ont des paralogues chez les ARN polymérase I et III.

De nombreuses études de génétique et de biochimie ont permis de mieux définir les fonctions des différentes sous-unités de Pol II. Certains remplacements d'aminoacide dans Rpb1 et Rpb2 affectent l'initiation de la transcription (Berroteran et al., 1994; Hekmatpanah and Young, 1991) et/ou entrainent des défauts de croissance des souches de levure en

présence de drogues comme le 6-azauracil (6AU) ou le Mycophénolate (MPA) qui affectent l'étape d'élongation (Archambault et al., 1992; Powell and Reines, 1996). Ceci indique que ces deux sous-unités sont impliquées dans les processus d'initiation et d'élongation de la transcription. Des études de biochimie ont montré que Rpb4 et Rpb7 peuvent se dissocier de Pol II et sont impliquées dans le processus d'initiation (Edwards et al., 1991; Orlicky et al., 2001). Enfin, des études similaires ont permis d'identifié le rôle de Rpb3 dans l'assemblage de Pol II (Kolodziej and Young, 1991), ceux de Rpb9 et Rpb2 dans le choix du site d'initiation de la transcription (Chen and Hampsey, 2004; Sun et al., 1996), et de Rpb5 dans l'activation de la transcription (Miyao and Woychik, 1998).

Table 1: Composition en sous-unités de l'ARN Polymérase II

Sous-unités	Propriétés
Rpb1	Orthologue de β' Impliquée dans la sélection du site d'initiation Impliquée dans l'élongation Porte le CTD
Rpb2	Orthologue de β Impliquée dans la sélection du site d'initiation Impliquée dans l'élongation
Rpb3	Orthologue, avec Rpb11, du dimère α_2 de l'ARN polymérase bactérienne
Rpb4	Forme un sous-complexe avec Rpb7 Impliquée dans l'initiation
Rpb5	Sous-unité commune des Pol I et III Impliquée dans l'activation de la transcription
Rpb6	Sous-unité commune des Pol I et III
Rpb7	Forme un sous-complexe avec Rpb4 Impliquée dans l'initiation
Rpb8	Sous-unité commune des Pol I et III
Rpb9	Impliquée dans la sélection du site d'initiation
Rpb10	Sous-unité commune des Pol I et III
Rpb11	Orthologue, avec Rpb3, du dimère α_2 de l'ARN polymérase procaryote
Rpb12	Sous-unité commune des Pol I et III

I.3.3 Le domaine Carboxy-terminal de Rpb1 (CTD)

Une des particularités de Pol II par rapport aux autres ARN polymérases, est la présence du domaine carboxy terminal de Rpb1 (CTD) qui se caractérise par la répétition de l'heptapeptide Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Ce motif est très conservé au cours de l'évolution. Cependant le nombre de répétition varie en fonction des organismes de 26 chez *S. cerevisiae* à 52 chez l'Homme (Hampsey, 1998). Le domaine CTD propre à Pol II n'est pas

essentiel à son activité *in vitro* (Akoulitchev et al., 1995). Par contre, il l'est *in vivo* (West and Corden, 1995). La nature et la variété des fonctions supportées par le CTD ne sont pas entièrement élucidées. Néanmoins, le CTD existe sous deux formes: une forme hyper-phosphorylée et une forme non-phosphorylée, ce qui entraîne des propriétés différentes de Pol II (Hampsey, 1998). Les phosphorylations touchent principalement les Sérines 2 et 5 de l'heptapeptide et engendrent des changements d'état de Pol II au cours du cycle de transcription. Des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), ont permis de déterminer le profil de phosphorylation de Pol II sur les gènes en cours de transcription (figure 3). Pol II non-phosphorylée lie le promoteur (O'Brien et al., 1994). Pol II est ensuite phosphorylée au niveau de la sérine 5. Cette modification catalysée par TFIIH est concomitante avec la transition entre l'initiation et l'élongation. Elle semble être importante pour contrôler cette étape (Hengartner et al., 1998b). La sérine 2 est ensuite modifiée par CTDK-I. Cette nouvelle phosphorylation est liée à l'ajout de la coiffe sur le messager et pourrait être importante pour sa régulation (Cho et al., 1997; Yue et al., 1997). Enfin, la sérine 5 est déphosphorylée par des phosphatases (Dahmus, 1996), la sérine 2 est alors la seule à rester modifiée (Dahmus, 1994; O'Brien et al., 1994). Les différents changements d'état CTD s'avèrent critiques dans le coiffage et la maturation des ARN messagers, l'élongation, et la terminaison (Guiguen et al., 2007; Phatnani and Greenleaf, 2006).

I.3.2 Structure de l'ARN Polymérase II

La résolution de la structure de Pol II par diffraction des rayons X a été une grande avancée pour les recherches sur la transcription (Cramer et al., 2000; Cramer et al., 2001) (Figure 4). Les deux plus grandes sous-unités Rpb1 et Rpb2 forment le cœur du complexe. Elles représentent la masse centrale et forment un sillon dans lequel peut s'introduire la matrice d'ADN et au fond duquel, délimité par le mur est situé le site actif. Un des côtés du sillon est formé par une pince mobile qui se ferme lors de l'initiation de la transcription et empêche l'ADN de se dissocier lors de l'élongation (Gnatt et al., 2001). Sur la vue du dessus de Pol II (Figure 4B), on distingue un canal situé entre la pince et le mur par lequel l'ARN néosynthétisé s'échappe de l'enzyme. Le module formé par Rpb4 et Rpb7 est localisé à proximité du canal de sortie de l'ARN (Armache et al., 2003; Armache et al., 2005; Bushnell and Kornberg, 2003). Ce module est impliqué dans l'initiation de la transcription. Enfin, la localisation exacte du CTD n'a pas pu être déterminée, cependant la position des derniers

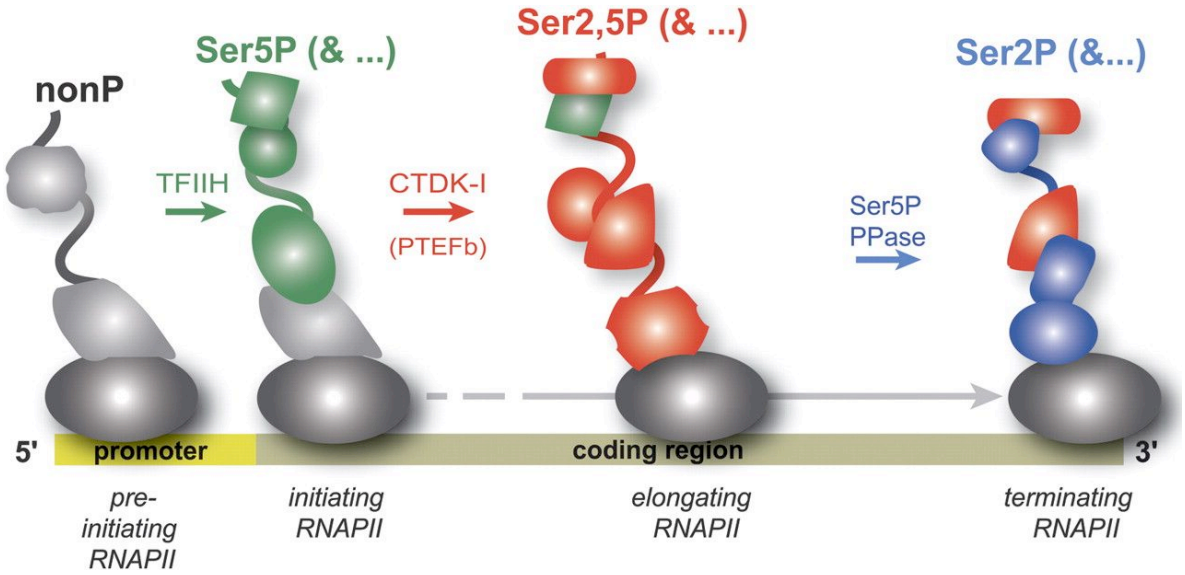


Figure 3: Profil de phosphorylation du CTD dicté par les facteurs associés à Pol II au cours de la transcription.
En bas sont indiqués les éléments des gènes. La masse grise représente Pol II et sont représentés en vert les phosphorylations sur la sérine 5, en rouge sur les deux sérines et en bleu sur la sérine 2. D'après Phatnani and Greenleaf, (2006)

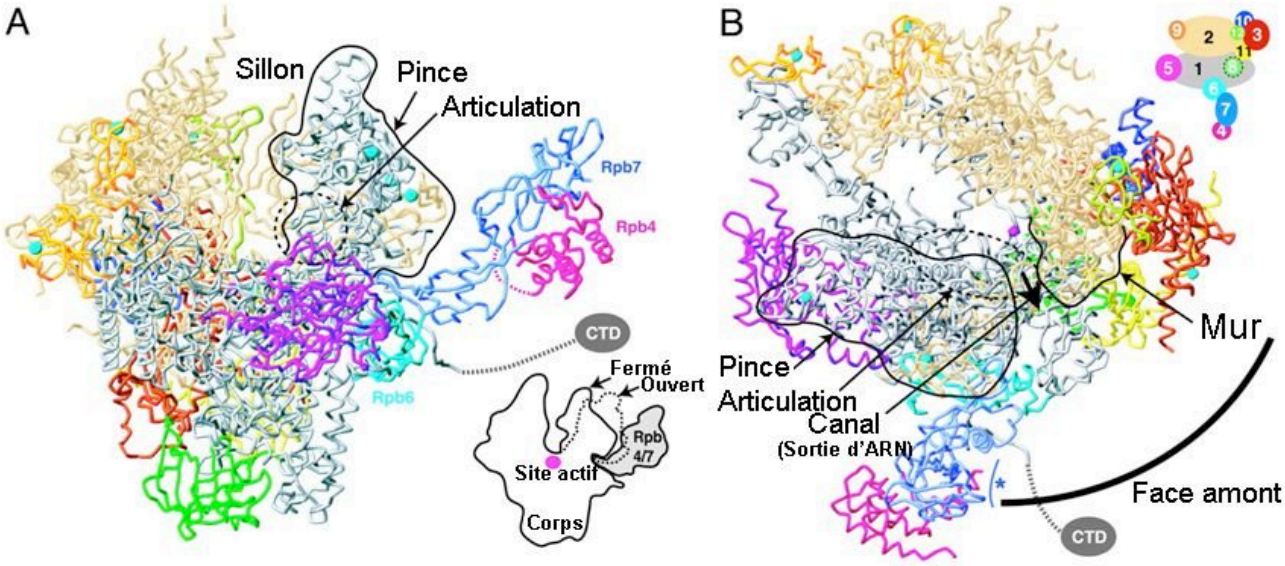


Figure 4: Structure de l'ARN polymérase II obtenue par diffraction des rayons X.
A) Vue de face de l'ARN polymérase II. Les sous-unités de Pol II sont indiquées par des couleurs différentes (se référer au schéma situé en haut à droite : les sous-unités sont numérotées d'après la nomenclature usuelle de Rpb1 à Rpb12).
B) Vue du dessus de l'ARN polymérase II. Les sous-unités de Pol II sont indiqués par des couleurs différentes.
Entre les deux panneaux est présenté un modèle de changement de conformation de l'ARN polymérase II. D'après Armache et al., (2003).

acides amminés avant le CTD permettent de le positionner approximativement dans la structure au niveau de la face amont. Sa localisation lui permet d'interagir avec de nombreux partenaires.

I.4 La transcription par l'ARN polymérase II

I.4.1 Initiation de la transcription

I.4.1.1 Formation du PIC

L'initiation est la première étape de la transcription. Des études de biochimie ont permis de définir l'ordre d'arrivée des facteurs généraux de la transcription (GTFs : voir I.2). Ils s'assemblent de façon séquentielle pour former le complexe de préinitiation (PIC) (Figure 5). Le promoteur est reconnu par le complexe TFIID. TFIIA et TFIIB viennent ensuite se fixer pour former le complexe DAB. Cette structure est ensuite fixée par TFIIF associé à Pol II (Buratowski et al., 1989; Svejstrup, 2004). Enfin, TFIIE vient s'associer sur la structure TFIID/A/B/F/Pol II et permet le recrutement de TFIIH en interagissant avec de ce dernier (Bushnell et al., 1996). Cependant des études de recrutement réalisés chez *S. cerevisiae in vivo*, montrent que la mise en place du PIC est dynamique et pourrait être influencé par des facteurs protéiques appelés coactivateurs (Bhaumik et al., 2004; Bryant and Ptashne, 2003; Cosma et al., 1999) (voir I.6.3).

I.4.1.2 Transition entre l'initiation et l'élongation

Lors de la transition entre l'étape d'initiation et d'élongation de la transcription, les deux brins de la molécule d'ADN se séparent. Ensuite, Pol II se dissocie des facteurs généraux. L'échappée du promoteur débute par l'ouverture de l'ADN au niveau du site d'initiation (Holstege et al., 1997). La séparation des deux brins d'ADN est catalysé par la sous-unité XPB/Rad25 (chez l'Homme/chez la levure) de TFIIH de façon dépendante de l'ATP (Guzder et al., 1994; Holstege et al., 1996; Yan and Gralla, 1997). La polymérisation débute ensuite mais est souvent avortée, entraînant la production de petits ARN. Lorsque la chaine d'ARN atteint la taille de 10 nucléotides, la bulle de transcription se déplace. On considère alors que Pol II s'est échappée du promoteur (Holstege et al., 1997). La libération de Pol II du PIC est également favorisée par la phosphorylation du CTD sur la sérine 5 par la

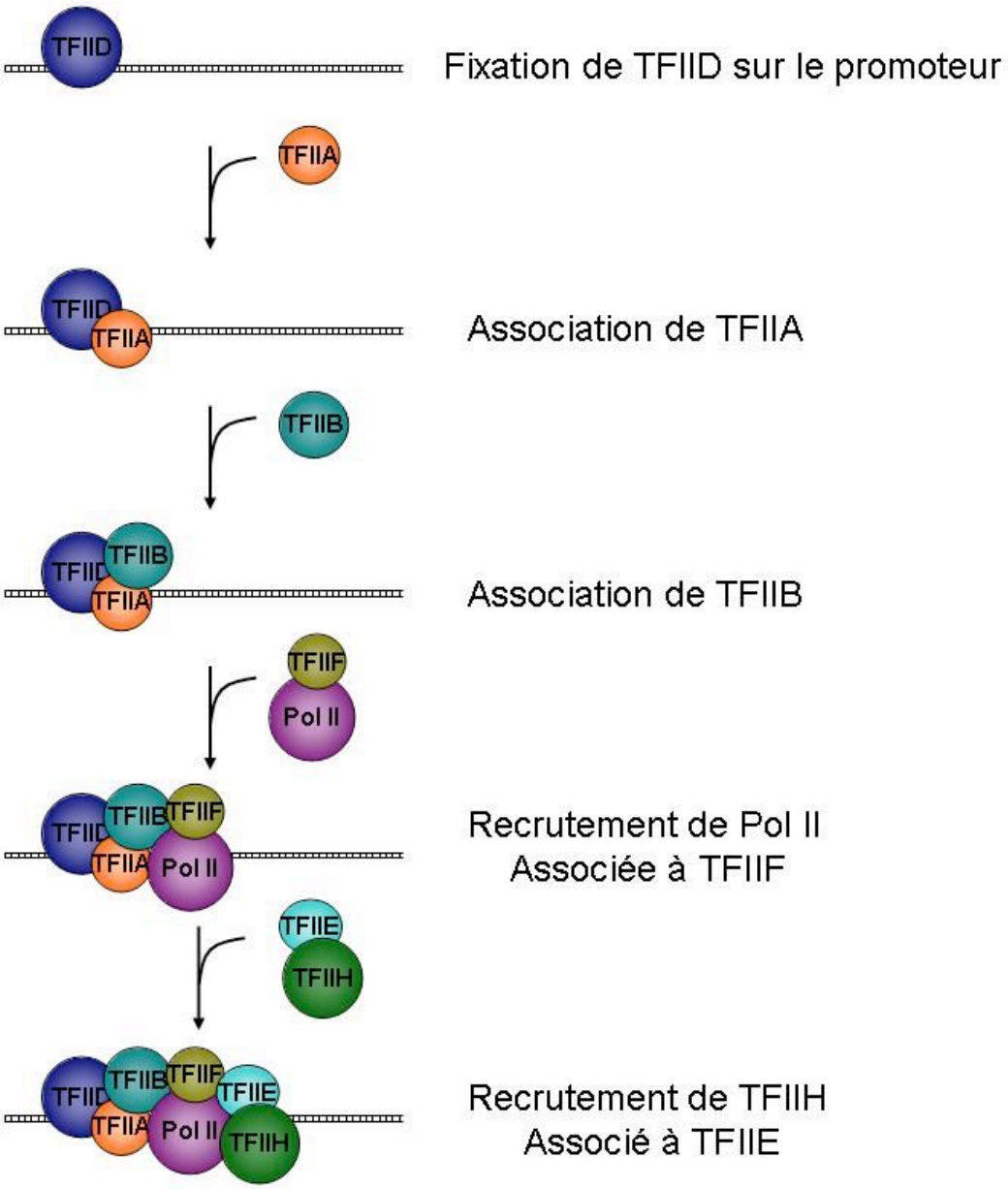


Figure 5: Schéma de la mise en place du complexe de préinitiation *in vitro*.
TFIID lie le promoteur, il est ensuite fixé par TFIIA pour former le complexe DA. TFIIB vient s'associer et forme le complexe DAB. L'ARN polymérase II associée à TFIIF est ensuite recrutée. Enfin, viennent les facteurs TFIIE et TFIIH.

sous-unité CdK7/Kin28 de TFIIH (Feaver et al., 1994; Hengartner et al., 1998a), ce qui a pour effet de désolidariser TBP et TFIIE de Pol II (Maxon et al., 1994; Usheva et al., 1992).

I.4.2 Elongation de la transcription

Rôle du CTD

Au cours de l'élongation, la nature des modifications du CTD varie. La transition entre l'initiation et l'élongation est concomitante avec la phosphorylation de la sérine 5 du CTD par TFIIH. Cette modification est nécessaire aux interactions stables de Pol II avec les facteurs de maturation de l'ARN, avec l'enzyme de « coiffage » (Cho et al., 1997; Rodriguez et al., 2000; Yue et al., 1997), et avec les protéines impliquées dans l'élongation et la modification de la chromatine comme Set1, Set2 et « l'Elongator » (Gerber and Shilatifard, 2003; Hampsey and Reinberg, 2003). Pendant l'élongation, Pol II est sujette à une pause précoce induite par Spt4/Spt5 et NELF (Wada et al., 1998; Yamaguchi et al., 1999). Cet arrêt est associé à l'arrivée du facteur p-TEFb (Cdk9/cyclinT) qui phosphoryle la Sérine 2 du CTD (Kim and Sharp, 2001). L'ensemble de ces données montre l'importance du CTD et des enzymes qui modifient son état de phosphorylation. Les protéines CTDK1 et p-TEFb phosphorylent les sérines 2 et 5 (Jones et al., 2004; Krishnamurthy et al., 2004; Lee and Greenleaf, 1989; Marshall and Price, 1995), et la phosphatase Fcp1 déphosphoryle les deux sérines (Cho et al., 2001; Hausmann and Shuman, 2002).

Progression de la bulle de transcription

Au cours de l'élongation, la bulle de transcription progresse au fur et à mesure, elle correspond à l'ouverture de la molécule d'ADN sur 12 à 15 paires de bases. Pol II synthétise alors 1500 à 2000 ribonucléotides par minute. Des hybrides ARN/ADN pourraient se former au passage de l'enzyme à partir de l'ouverture de la chaine d'ADN. Ceci pourrait gêner la progression de Pol II au cours des cycles suivants. *In vitro*, le complexe THO/TREX dont les sous-unités sont impliquées dans l'export des ARN et l'élongation de la transcription, permet d'éviter les hybrides ARN/ADN (Chavez et al., 2000; Strasser et al., 2002). Cependant, l'enzyme marque régulièrement des pauses sur des sites privilégiés *in vitro* (Uptain et al., 1997). La vitesse de progression de Pol II peut être augmentée en réduisant le nombre des arrêts ou en limitant leur durée. Les facteurs d'élongation comme TFIIF, les elonguines ou les

protéines de la famille ELL (« Eleven-nineteen Lysin-rich Leukomia ») influencent Pol II en réduisant ces pauses (Lei et al., 1999; Shilatifard et al., 1996).

I.4.3 Terminaison de la transcription

La terminaison de la transcription est un processus compliqué et important pour le recyclage de Pol II, mais également pour éviter une interférence dans la transcription des gènes situés en aval du transcrit. Un défaut de terminaison peut entrainer une baisse significative du niveau d'expression des gènes situés après le gène transcrit (Eggermont and Proudfoot, 1993; Greger and Proudfoot, 1998).

La terminaison dépend du signal de polyadénylation (Birse et al., 1998; Osheim et al., 1999). Au cours de cette étape, Pol II pourrait subir des changements de conformation qui réduirait sa processivité. Fcp1 pourrait déphosphoryler le CTD en induisant un arrêt de l'enzyme qui permettrait la coupure, le relargage de l'ARN et le recyclage de Pol II (Chambers et al., 1995; Kamada et al., 2003; Proudfoot et al., 2002).

I.5 La transcription dans un contexte chromatinien

Le génome des eucaryotes est organisé sous forme de complexes nucléoprotéiques, pour former une structure appelée chromatine. Cette organisation, non seulement permet de compacter l'ADN, mais joue aussi un rôle critique dans la régulation des interactions des protéines avec l'ADN, en particulier celles impliquées dans la transcription et sa régulation. Les principales protéines de la chromatine sont les histones qui sont composées de deux hétérodimères H2A-H2B et H3-H4, autour desquels s'enroule l'ADN sur 146 bases pour former un nucléosome. L'enroulement de l'ADN sur le nucléosome diminue son accessibilité par la machinerie de transcription. Au sein du noyau, il existe des régions propices à la transcription où la chromatine est sous forme relâchée pour former l'euchromatine et des régions silencieuses où la structure est plus dense, il s'agit de l'hétérochromatine. La chromatine constitue un niveau supplémentaire de régulation de la transcription.

I.5.1 Variants et modifications des histones associées à la transcription

Les histones sont sujets à de nombreuses modifications post-traductionnelles qui ont pour effet de changer leurs propriétés physico-chimiques (Kouzarides, 2007). Il existe

aujourd'hui plus de 60 résidus d'histones identifiés comme cibles de modification. Seulement certaines d'entre elles ont été retrouvées associées à des gènes en cours de transcription (Table 2). Il s'agit de méthylations d'arginines, d'acétylations et méthylations de lysines, sumoylations, ubiquitinations, d'ADP-ribosylations, et enfin de phosphorylations des sérines. Certaines de ces modifications sont associées à l'activation de la transcription comme les acétylations des histones H3/H4 et les di/tri-méthylations de la lysine K4 de l'histone H3 (H3K4). D'autres modifications, au contraire, sont associées à la répression comme les méthylations des résidus H3K9 ou H3K27 que l'on retrouve principalement dans l'hétérochromatine (Li et al., 2007).

Il existe également de nombreux variants d'histone qui sont incorporés indépendamment de la réplication de l'ADN (Table 3). Ils jouent aussi un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Ils diffèrent des formes canoniques au niveau de la queue N-terminale des histones, de l'HFD (« histone fold domain ») ou de quelques aminoacides (Doyen et al., 2006a; Doyen et al., 2006b; Henikoff and Ahmad, 2005). Leur incorporation à un impact sur la structure chromatinienne et affecte l'activité de protéines impliquées dans la transcription.

Table 2: Modifications des histones associées à la transcription

Modifications	Position		Enzymes				Module(s) de reconnaissance	Fonction dans la transcription
			S. cerevisiae	*S. pombe*	*Drosophila*	Mammifères		
Méthylation	H3	K4	Set1	Set1	Trx,Ash1	MLL,ALL-1 Set9/7, ALR-1/2, ALR, Set1	PHD, Chromo, WD-40	Activation
		K9	Non déterminé	Clr4	Su(var)3-9, Ash1	Suv39h, G9a, Eu-HMTase I, ESET,SETBD1	Chromo (HP1)	Répression, activation
		K27				E(Z)	Ezh2, G9a	Répression
		K36	Set2			HYPB, Smyd2, NSD1	Chromo(Eaf3), JMJD	Recruter Rpd3S pour réprimer l'initiation interne
		K79	Dot1			Dot1L	Tudor	
	H4	K20		Set9	PR-Set7, Ash1	PR-Set7, SET8	Tudor	
Méthylation Arg	H3	R2				CARM1		
		R17				CARM1		
		R26				CARM1		
	H4	R3				PRMT1	(p300)	
Phosphorylation	H3	S10	Snf1				(Gcn5)	
Ubiquitination	H2B	K120/123	Rad6, Bre1	Rad6		UbcH6, RNF20/40	(COMPASS)	
	H2A	K119				hPRC1L		
Acétylation	H3	K56					(Swi/Snf)	
	H4	K16	Sas2, NuA4		dMOF	hMOF	Bromodomaine	
	Htz1	K14	NuA4, SAGA					

D'après Li et al., (2007)

Table 3: Variants d'histone impliqués dans la régulation de la transcription

Histone	Variant	Role dans la transcription	Localisation	Caractéristiques structurales	Fonctions
H3	H3.3	Activation de la transcription	Région transcrite	Diffère de 4 acide-aminés de la forme canonique	Cible de « turnover » pour l'activation de la transcription
H2A	macroH2A	Inactivation du chromosome X	Chromosome X inactif	Les principales fonctions sont portées par la région C-terminal non-histone.	Répression de l'initiation mais pas de l'élongation. Il inhibe les activités de ACF et Swi/Snf et la fixation du facteur de transcription NFkB
	H2AZ	Activation/ répression de la transcription	Promoteurs de l'hétérochromatine	Diffère de H2A au niveau de la boucle 1 et défavorise la formation de nucléosome hybride. L'hélice C-terminale est essentielle pour la reconnaissance.	Facilite la fixation de TBP, prévient les modifications associées à l'élongation et le remodelage du promoteur.
	H2ABdb	Activation de la transcription	Chromosome X actif et autosomes	Perte de la partie C-terminale enroule uniquement 118 à 130 pb d'ADN	ACF et Swi/Snf sont incapables de le déplacer mais facilite sont accessibilité. augmente l'activation médiée par Gal4-VP16- et p300-
	H2A.X	Répression de la transcription	Distribuer uniformément	Domaine C-terminale conservé SQ(E/D) qui est la cible de phosphorylation en cas de dommages à l'ADN.	

D'après Li et al., (2007)

I.5.2 Initiation de la transcription dans un contexte chromatinien

La structure chromatinienne présente chez les eucaryotes est une contrainte pour la transcription qui n'existe pas chez les bactéries. Il existe plusieurs moyens aux facteurs de transcriptions pour se fixer à l'ADN. Les premières études biochimiques réalisées sur des matrices chromatiniennes ont montré un effet coopératif des facteurs de transcription Gal4, HSF, USF, et NF-κB (Adams and Workman, 1995; Taylor et al., 1991). En effet, l'association d'un des facteurs favorise celles des autres. Mais surtout, les analyses à l'échelle du génome de levure ont révélées que les promoteurs des gènes étaient des régions où la densité des nucléosomes est moindre (Bernstein et al., 2004; Lee et al., 2004; Sekinger et al., 2005). Plus précisément, il existe des séquences de 200 pb dépourvues de nucléosome autour des promoteurs des gènes (Yuan et al., 2005). L'acétylation des histones H3 et H4, souvent associée à l'activation de la transcription se trouve également être plus importante dans ces régions et est proportionnelle au niveau de transcription des gènes (Pokholok et al., 2005). L'ensemble de ces données suggère un rôle important des complexes capable de remodeler la chromatine dans les processus d'initiation de la transcription.

I.5.3 L'élongation de la transcription dans un contexte chromatinien

Rôle du CTD dans un contexte chromatinien

Au début de l'élongation, la phosphorylation de la sérine 5 du CTD par Kin28/Cdk7 et l'association du complexe PAF à l'ARN polymérase sont requises pour le recrutement de Set1, une histone méthyltransferase de la position H3-K4 des histones (Ng et al., 2003). Les modifications induites par Set1 sont associées à l'activation transcriptionnelle et sont retrouvées dans la région 5' des gènes transcrits (Li et al., 2007; Ng et al., 2003; Santos-Rosa et al., 2002) (Table 2). L'autre principale modification du CTD, la phosphorylation de la sérine 2 induite par Ctk1, est nécessaire à l'association d'une autre histone métyltransferase Set2, qui agit au niveau du résidu K4K36 des histones (table 2). Une nouvelle fois le complexe PAF est nécessaire dans cette étape (Krogan et al., 2003; Li et al., 2002; Xiao et al., 2003). Ceci a permis d'établir un modèle où PAF intervient dans le recrutement de Set1 après la phosphorylation du CTD par TFIIH. Une fois la sérine 2 modifié par Ctk1, Set2 va remplacer Set1 qui est restée associé à la coiffe du messager.

Progression de Pol II pendant l'élongation dans un contexte chromatinien

L'élongation de la transcription par Pol II requiert la présence de complexes ou de protéines qui facilitent sa progression sur une matrice chromatinienne. C'est ainsi qu'a été découvert le facteur FACT (« FAcilitates Chromatin Transcription ») au cours d'études de biochimie réalisées à partir d'extraits de cellules HeLa (Orphanides et al., 1998). FACT et Spt6 se fixent directement aux histones et permettent leur solubilisation transitoire au cours du passage du complexe de transcription (Belotserkovskaya et al., 2003; Bortvin and Winston, 1996; Kaplan et al., 2003; Orphanides et al., 1999).

Le complexe SWI/SNF qui porte une activité acetyl-transférase (HAT), souvent associée à l'activation de la transcription, est nécessaire à la fluidification des premiers nucléosomes (Corey et al., 2003). Un autre complexe appelé Elongator pourrait également faciliter la progression de Pol II grâce à une de ses sous-unités qui possède une activité HAT (Hawkes et al., 2002; Kim et al., 2002; Wittschieben et al., 1999).

I.6 La régulation de la transcription

Les cellules d'un organisme répondent aux changements environnementaux par la modification de leurs profils d'expression génétique. Les signaux de l'environnement cellulaire vont être transduits et vont mener à la fixation des activateurs ou des répresseurs sur les promoteurs des gènes dont la transcription sera modulée. Les coactivateurs vont ensuite intégrer le signal pour activer ou réprimer la transcription (Orphanides and Reinberg, 2002).

I.6.1 Les répresseurs

Les protéines sont qualifiées de répresseurs lorsque leurs délétions ou lorsque des mutations ponctuelles les affectant entrainent une augmentation du niveau transcriptionnel de leurs gènes cibles. Il existe trois manières d'inhiber la transcription : (i) en renforçant la structure chromatinienne qui va constituer une barrière physique à la mise en place du complexe de préinitiation, (ii) en interagissant directement avec les facteurs généraux ou les coactivateurs ou (iii) en inhibant la fixation d'activateurs.

Exemple de répresseur qui renforce la structure chromatinienne

Le complexe Ssn6-Tup1 qui est conservé de la levure à l'homme, interagit avec la queue N-terminal des histones. Il semble réprimer la transcription en modifiant la chromatine puisque des mutations de *SSN6* et *TUP1* en affectent la structure. Cependant, la répression peut être observée, *in vitro*, sur une matrice dépourvue de nucléosome. Ceci indique que le complexe agit également sur la mise en place du PIC (Smith and Johnson, 2000).

Exemples de répresseurs qui agissent sur la mise en place du PIC

Les répresseurs généraux Mot1 et NC2 ont été caractérisés comme pouvant inhiber l'assemblage du PIC *via* TBP (Auble et al., 1994; Goppelt et al., 1996; Lee and Young, 1998). En se fixant sur les 17 nucléotides en amont de la boîte TATA, Mot1 catalyse la rupture du complexe TBP/ADN, en présence d'ATP (Darst et al., 2001). La caractérisation du dimère NC2 (Dr1-Drap) montre qu'il inhibe les promoteurs contenant une boîte TATA en se fixant sur l'ADN *via* TBP, ce qui empêche le recrutement de TFIIA et TFIIB (Geisberg et al., 2001). De même, le complexe Ccr4-Not semble également agir sur la mise en place du PIC.

Le complexe est composé d'au moins 9 sous-unités Not1-5, Caf1, Caf40, Caf130 et Ccr4. Il interagit par l'intermédiaire de la sous-unité Not5 et du domaine C-terminal de Not1 avec le facteur général TFIID (Collart, 2003; Collart and Struhl, 1994; Sanders et al., 2002). Cette interaction suggère que le complexe Ccr4-Not module la mise en place du PIC par l'intermédiaire de TFIID.

Exemples de répresseurs qui inhibent l'association d'activateurs

Les répresseurs Hsp90 et Gal80 interagissent directement avec les activateurs de Hsf1 et Gal4. Ces interactions empêchent leurs fixations sur leurs séquences d'ADN cibles (Sil et al., 1999; Zou et al., 1998).

I.6.2 Les activateurs

Les activateurs jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transcription. En réponse aux signaux de régulation, ils vont se fixer sur des séquences spécifiques d'ADN (Orphanides and Reinberg, 2002). Ils sont généralement constitués de deux domaines : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation (Triezenberg, 1995). Les activateurs constituent un réseau de régulation. Un activateur peut stimuler la transcription de plusieurs gènes. De même une unité de transcription peut être régulée par plusieurs activateurs. Ils vont permettre le recrutement de complexes appelés coactivateurs. Par exemple, les activateurs Gal4 et Gcn4 très étudiés chez la levure permettent le recrutement de SAGA, NuA4, Swi/Snf, TFIID et du Médiateur (Fishburn et al., 2005; Reeves and Hahn, 2005; Topalidou and Thireos, 2003).

I.6.3 Les coactivateurs

Les coactivateurs sont des complexes protéiques retrouvés chez tous les eucaryotes. Ils agissent en favorisant la mise en place du complexe de préinitiation ou en modifiant la structure chromatinienne afin de la rendre plus propice à la transcription (Naar et al., 2001). Contrairement aux facteurs généraux, ils sont dispensables à l'activité basale de Pol II, bien qu'ils soient nécessaires aux mécanismes d'activation d'un grand nombre de gènes *in vivo*.

Les différents coactivateurs ont en commun d'interagir avec les activateurs spécifiques pour être recrutés aux promoteurs (Naar et al., 2001).

I.6.3.1 Les complexes coactivateurs contenant des Tafs

Les TAFs ("TBP associated factors") sont associés à TBP au sein du complexe TFIID mais aussi à d'autres protéines dans des complexes comme SAGA et PCAF (Naar et al., 2001). Certains Tafs possèdent une ou plusieurs activités enzymatiques. Par exemple, Taf1 possède des activités kinase et histone acetyltransferase (HAT) (Dickstein et al., 1996; Mizzen et al., 1996). TFIID a été caractérisé biochimiquement comme un facteur général de la transcription. Cependant, des études réalisées *in vivo* chez la levure, ont montré que le complexe n'était pas requis pour la transcription de l'ensemble du génome (Kuras et al., 2000; Shen et al., 2003). Environ 30% des gènes de classe II dépendent directement de Tafs spécifiques de TFIID et 70 % dépendent de Tafs partagées entre SAGA et TFIID (Lee et al., 2000). Ces données de génomique fonctionnelle montrent que malgré la nécessité de TFIID pour la transcription basale sur certaines matrices *in vitro*, le complexe semble plutôt se comporter comme un coactivateur, *in vivo*.

Le complexe SAGA de *S. cerevisiae* régule l'activité d'environ 10% du génome. Il est plus particulièrement impliqué dans la transcription des gènes associés au stress (Huisinga and Pugh, 2004). Les protéines qui composent le complexe SAGA sont réparties en 4 classes : les protéines Ada, Spt, Taf et la protéine Tra1 (Timmers and Tora, 2005). Les protéines Ada ont été isolées à partir de cribles génétiques en interaction avec l'activateur Gcn4 et avec la protéine chimérique constituée du domaine de liaison à l'ADN de Gal4 associée au domaine d'activation de la transcription du virus herpes VP16 (Gal4-VP16). Elles favorisent la transcription en réponse à ces deux activateurs (Marcus et al., 1994). Ceci indique que le complexe peut être directement recruté sur le promoteur par des activateurs. SAGA facilite l'assemblage du PIC en interagissant directement avec TBP *via* la sous-unité Spt8 (Sermwittayawong and Tan, 2006), ce qui entraine le recrutement de TBP au promoteur (Bhaumik and Green, 2001; Larschan and Winston, 2001). De plus, SAGA chez la levure et PCAF chez l'Homme agissent sur la structure chromatinienne *via* la sous-unité Gcn5. La protéine possède une activité HAT dont le substrat principal est l'histone H3 du nucléosome (Grant et al., 1997). Ce type de modification entraîne généralement la fluidification de la chromatine et favorise la transcription.

I.6.3.2 Complexes de remodelage de la chromatine

L'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription ainsi qu'au PIC est un élément essentiel dans l'activation de la transcription. Les éléments architecturaux de la chromatine limitant cet accès, un "remodelage" de la chromatine est nécessaire, pour l'activation de la transcription. Le terme remodelage définit tous les événements qui altèrent la sensibilité aux nucléases d'une région de la chromatine (Aalfs and Kingston, 2000). Ce remodelage nécessite ou non une source d'énergie (ATP). Il existe donc des complexes de remodelage de la chromatine qui peuvent être divisés en fonction de leurs homologies et de leurs activités biochimiques en trois familles (Figure 6).

Les complexes SWI/SNF, initialement découverts chez la levure, sont de gros complexes dont la composition varie en fonction du tissu chez les mammifères, mais dont le cœur reste conservés (Naar et al., 2001). Ce sont des coactivateurs qui lient les récepteurs nucléaires (Wallberg et al., 2000; Yoshinaga et al., 1992) et des facteurs spécifiques comme c-Myc et C/EBPβ (Armstrong et al., 1998; Kowenz-Leutz and Leutz, 1999). Les activités biochimiques de ces complexes montrent qu'ils dissocient les nucléosomes et facilitent l'association des facteurs de transcription de façon dépendante de l'ATP (Narlikar et al., 2002).

Les complexes RSC forment une deuxième famille. Les sous-unités de leur cœur catalytique sont paralogues à celles de SWI/SNF. Les deux sous-unités Rsc1 et Rsc2 chez la levure contiennent des bromodomaines qui sont essentiels pour leur fonction de fluidification de la chromatine. Puisque les bromodomaines lient les lysines acétylées, ces sous-unités pourraient faciliter la liaison de RSC aux histones acétylées.

Enfin, les complexes ISWI constituent la troisième famille. Ils ont initialement été isolés chez la drosophile avant que leurs homologues humains et de levure ne soient découverts (Naar et al., 2001). Ils déplacent les nucléosomes et participent à leur redéploiement grâce un mécanisme appelé glissement d'octamère (Hamiche et al., 1999; Langst et al., 1999). Le rôle des complexes de remodelage de la chromatine ne semble pas être restreint à la transcription. En effet, ils pourraient intervenir dans d'autres mécanismes comme la réparation et la réplication de l'ADN (Citterio et al., 2000; Guschin and Wolffe, 1999).

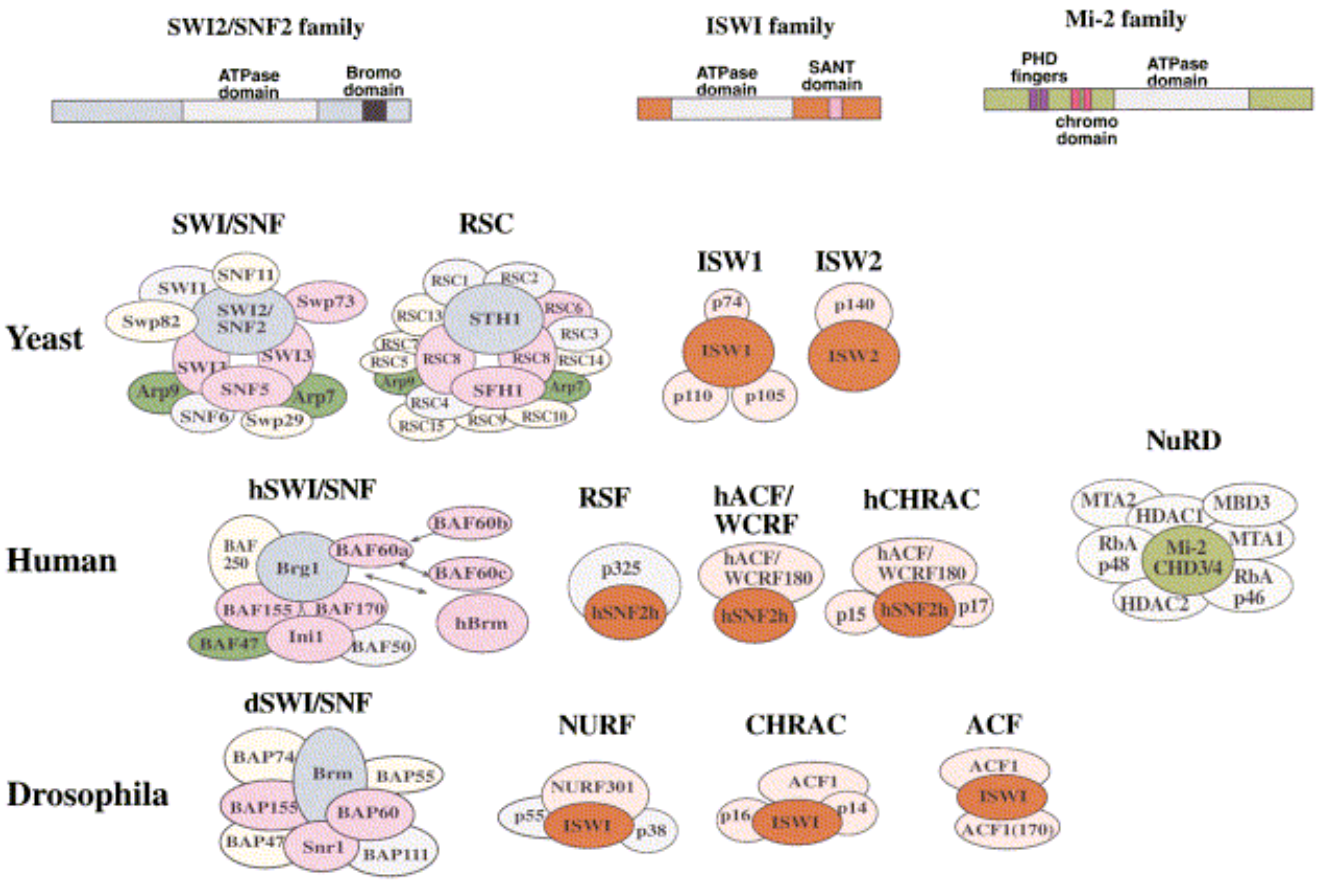
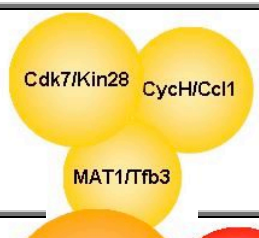
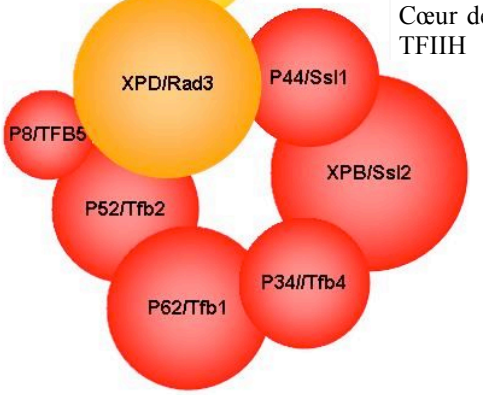


Figure **6**: Complexe de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP.
Schéma représentant les trois familles de complexe de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP. D'après Narlikar et al., (2002).

I.6.3.3 Le Médiateur

Le Médiateur de la transcription par l'ARN polymérase II sera plus amplement détaillé dans le chapitre IV de cette introduction. Brièvement, Le Médiateur est un complexe multi-protéique conservé chez tous les eucaryotes. C'est un coactivateur qui crée un lien entre Pol II et les activateurs spécifiques. Il est capable d'intégrer et de transmettre les signaux de régulation positif et négatif à l'ARN polymérase (Bjorklund and Gustafsson, 2005). Il favorise la transcription basale *in vitro*, et devient essentiel à la transcription *in vivo* (Holstege et al., 1998; Kim et al., 1994). Enfin, la caractérisation biochimique du Médiateur a montré qu'il était capable de stimuler l'activité de phosphorylation du CTD du facteur général de la transcription TFIIH qui est un acteur essentiel de l'initiation.

Table 4: Le complexe TFIIH

		Homme	Levure	Poids moléculaire *Hs* (kDa)	Fonctions
	CAK/ TFIIK	Cdk7	Kin28	41	Kinase de la transcription et du cycle cellulaire
		CycH	Ccl1	38	Régule l'activité de la kinase Cdk7/Kin28
		MAT1	Tfb3	32	Régule la spécificité de substrat de la kinase Cdk7/Kin28
	Cœur de TFIIH	XPB	Ssl2	89	Hélicase 3'-5' ATP dépendante
		XPD	Rad3	80	Hélicase 5'-3' ATP dépendante Ancre le sous-complexe CAK/TFIIK au cœur de TFIIH
		p62	Tfb1	62	-
		p52	Tfb2	52	Ancre XPB au cœur de TFIIH
		p44	Ssl1	44	Active XPD Rôle dans l'échappée du promoteur par Pol II
		p34	Tfb4	34	-
		p8	Tfb5	8	Stabilise le complexe Stimule l'activité ATPase de XPB

Chapitre II: Le facteur général de la transcription TFIIH

TFIIH est un des facteurs généraux les plus étudiés. Ceci est sans doute lié à son implication dans trois grands processus biologiques : la transcription, la réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER) ou couplée à la transcription (TCR), et le contrôle du cycle cellulaire. Une autre raison de l'intérêt pour TFIIH est son rôle dans trois maladies génétiques très invalidantes : *xeroderma pigmentosum* (XP), la trichotiodystrophie (TTD) et le syndrome de Cokayne (CS). Ces trois pathologies ont en effet en commun une hyper-sensibilité aux rayonnements UV souvent associée à un retard mental et de croissance. Ceci est malheureusement souvent accompagné d'autres symptômes comme une prédisposition au cancer pour XP, la cécité et la surdité pour CS, des cheveux cassants et une ichtyose congénitale pour TTD. TFIIH est un complexe protéique hautement conservé au sein du règne eucaryote. Il est composé de dix sous-unités (Giglia-Mari et al., 2004; Ranish et al., 2004) portant trois activités enzymatiques : 2 activités hélicases dépendantes de l'ATP dans les deux polarités (XPD/Rad3, XPB/Ssl2) et une activité kinase (Cdk7/Kin28).

II.1 Les sous-unités de TFIIH

Après purification biochimique par immunoprécipitation, TFIIH apparaît comme un complexe de 10 sous-unités (Giglia-Mari et al., 2004; Ranish et al., 2004) (Table 4). Il peut être dissocié en deux sous-complexes : CAK/TFIIK et le cœur de TFIIH (Drapkin et al., 1996; Feaver et al., 1994; Keogh et al., 2002; Reardon et al., 1996). CAK/TFIIK porte l'activité kinase dépendant de la cycline CycH/Ccl1 (Homme/levure) impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et dans l'initiation de la transcription (Egly, 2001; Zurita and Merino, 2003). Le cœur du complexe joue lui un rôle dans la réparation de l'ADN et dans l'ouverture de la molécule d'ADN lors de la transition entre les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription (Holstege et al., 1996; Zurita and Merino, 2003).

II.1.1 Le cœur de TFIIH

Le cœur de TFIIH est composé de 7 protéines dont les deux hélicases XPD/Rad3 et XPB/Ssl2. Des mutations dans l'une de ces deux sous-unités ou dans p8/Tfb5 sont à l'origine

des maladies XP, TTD et CS (Egly, 2001). Les cinq autres protéines jouent un rôle structural et modulent les activités de ces deux enzymes.

XPB/Ssl2

La protéine XPB est très bien conservée chez les eucaryotes. Elle possède plus de 50% d'identité avec son homologue de levure Ssl2. C'est la plus grande sous-unité du complexe TFIIH, son poids moléculaire varie de 89 kDa chez l'Homme à 95 kDa chez la levure. XPB joue un rôle clef dans la transcription puisque c'est l'hélicase 3'-5' ATP dépendante responsable de l'ouverture de la bulle de transcription (Guzder et al., 1994; Tirode et al., 1999). Cette étape est essentielle pour la libération du promoteur de Pol II et pour la transition entre les étapes d'initiation et d'élongation (Holstege et al., 1996). Ses activités hélicases et ATPases qui sont régulées par p8/Tfb5 et p52/Tfb2, sont également requises pour la réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER) et certainement pour la réparation couplée à la transcription (TCR) (Coin et al., 2007; Coin et al., 2006). En effet, elles permettent d'ouvrir la double hélice d'ADN de part et d'autre d'une lésion afin qu'elle puisse être réparée. Des mutations affectant XPB sont associées aux maladies XP, TTD et CS chez l'Homme.

XPD/Rad3

La taille de XPD/Rad3 est de 80 chez l'homme et de 89 kDa chez la levure. C'est la protéine la mieux conservée du complexe. Elle possède une activité hélicase 5'-3' ATP dépendante nécessaire à la NER, dont l'activité est modulé par p44/Ssl1 (Coin et al., 1998; Egly, 2001). Cette activité ne semble pas requise pour la transcription (Sung et al., 1996), néanmoins XPD/Rad3 joue un rôle actif dans ce processus (Coin et al., 1999). Ceci est sans doute lié au rôle structural important de la protéine dans le complexe. En effet, elle fait le lien entre les deux modules de TFIIH (Drapkin et al., 1996; Reardon et al., 1996) et permet d'ancrer CAK/TFIIK au cœur du complexe (Tirode et al., 1999). Certaines mutations de XPD engendrent un défaut transcriptionnel et déstructurent TFIIH en séparant les sous-modules (Dubaele et al., 2003). Cependant XPD/Rad3 pourrait jouer un rôle qui reste à déterminer au cours de la transcription, puisque certains mutants associés aux maladies TTD et XP affectent ce processus et ne présentent aucun défaut de composition de TFIIH (Dubaele et al., 2003).

La protéine XPD/Rad3 comporte 7 motifs structuraux conservés et spécifiques des hélicases. De nombreuses mutations réparties le long de la protéine humaine sont associées aux trois pathologies XP, TTD et CS (Figure 7). XPD semble être également associée au vieillissement précoce (Andressoo et al., 2006). Il y aurait plusieurs causes à l'origine de ces maladies qui impliqueraient à la fois le rôle de la protéine dans la réparation de l'ADN et dans la transcription (Dubaele et al., 2003).

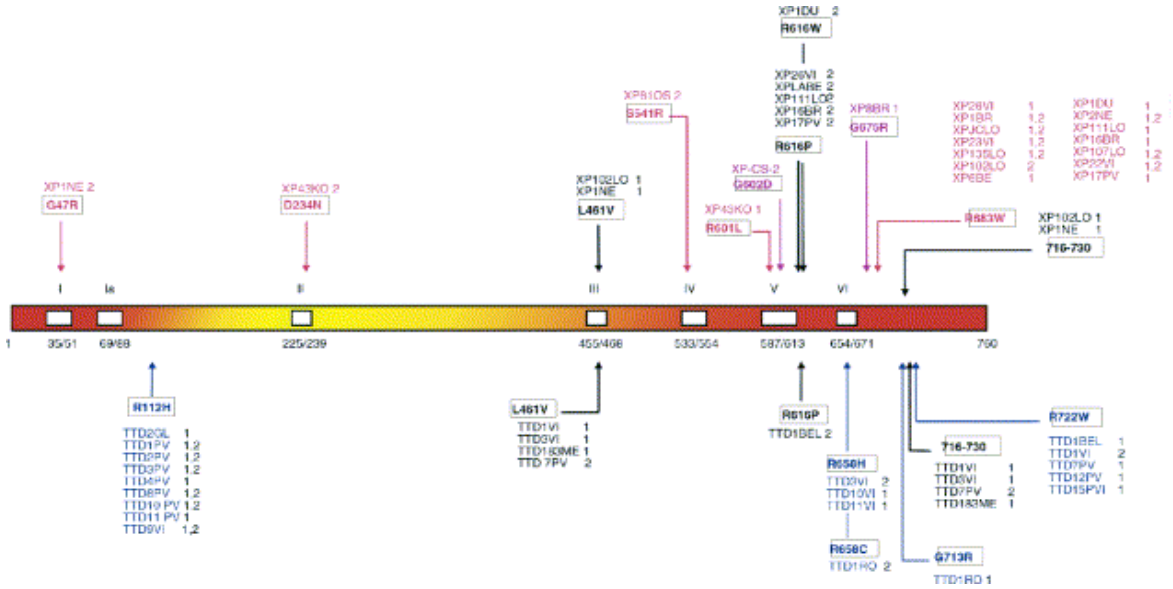


Figure 7: Organisation et polymorphisme de XPD associé aux maladies génétiques.
Diagramme représentant les sept motifs hélicases conservés de XPD et situant les différentes mutations retrouvées dans des patients affectés des maladies XP, TTD et CS.
D'après Dubaele et al., (2003)

p62/Tfb1

Il n'y a pas d'activité enzymatique connue pour p62/Tfb1. Néanmoins, elle participe au rôle de TFIIH au cours des processus d'initiation de la transcription et de réparation de l'ADN. En effet, des études réalisées chez la levure à partir d'un mutant thermosensible de Tfb1, ont montré une baisse de l'activité transcriptionnelle de Pol II après 5 minutes à la température non-permissive de 37°C. Des expériences de réparation de l'ADN réalisées à partir d'extraits nucléaires de ce mutant ont également révélé un défaut qui pouvait être corrigé par l'apport de cœur de TFIIH purifié (Wang et al., 1995). Enfin chez l'Homme, p62 participe à la régulation de la transcription médiée par TFIIH *in vitro*, en interagissant

directement avec le domaine carboxy-terminal de la protéine FBP (« FUSE Binding protein »), qui est un activateur régulant l'expression de l'oncogène c-*myc* (Liu et al., 2001).

p52/Tfb2

p52/Tfb2 est essentielle aux activités de réparation de l'ADN et de transcription de TFIIH. En effet, p52/Tfb2 stimule l'activité ATPase de XPB/Ssl2 et régule son activité hélicase (Coin et al., 2007). Enfin, la protéine p52/Tfb2 permet l'ancrage de XPB/Ssl2 et permet de maintenir la structure du complexe (Jawhari et al., 2002).

p44/Ssl1

p44/Ssl1 possède deux motifs structuraux liant le zinc : un motif de type « doigt de zinc » et un motif de type « ring finger like » (Humbert et al., 1994). Ces deux motifs présents dans la partie carboxy-terminal de la protéine sont essentiels. Ils lui permettent d'ancrer p62/Tfb1 au complexe TFIIH et sont requis pour la libération de Pol II au cours de la transition entre les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription (Seroz et al., 2000; Tremeau-Bravard et al., 2001). D'autre part, p44/Ssl1 module l'activité de XPD/Rad3 avec laquelle elle interagit directement. Une baisse de l'interaction entre les deux protéines entraine une baisse de l'activité hélicase 5'-3' qui est nécessaire à la NER (Coin et al., 1998). De nombreuses mutations de XPD altèrent le contact avec p44 et sont à l'origine des maladies XP, TTD et CS. Elles témoignent de l'importance de la régulation de l'activité hélicase par p44 (Egly, 2001).

p34/Tfb4

Il y a peu de données sur la protéine p34/Tfb4. C'est une sous-unité du cœur du complexe TFIIH qui est essentielle chez *S. cerevisiae*. L'étude d'un mutant thermosensible chez la levure a révélé que p34/Tfb4 intervenait dans la transcription et la réparation de l'ADN. La souche exprimant l'allèle muté est sensible aux UV. Ceci résulte d'un défaut de réparation, observé *in vitro* à partir d'extraits protéiques cellulaires. La souche est également auxotrophe pour l'inositol en raison de la baisse du niveau d'expression du gène *INO1* (Feaver et al., 1999). Les interactions entre p34 et p44 chez l'homme et entre Tfb4 et Rad3,

Ssl1, Tfb1 et Tfb2 chez la levure pourraient occuper un rôle structural important au sein du complexe (Kellenberger et al., 2005; Takagi et al., 2003).

p8/Tfb5

La protéine p8/Tfb5 a été récemment découverte chez *S. cerevisiae* et chez l'Homme (Giglia-Mari et al., 2004; Ranish et al., 2004). Elle est impliquée dans la maladie TTD en raison de son activité au cours de la NER. En effet, elle joue un rôle critique dans l'ouverture de la double hélice d'ADN en stimulant l'activité ATPase de XPB/Ssl2. Par contre, elle ne semble pas jouer de rôle au cours de la transcription (Coin et al., 2006).

II.1.2 Le sous-complexe TFIIK/CAK

Le sous-complexe CAK/TFIIK est composé de trois protéines : Cdk7/Kin28 la kinase du module, CycH/Ccl1 sa cycline, et MAT1/Tfb3 une protéine régulatrice et structurale. Il est ancré au cœur de TFIIH par XPD/Rad3 mais peut subsister sous forme libre dans la cellule (Drapkin et al., 1996; Ito et al., 2007; Reardon et al., 1996). Cdk7/Kin28 est responsable de la phosphorylation du CTD (Svejstrup et al., 1995). L'existence de TFIIK libre chez *S. cerevisiae* a été découverte grâce à des mutants présentant un défaut de phosphorylation du CTD (Keogh et al., 2002). Enfin, le module CAK/TFIIK ne semble pas être impliqué dans la NER (Svejstrup et al., 1995). Son activité kinase pourrait même inhiber l'activité de TFIIH dans ce processus (Araujo et al., 2000).

Cdk7/Kin28

La kinase Cdk7/Kin28 a initialement été clonée chez le xénope sous le nom de MO15 (Shuttleworth et al., 1990). Elle fut renommée Cdk7 après l'identification de son partenaire la cycline H (CycH) (Fisher and Morgan, 1994; Makela et al., 1994). Cdk7/Kin28 a été identifié simultanément chez l'Homme et la levure, comme étant la kinase du complexe TFIIH (Feaver et al., 1994; Roy et al., 1994). Cdk7/Kin28 est impliquée dans les processus de transcription et de contrôle du cycle cellulaire. Elle permet la transition entre les étapes d'initiation et d'élongation en phosphorylant la sérine 5 du CTD de Pol II (Holstege et al., 1996). Chez l'homme, Cdk7 participe au contrôle du cycle cellulaire en phosphorylant les kinases Cdk1,2,4 et 6 (Nigg, 1996). De plus, il a récemment été montré qu'elle était requise pour

l'activation de Cdk2 et pour l'assemblage de Cdk1 avec sa cycline (CycB) (Larochelle et al., 2007).

CycH/Ccl1

La protéine CycC/Ccl1 est une protéine de 38 kDa chez l'Homme et de 45 kDa chez la levure. Sa partie centrale contient 2 répétitions directes qui forment deux séries symétriques de cinq hélices α constituant une marque caractéristique des cyclines (Andersen et al., 1996). Elle interagit directement avec Cdk7/Kin28 et module son activité. Le clonage de la cycline a permis de mettre en évidence le couple Cdk7/CycH (Fisher and Morgan, 1994; Makela et al., 1994).

MAT1/Tfb3

La protéine MAT1/Tfb3 est le dernier composant du module TFIIK/CAK. Elle joue un rôle structural extrêmement important puisqu'elle participe avec XPD/Rad3 à l'association des deux modules de TFIIH (Feaver et al., 2000; Keogh et al., 2002). Des études réalisées à l'aide de mutants thermosensibles de Tfb3 chez la levure ont révélé son implication dans la progression du cycle cellulaire et dans la NER (Feaver et al., 2000; Jona et al., 2002).

II.2 La structure de TFIIH

L'obtention de modèles structuraux des complexes TFIIH humain et de levure par microscopie électronique à une résolution comprise entre 15 et 40 Å, a permis de montrer la grande conservation de l'organisation de TFIIH chez les eucaryotes (Chang and Kornberg, 2000; Schultz et al., 2000) (Figure 8). TFIIH apparaît sous la forme d'un anneau surmonté par une protubérance. Des analyses d'immuno-localisation ont permis de positionner les différentes sous-unités du complexe. L'anneau est constitué du cœur de TFIIH. On y retrouve les deux hélicases XPB/Ssl2 et XPD/Rad3 de part et d'autre du module. Les quatre autres protéines du cœur de TFIIH complètent la structure. La protubérance dans laquelle est localisée la protéine Cdk7, correspond à CAK/TFIIK qui se greffe sur le cœur *via* XPD/Rad3. Ces modèles sont en accord avec les analyses biochimiques qui définissent XPD/Rad3 comme le point d'ancrage du module CAK/TFIIK sur le cœur de TFIIH (Drapkin et al., 1996; Reardon et al., 1996; Tirode et al., 1999).

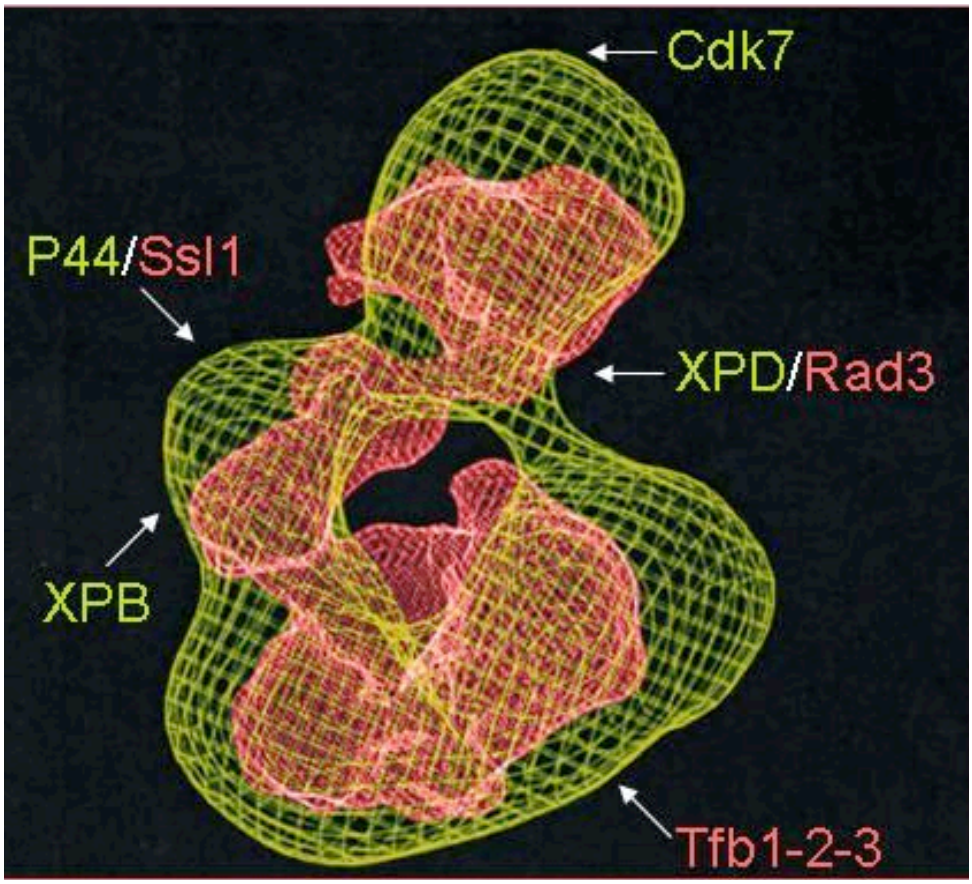


Figure 8: Modèle de microscopie électronique des complexes TFIIH humain et de levure.
En jaune : Modèle de TFIIH humain à 38 Å de résolution.
En rouge : Modèle de TFIIH de levure à 18 Å de résolution.
Les positions des protéines obtenues par un immuno-localisation sont indiquées en jaune pour les protéines humaines et en rouge pour les protéines de levure. D'après Chang and Kornberg, (2000) et Schultz et al., (2000)

La superposition des modèles de TFIIH humain et de levure montre que les complexes adoptent la même organisation et témoigne ainsi d'une similitude remarquable. Les protéines homologues (XPD et Rad3, p44 et Ssl1) dont les positions ont été déterminées à l'aide d'anticorps, se superposent dans la structure.

II.3 Les fonctions de TFIIH

TFIIH est impliqué dans trois processus fondamentaux de la vie cellulaire: la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et la transcription par l'ARN polymérase II.

II.3.1 Rôle dans la réparation de l'ADN

Lorsque la cellule est exposée à des agents génotoxiques, elle doit être capable de réparer les lésions pour survivre. Il existe plusieurs mécanismes de réparation adaptés aux différents types d'altération retrouvés. La réparation par excision de nucléotides (NER) sert principalement à éliminer les dommages de l'ADN comme les photo-produits pyrimidiques (6-4) pyrimidone, les dimères de pyrimidine et les adduits volumineux. Ils sont provoqués par les hydrocarbures que l'on peut retrouver dans la fumée de cigarette et par le rayonnement ultra violet (Hoeijmakers, 2001).

Le mécanisme de la NER a été déterminé à partir d'études réalisées chez *S. cerevisiae* (Prakash and Prakash, 2000). La première étape est la reconnaissance de la lésion. La protéine Rad14, le facteur RPA et les complexes Rad4-Rad23 et Rad7-Rad16 chez la levure sont responsable de cette étape (Prakash and Prakash, 2000). Les protéines et les facteurs homologues agissent de la même manière chez l'homme: XPA (Rad14), RPA, XPC- HR23B (Rad4-Rad23) (Costa et al., 2003) (Figure 9). XPC et HR23B reconnaissent la lésion, le complexe TFIIH est ensuite recruté, sans doute par XPC/Rad4 avec laquelle il interagit (Araujo et al., 2001). TFIIH joue un rôle essentiel dans le processus de NER. Il ouvre la double hélice d'ADN sur 30 paires de bases autour du dommage à l'aide de ses 2 hélicases dépendantes de l'ATP de polarités opposées (Evans et al., 1997). Son association avec l'ADN est nécessaire pour la mise en place du reste du complexe de réparation (Riedl et al., 2003). Ensuite, la double incision par les endonucléases XPG/Rad2 et XPF/Rad1-Rad10 permet l'élimination du fragment d'ADN lésé (Prakash and Prakash, 2000; Wood, 1997). Puis, l'ADN est resynthétisé à partir du brin non excisé qui sert de matrice aux ADN polymérases

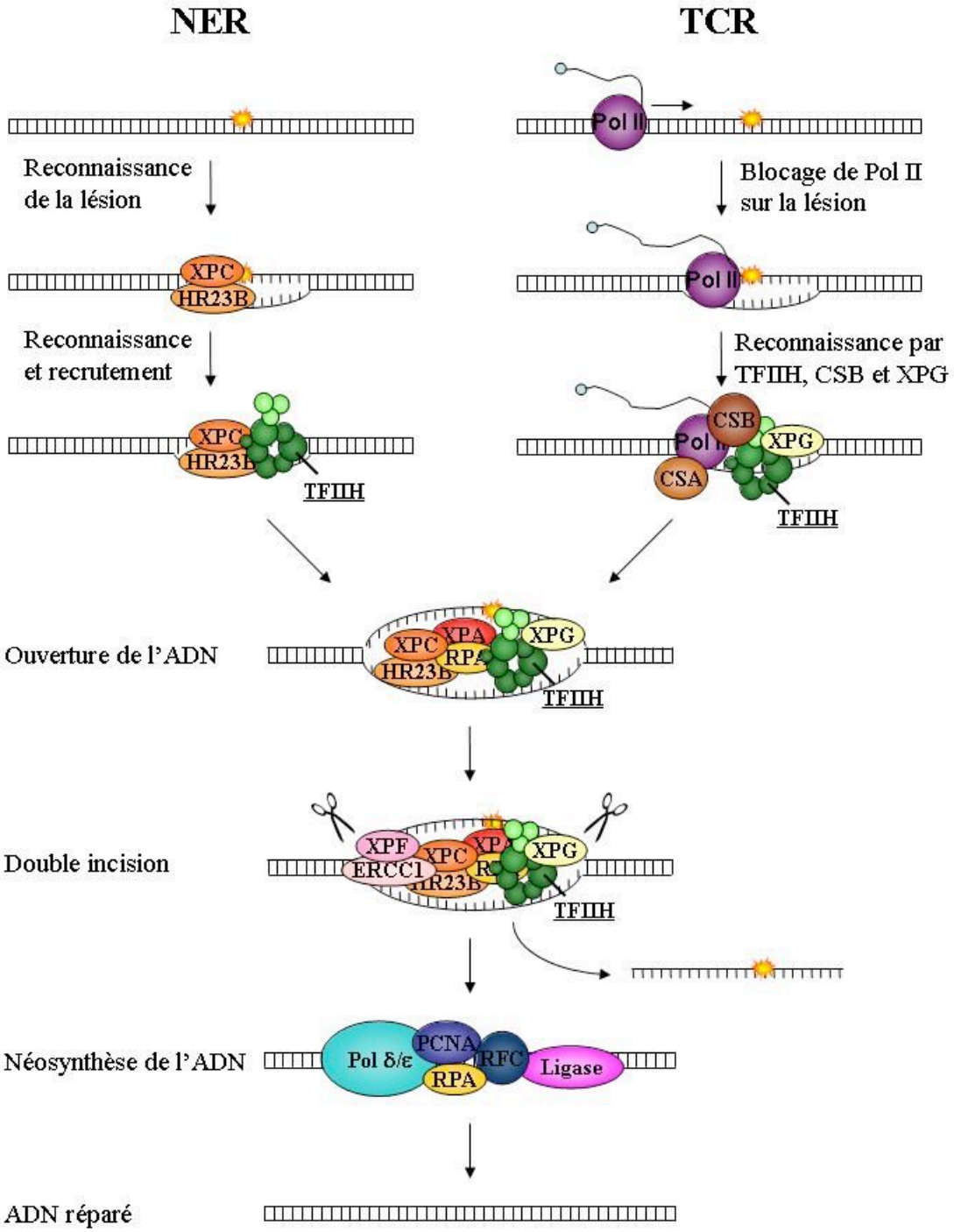


Figure 9: Schéma des différentes étapes de la NER et de la TCR.
Les différentes étapes de la NER et de la TCR sont représentées successivement : La reconnaissance de la lésion, l'ouverture de l'ADN, la double incision et la néosynthèse de l'ADN. Les protéines, facteurs et complexes mis en jeu apparaissent au cours des étapes au cours desquelles ils interviennent.

de la réparation. Cette étape peut être reconstituée *in vitro* en utilisant les facteurs RPA, RFC, PCNA et les ADN polymérases δ/ε (Shivji et al., 1995). Enfin, l'extrémité 5' de l'ADN néosynthétisé est liée au reste de la molécule. L'ADN ligase I dont la mutation B46R entraine une hypersensibilité aux agents qui endommagent l'ADN, pourrait catalyser cette réaction (Prigent et al., 1994).

La réparation couplée à la transcription (TCR) est une autre voie qui met en jeu le complexe TFIIH. C'est le mécanisme de réparation de l'ADN qui est affectée dans les patients des groupes A et B du syndrome de Cockayne (Sarasin and Stary, 2007). Elle se caractérise par les dommages à l'ADN qui sont beaucoup plus efficacement réparés sur le brin transcrit que sur le brin non transcrit et dont l'élimination est proportionnelle au niveau transcriptionnel (Laine and Egly, 2006b; Svejstrup, 2002). Des données récentes permettent aujourd'hui de proposer un mécanisme à la TCR (Figure 9). Au cours de la synthèse des ARN, Pol II se bloque à la rencontre d'un obstacle sur la matrice ADN. La bulle de transcription restée ouverte serait alors reconnue par les protéines CSB, XPG et le complexe TFIIH (Sarker et al., 2005). L'accumulation de Pol II hyperphosphorylée serait également un signal de reconnaissance pour CSB (Laine and Egly, 2006a). Les protéines impliquées dans la NER servent ensuite à éliminer la lésion.

Le complexe TFIIH joue donc un rôle crucial dans le maintient de l'intégrité du génome. Il participe à la reconnaissance des lésions dans la TCR et catalyse l'ouverture de la molécule d'ADN, une étape clef de la NER. Il n'est donc pas étonnant de retrouver des mutations impliquées dans les maladies XP, CS et TTD qui touchent les sous-unités XPB et XPD du complexe. Ces trois maladies ont pour symptôme commun, une hypersensiblité aux agents qui endommagent l'ADN et entrainent une prédisposition aux cancers.

II.3.2 Rôle dans le cycle cellulaire

Chez les eucaryotes, les couples cdk-cycline jouent un rôle essentiel dans la progression du cycle cellulaire. Les transitions entre les différentes étapes du cycle de division dépendent des activations successives des couples cdk-cyclines (Arellano and Moreno, 1997). Chez l'homme, Cdk7 participe au contrôle du cycle cellulaire en phosphorylant les kinases Cdk1,-2,-4,-6 (Nigg, 1996). Son activité est régulée par la protéine MAT1 et par l'association du module CAK au cœur de TFIIH. Cdk7 phosphorylerait préférentiellement les protéines du cycle cellulaire lorsque CAK est libre dans la cellule et le CTD de Pol II lorsqu'il est associé au reste du complexe TFIIH (Rossignol et al., 1997;

Yankulov and Bentley, 1997). La protéine MAT1 a pour rôle de stabiliser l'association de Cdk7 et de la cycline H (Fisher et al., 1995).

Chez *S. cerevisiae*, le rôle du module TFIIK au cours du cycle cellulaire n'est pas bien défini. Kin28 ne semble pas posséder la même activité que Cdk7 au cours du cycle cellulaire. Cette activité a été attribuée à une autre protéine (Civ1) (Cismowski et al., 1995; Thuret et al., 1996). Par conséquent, TFIIK chez la levure, ne semble pas impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. Cependant, des mutants thermosensibles de Tfb3, présentent des défauts dans la progression du cycle (Feaver et al., 2000; Jona et al., 2002). Ceci indique que TFIIK pourrait jouer un rôle dans ce processus qui reste à définir.

II.2.3 Rôle dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II

Le rôle de TFIIH est crucial au cours de l'étape d'initiation, il permet la libération de Pol II du promoteur en phosphorylant le CTD et en ouvrant les premières bases de la double hélice d'ADN (Holstege et al., 1997; Jiang et al., 1996; Parada and Roeder, 1996). TFIIH joue également un rôle dans la transactivation de la transcription en phosphorylant directement certains récepteurs nucléaires (le récepteur de rétinoïdes (RARα), de la vitamine D (VDR), de l'estrogène (ERα) et de l'androgène (AR) (Drane et al., 2004; Keriel et al., 2002; Rochette-Egly et al., 1997). TFIIH permettrait ainsi la régulation de ces récepteurs et le contrôle de l'activation de la transcription de leurs gènes cibles.

Une étude de génomique fonctionnelle réalisée chez la levure, montre qu'un mutant thermosensible de la sous-unité Kin28 présente une baisse de l'expression de 87% des gènes de *S. cerevisiae*, après seulement 45 minutes passées à température restrictive. Cette diminution est équivalente à celle observée avec un mutant de la sous-unité Rpb1 de Pol II (Holstege et al., 1998). TFIIH serait donc probablement requis pour la transcription de l'ensemble du génome. Cependant, il existe chez la levure quelques gènes dont la transcription pourrait être indépendante de Kin28 et dont l'activation ne nécessiterait pas l'activité de phosphorylation de TFIIH (Lee and Lis, 1998). De plus, contrairement aux résultats obtenus à l'aide du mutant thermosensible, une étude récente réalisée à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de l'activité kinase de Kin28, montre que cette activité n'est pas requise pour la transcription de l'ensemble du génome de *S. cerevisiae* (Kanin et al., 2007). Le mutant thermosensible semble déstabiliser les interactions protéine-protéine au sein du complexe et entraine une diminution de l'occupation de TFIIH au promoteur. Ceci suggère

que c'est le fait que l'ensemble des activités de TFIIH soit affecté dans le mutant thermosensible de Kin28 qui entraine les défauts majeurs observés (Kanin et al., 2007).

Le complexe TFIIH apparaît comme le senseur de l'initiation de la transcription. Ces activités enzymatiques, l'activité hélicase 3'-5' et son activité kinase permettent la libération de Pol II du promoteur et permettent le démarrage de l'étape d'élongation. Enfin la phosphorylation de la serine 5 du CTD par TFIIH est essentielle à l'ajout de la coiffe du messager et aux recrutements de facteurs d'élongation (Cho et al., 1997; Hampsey and Reinberg, 2003; Rodriguez et al., 2000; Yue et al., 1997).

Chapitre III: Le facteur d'élongation TFIIS

TFIIS est le premier des facteurs de transcription de l'ARN polymérase II à avoir été identifié (Sekimizu et al., 1976). Il est certainement le facteur d'élongation le mieux caractérisé (Wind and Reines, 2000). Néanmoins, comme nous le verrons dans la section des résultats, TFIIS joue un rôle dans d'autres processus.

III.1 Identification et caractérisation de TFIIS

TFIIS a été initialement purifié à partir de cellules tumorales de souris grâce a sa propriété de stimulation de la transcription sur une matrice d'ADN (Sekimizu et al., 1976). Les études réalisées ensuite à partir d'extraits de cellule animale ont montré que TFIIS agit au cours de l'élongation de la transcription en stimulant la processivité et l'efficacité de Pol II (Bengal et al., 1991; Rappaport et al., 1987; Reinberg and Roeder, 1987; Sluder et al., 1989). Chez *S. cerevisiae*, le gène *DST1* qui code TFIIS, a été identifié au cours d'un crible de sensibilité au 6-azauracil (6AU), une drogue qui affecte l'élongation de la transcription en agissant sur le métabolisme des nucléotides (Hubert et al., 1983; Nakanishi et al., 1992).

La caractérisation biochimique de TFIIS montre qu'il permet l'élongation de la transcription par Pol II au travers de divers obstacles *in vitro*. Il évite les pauses de la polymérase sur les séquences d'ADN riches en A-T ou caractérisées par une courbure, qui ralentissent l'enzyme (Fish and Kane, 2002). TFIIS favorise la progression de Pol II en présence de protéines ou de drogues liées à l'ADN. Il permet de réactiver une ARN polymérase II arrêtée sur une matrice, sans être pour autant capable d'empêcher le blocage (Bengal et al., 1991). TFIIS stimule le clivage de l'ARN transcrit au sein du complexe ternaire Pol II/ADN/ARN (Izban and Luse, 1992) (Figure 10). En effet, Pol II peut reculer lorsqu'elle se trouve en présence d'un obstacle qu'elle ne peut pas traverser. Ce recul désengage l'extrémité 3'OH de l'ARN néo-synthétisé du site actif de l'enzyme, et bloque Pol II sur l'ADN. TFIIS intervient alors en stimulant l'activité de clivage intrinsèque à l'ARN polymérase (Fish and Kane, 2002; Gu et al., 1993; Rudd et al., 1994; Wang and Hawley, 1993). Ceci a pour résultat de replacer l'extrémité 3'OH de l'ARN en face du site actif et donc de permettre le redémarrage de la transcription. Après que la lésion a été enlevée par la

machinerie de réparation ou après être arrivée seule à traverser l'obstacle, Pol II peut continuer la synthèse de l'ARN (Awrey et al., 1998; Reines et al., 1992).

Une étude récente de biophysique utilisant des molécules de Pol II isolées *in vitro*, a montré que TFIIS augmente la force exercée par Pol II. L'ajout de TFIIS permet ainsi de traverser une barrière nucléosomale (Galburt et al., 2007). Le facteur TFIIS favorise donc la progression de Pol II au cours de l'élongation en diminuant la durée des pauses et en augmentant la force de Pol II afin de l'aider à traverser les nucléosomes.

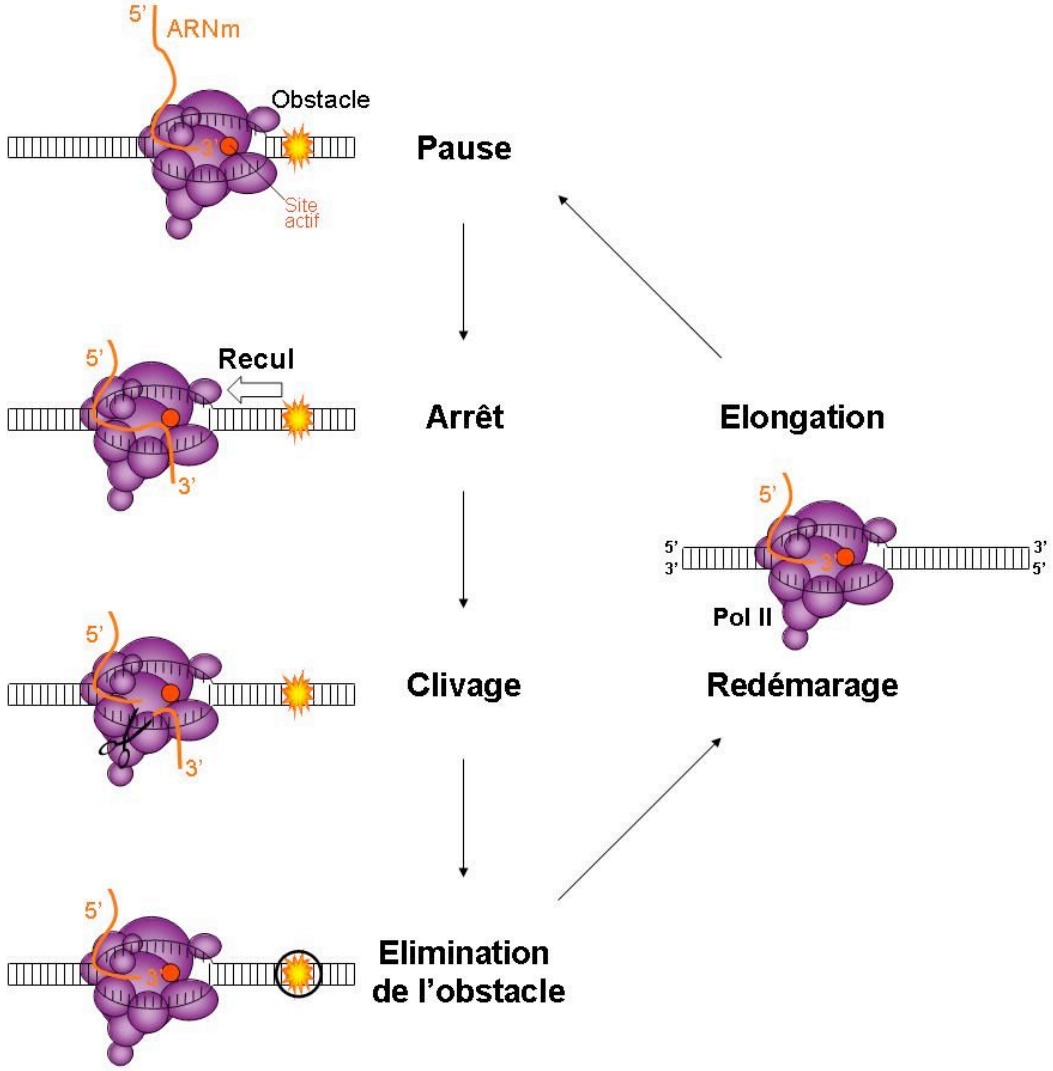


Figure 10: Schéma du cycle arrêt/redémarrage de la transcription par l'ARN polymérase II. Pol II en élongation peut être arrêtée par un obstacle sur l'ADN, on parle de pause de la transcription. Si le blocage persiste, la pause est suivie d'un recul de la Pol II qui décale l'extrémité 3' de l'ARNm naissant du site actif. La Pol II ne peut progresser sans ajouter de nucléotides à l'ARN naissant. L'ARNm est clivé favorisant ainsi l'alignement de la nouvelle extrémité 3' de l'ARNm avec le site actif de polymérisation. Après élimination de l'obstacle, Pol II peut repartir en élongation. D'après Fish and Kane, (2002)

III.2 Structure et mode d'action de TFIIS

Le facteur d'élongation TFIIS est composé de trois domaines structuraux conservés au cours de l'évolution dont le repliement est indépendant (Figure 11 A). La structure des trois domaines a été obtenue par RMN chez *S. cerevisiae* (Booth et al., 2000; Olmsted et al., 1998) (Figure 11 B) et chez l'Homme pour le domaine III (Qian et al., 1993). Le domaine I adopte une forme globulaire avec plusieurs hélices α. Le domaine II est très organisé autour de six hélices α. Un linker sépare les domaines II et III, il se structure sous la forme d'une grande hélice. Enfin, le domaine III est composé de trois feuillets β antiparallèles formant un motif en ruban à zinc et contient un motif RSADE sur une boucle. Ce motif est essentiel pour l'activité de stimulation de clivage de Pol II par TFIIS.

Un modèle cristallographique des domaines II et III complexés à Pol II a été obtenu par diffraction des rayons X à la résolution de 3,8 Å chez *S. cerevisiae* (Kettenberger et al., 2003) (Figure 11 C). Ce modèle a permis de comprendre les mécanismes mis en jeu par TFIIS pour stimuler le clivage de l'ARN dans le complexe ternaire. Le domaine II du facteur interagit avec la sous-unité Rpb1 de Pol II, puis TFIIS pénètre dans le cœur de l'ARN polymérase grâce à son linker allongé. Le domaine III se trouve alors au niveau du site actif de Pol II et présente le motif RSADE.

La fonction du domaine I reste encore inconnue. Le domaine fusionné à la GST permet néanmoins de purifier Pol II associée aux facteurs généraux et à Cdk8, une sous-unité du Médiateur (Pan et al., 1997). Ce mélange est capable d'activer la transcription en présence des activateurs spécifiques *in vitro* Gal4-VP16 et Gal4-SP1 (Pan et al., 1997). De plus, un crible double-hybride réalisé chez la levure et des expériences de coimmunoprécipitation de protéines révèlent que le domaine I interagit avec la sous-unité Med13 du Médiateur et avec la sous-unité Spt8 du complexe SAGA (Wery et al., 2004). L'ensemble de ces données suggérent un rôle du Médiateur et de SAGA au cours de l'élongation ou alors un rôle de TFIIS au cours de l'initiation.

Le domaine I n'est pas essentiel à l'activité de clivage (Awrey et al., 1998). Les domaines II et III qui apparaissent dans le modèle de cristallographie avec Pol II sont suffisants pour l'activité de clivage de TFIIS, *in vitro* (Nakanishi et al., 1995). Le domaine II interagit avec la sous-unité Rpb1 de Pol II. Isolé, ce domaine a une affinité pour la polymérase comparable à celle de TFIIS entier (Awrey et al., 1998). Des mutations de l'hélice α3 dans les résidus K196, R198, R200 et K209 qui sont en contact avec Pol II dans le

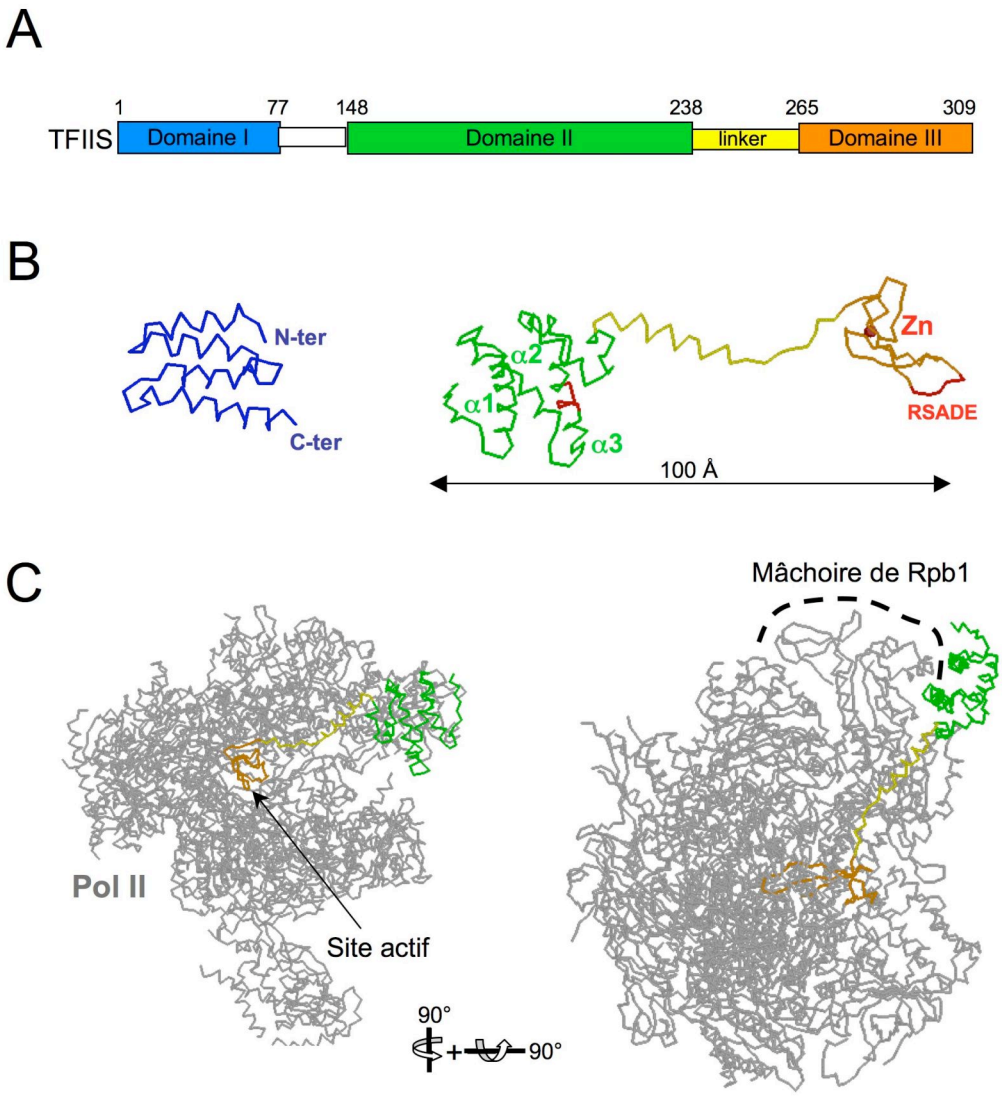


Figure 11: Architecture de TFIIS associée à l'ARN polymérase II de *S. cerevisiae*.
(A) Structure primaire et organisation en domaine de TFIIS. Le diagramme montre la répartition des trois domaines de TFIIS le long de la structure primaire de la séquence de la protéine. Les domaines I, II et III sont respectivement représentés en bleu, vert et orange. Le linker entre les domaines II et III est en jaune. Les limites des domaines sont indiquées au-dessus de la figure en numérotant à partir du premier acide aminé N-terminal.
(B) Panneau de gauche : Structure du domaine I isolé obtenu en RMN. D'après Booth et al., (2000). Panneau de droite : Structure des domaines II et III obtenu par diffraction au rayon X du complexe TFIIS/Pol II. Les résidus basiques nécessaires à la liaison de TFIIS à la Pol II et le motif RSADE essentiel à l'activité de clivage sont indiqués en rouge.
(C) Structure des résidus 148 à 309 de TFIIS liés à l'ARN polymérase II. D'après Kettenberger et al., (2004).

modèle structural (Kettenberger et al., 2004), suffisent à abolir l'interaction entre TFIIS et Pol II *in vitro* (Awrey et al., 1998). Le domaine II joue donc un rôle clef au sein de TFIIS puisqu'il est responsable de son association avec Pol II.

Le linker pénètre dans le cœur de l'ARN polymérase et y projete le domaine III au niveau du site actif de l'enzyme (Kettenberger et al., 2004). Le linker est essentiel et ne peut pas être supprimé pour l'activité de stimulation de clivage de TFIIS, cependant les mutations des résidus conservés du linker n'affectent que modérément le rôle du facteur (Awrey et al., 1998).

Enfin, le domaine III est essentiel à l'activité de TFIIS (Olmsted et al., 1998). Ce domaine porte le motif RSADE qui est extrêmement conservé au cours de l'évolution et chez tous les paralogues de TFIIS. Dans le modèle structural, le motif RSADE se trouve au niveau d'un magnésium clef du site catalytique de l'ARN polymérase (Kettenberger et al., 2004). Cette position semble lui permettre de favoriser l'activité de clivage intrinsèque de Pol II. La simple mutation de l'acide glutamique à la fin du motif ne diminue que partialement l'activité de TFIIS, par contre, son association avec la mutation de l'arginine abolit complètement l'activité de stimulation de clivage du facteur, sans pour autant diminuer son association avec Pol II (Awrey et al., 1998).

Chapitre IV: Le Médiateur de la transcription par l'ARN polymérase II

Que se soit chez l'homme et les mammifères ou chez les eucaryotes unicellulaires, la régulation de la transcription est cruciale pour le développement et la survie de l'organisme. C'est dans ce processus qu'intervient le Médiateur de la transcription par l'ARN polymérase II.

IV.1 Le Médiateur de *Saccharomyces cerevisiæ*

La transcription basale est définie *in vitro*, par l'activité de Pol II en présence des facteurs généraux. Cependant ce système est incapable de répondre aux signaux de régulation. Ceci à servi de base à la recherche de facteurs qui stimulent la transcription en présence d'activateurs à partir d'extraits protéiques de *S. cerevisiae* (Kornberg, 2005).

IV.1.1 Découverte et caractérisation du Médiateur

La notion de Médiateur est née au début des années 90 grâce aux phénomènes d'interférence entre activateurs (Kelleher et al., 1990). La transcription d'un rapporteur *in vitro*, est activée par un activateur qui se lie en amont du site d'initiation. Si on ajoute un activateur qui n'a pas la capacité de se lier au promoteur du rapporteur, la transcription du rapporteur est diminué. Une telle interférence a été attribuée à la séquestration par l'activateur non lié à l'ADN d'un facteur requis pour la transcription activée présent en quantité limitante. Une fraction protéique dont l'addition à la réaction annule l'interférence, a été purifiée à partir d'un extrait brut de levure et est à l'origine de la notion de Médiateur (Flanagan et al., 1991).

Une étude génétique menée en parallèle est venue renforcer cette idée. Un groupe de gènes identifiés comme des suppresseurs extragéniques d'une troncature du CTD de Pol II appelé SRB pour « Suppressor of RNA polymerase B », a pu être isolé : *MED20* (*SRB2*), *MED17* (*SRB4*), *MED18* (*SRB5*), *MED22* (*SRB6*), *MED21* (*SRB7*), *MED1 2*(*SRB8*), *MED13* (*SRB9*), *CDK8* (*SRB10*) et *CYCC* (*SRB11*). Les protéines codées par ces gènes ont ensuite été

purifiées au sein d'un complexe qui lie le CTD et qui favorise l'initiation de la transcription *in vitro* (Hengartner et al., 1995; Nonet and Young, 1989; Thompson et al., 1993).

Indépendamment, le Médiateur a été purifié à homogénéité et caractérisé *in vitro* (Kim et al., 1994). Les grandes activités du Médiateur ont pu être déterminées, il permet l'activation de la transcription par Pol II en réponse aux activateurs, il stimule la transcription basale dont le niveau augmente en sa présence et il favorise la phosphorylation du CTD par TFIIH.

IV.1.2 Organisation et structure du Médiateur de *S. cerevisiae*

L'identification des protéines du complexe Médiateur a montré qu'il était composé de 24 sous-unités (Kornberg, 2005). Récemment, une 25ème sous unité a été découverte simultanément dans notre laboratoire et celui de Claes Gustafsson (Guglielmi et al., 2004; Linder and Gustafsson, 2004). Les protéines du Médiateur de *S. cerevisiae* sont nommées Med1-22, Med31, Cdk8 et CycC (Bourbon et al., 2004).

IV.1.2.1 Les modules du Médiateur

Le Médiateur comporte quatre modules : la Tête, le Milieu, la Queue et le module Cdk8. Ces sous-complexes peuvent être séparés *in vitro* sous l'effet de mutations ou en fonction des conditions utilisées au cours de la purification biochimique. En présence d'une concentration de 2 M d'urée, la Tête se sépare du Milieu et de la Queue (Lee and Kim, 1998). Dans un mutant de la sous-unité Med14, la Queue se sépare du Milieu et enfin dans un mutant de Med19, le Milieu se sépare du reste du Médiateur (Baidoobonso et al., 2007; Li et al., 1995). Enfin, le module Cdk8 copurifie indépendamment du reste des sous-unités par purification à l'aide de l'étiquette TAP (Borggrefe et al., 2002). Le Médiateur existerait sous deux formes, avec ou sans le module Cdk8 dont l'association avec les autres modules influencerait le rôle de tout le complexe (Andrau et al., 2006; Elmlund et al., 2006; van de Peppel et al., 2005).

IV.1.2.2 Structure du Médiateur de *S. cerevisiae*

Un modèle du complexe Médiateur associé à Pol II a été obtenue à la résolution de 40 Å (Asturias et al., 1999). Le Médiateur lie Pol II par les modules de Tête et du Milieu et

englobe l'enzyme en laissant une surface libre importante qui pourrait permettre à d'autres facteurs de s'insérer (Figure 12A). L'obtention de nouveaux modèles a montré que le Médiateur existait sous plusieurs conformations. En effet, le Médiateur isolé, forme une structure compacte qui s'étire lorsqu'il est associé à Pol II. Cette observation est à l'origine d'un modèle où les changements de conformation revêtent une place importante dans l'activation du complexe (Davis et al., 2002) (Figure 12B). Le Médiateur existerait sous deux états, une forme fermée dans laquelle le module de Queue est repliée sur celui du Milieu, et une forme ouverte associée à l'activation du Médiateur dans laquelle le module de Queue se déplie pour laisser place à l'interaction avec Pol II.

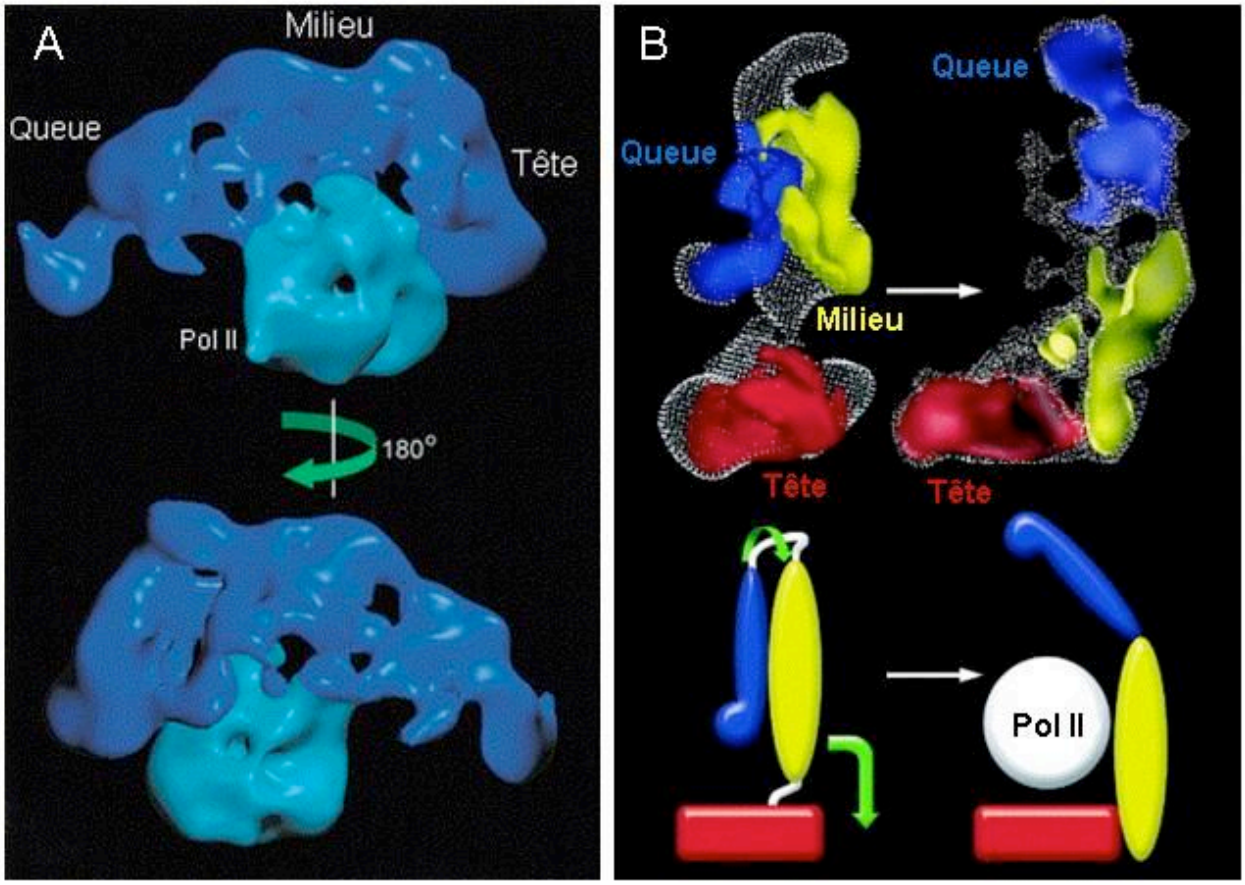


Figure 12: Structure du Médiateur.
A) Modèle structural de microscopie électronique du Médiateur associé à Pol II à la résolution de 35 Å..
B) Changement de conformation observé par microscopie électronique du Médiateur libre ou associé à Pol II.
D'après Davis et al., (2002)

IV.1.2.3 Organisation du Médiateur de *S. cerevisiae*

L'organisation du Médiateur a été définie grâce aux modèles structuraux. En se basant sur les données de biochimie et sur la masse estimée des modules, une organisation en sous-unité a été déduite (Dotson et al., 2000). Des travaux de co-immunoprécipitation de protéine (Kang et al., 2001) et la définition d'une carte à haute résolution déduite de cribles double-hybride sont venus ensuite confirmer et préciser l'organisation du complexe (Guglielmi et al., 2004) (Figure 13). Le module de Tête est composé de huit protéines (Med6, 8, 11, 17, 18, 19, 20 et 22). Il interagit avec le module du Milieu (Med1, 4, 5, 7, 9, 10, 21 et 31) *via* l'interaction entre Med17 et Med21. Le module de Queue qui est composé de cinq protéines (Med2, 3, 14, 15 et 16), pourrait se replier sur le module du Milieu grâce à l'interaction entre Med3 et Med21. Enfin, le module Cdk8 vient s'ajouter au reste du complexe, il est composé de quatre sous-unités (Med12 et 13, Cdk8 et CycC). Il pourrait s'associer grâce à l'interaction entre Med13 et Med17 aux autres modules (Guglielmi et al., 2004) (Figure 13A).

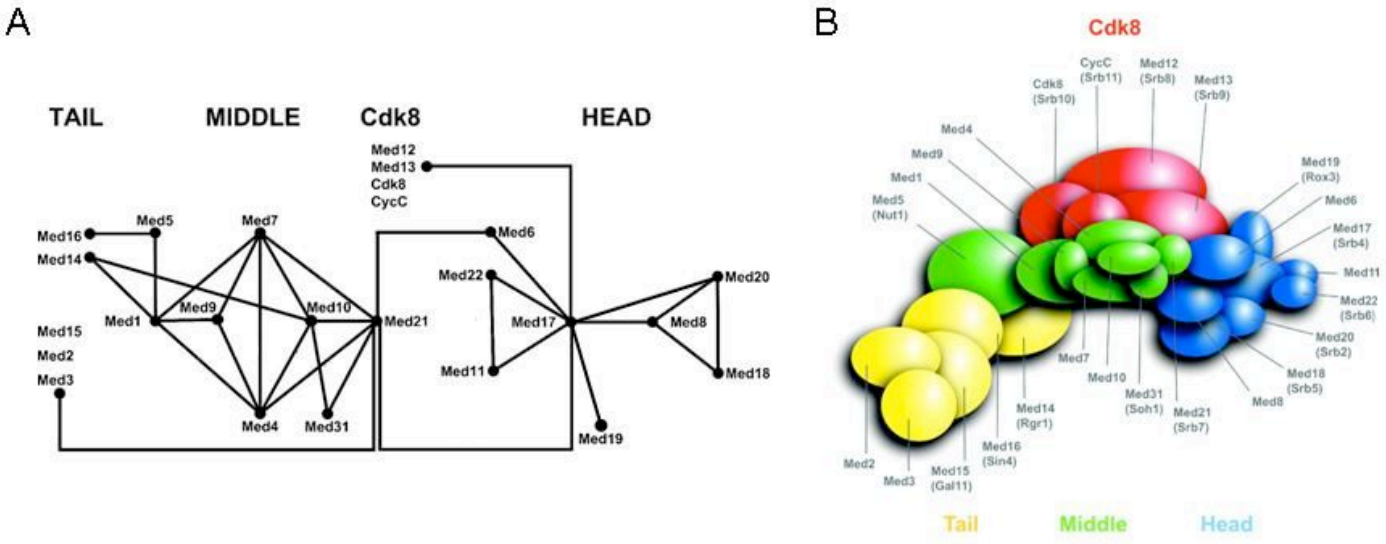


Figure 13**:** Organisation du Médiateur.
A) Carte des interactions entre les sous-unités du Médiateur (Guglielmi et al., 2004).
B) Schéma de l'organisation du complexe Médiateur défini par double-hybride (Guglielmi et al., 2004).

IV.2 Le Médiateur des animaux

L'universalité du Médiateur au sein du règne eucaryote est une question fondamentale. La découverte d'un complexe clef dans la régulation de la transcription chez *S. cerevisiae* ouvrait de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes du contrôle de l'expression génétique qui sont mis en jeu dans de nombreuses maladies et cancers.

IV.2.1 Identification et composition

Le groupe de Robert Roeder est le premier à avoir identifié chez l'homme, un complexe protéique qui possède des propriétés semblables à celles du Médiateur de *S. cerevisiae* (Fondell et al., 1996). Il s'agit d'un coactivateur dont certaines sous-unités sont homologues à celle du Médiateur de levure, qui favorise l'activation de la transcription dans un système dépourvu de TAF, *in vitro* (Oelgeschlager et al., 1998). En parallèle, les Médiateurs de souris, de rat, de drosophile et humain ont été purifiés (Boyer et al., 1999b; Brower et al., 2002; Fondell et al., 1999; Jiang et al., 1998; Naar et al., 1999; Rachez et al., 1999; Ryu et al., 1999). L'importance du Médiateur dans la régulation de la transcription chez les mammifères se reflète dans la variété des systèmes biochimiques qui ont permis de l'isoler. Les complexes Médiateur TRAP/SMCC, DRIP/ARC, le complexe dit « médiateur humain » et les petits complexes PC2, CRSP et NAT ont été purifiés en association avec des activateurs ou ont pu être mis en évidence à partir de fractions stimulant la transcription (Conaway et al., 2005b).

TRAP/SMCC

Le premier Médiateur de mammifère à avoir été purifié est le complexe TRAP. Il a été isolé en association avec le récepteur α de l'hormone thyroïdienne à partir d'extraits de cellules HeLa cultivées en présence de l'hormone (Fondell et al., 1996). Le complexe SMCC a ensuite été identifié au cours d'immunopurifications réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre l'étiquette FLAG couplée aux protéines Med21(hSrb7), Cdk8(hSrb10) ou CycC (hSrb11) (Gu et al., 1999). La caractérisation des complexes TRAP et SMCC a révélé qu'ils formaient un seul et même complexe. Ils sont composés d'une vingtaine de sous-unités dont

la plupart présentent une homologie avec les protéines du Médiateur de *S. cerevisiae* (Boube et al., 2002; Bourbon et al., 2004; Ito et al., 1999). Comme lui, ils possèdent la capacité de stimuler la transcription en réponse à des activateurs *in vitro* (Ito et al., 1999).

DRIP/ARC

La recherche de facteurs associés au récepteur de la vitamine D (VRD) dans les cellules humaines a permis d'isoler le complexe DRIP. Il possède *in vitro* les propriétés d'un complexe Médiateur puisqu'il est essentiel à l'activation de la transcription médiée par VRD (Rachez et al., 1999; Rachez et al., 1998). Des études similaires ont identifié le complexe ARC qui est essentiel à la régulation de la transcription sur des matrices chromatiniennes en réponse aux activateurs SREBP-1α, VP16 et la sous-unité p65 de NFκB (Näär et al., 1999). Les compositions en sous-unité des complexes DRIP et ARC sont identiques et sont très proches de celle de TRAP/SMCC (Rachez and Freedman, 2001).

Le « Médiateur humain » et les petits complexes Médiateurs

La recherche du Médiateur humain a permis d'identifier de nombreux complexes de compositions très proches. Par exemple, un facteur multiprotéique semblable à DRIP/ARC et TRAP/SMCC a été isolé par chromatographie d'affinité grâce à la protéine E1A de l'adénovirus. Il favorise la transcription en réponse à l'activateur Gal4-VP16 (Boyer et al., 1999a). En parallèle, les complexes PC2, CRSP et NAT ont été purifiés (Conaway et al., 2005a; Ryu et al., 1999; Sun et al., 1998). Ils appartiennent tous à la famille des Médiateurs humains. Tous ces complexes de composition variable possèdent de nombreuses protéines en commun et plusieurs sous-unités homologues à celles du Médiateur de *S. cerevisiae*. Leurs différences pourraient être liées à la régulation tissu-spécifique de l'expression génique (Conaway et al., 2005b; Malik and Roeder, 2005).

Cependant, une étude récente plaide pour l'existence d'un Médiateur de mammifère uniforme. Elle diffère des précédentes études par l'utilisation de l'analyse MudPIT (« MUltiDimensional Protein Identification Technology »), qui évite les ambiguïtés d'identification des protéines associées à la migration par électrophorèse. Cette technique a été utilisée sur des fractions d'immunopurification réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre des étiquettes couplés à Med9, Med10, Med19, Med26, Med28 ou Med29. Au cours de cette analyse toutes les sous-unités des complexes préalablement identifiés ont été détectées,

proposant ainsi un consensus où le Médiateur humain apparaît comme un complexe de 32 sous-unités (Sato et al., 2004). Néanmoins, cette technique ne permet pas d'infirmer l'hypothèse que plusieurs Médiateurs de compositions différentes peuvent coexister au sein de la même cellule. Ils pourraient posséder en commun les protéines utilisées pour la purification.

IV.2.2 Conservation du Médiateur

Conservation structurale du Médiateur

Les premiers indices de la conservation du Médiateurs ont été apportés par des expériences de microscopie électronique. Les modèles structuraux des Médiateurs de levure, murin et humain montrent une organisation fonctionnelle similaire (Asturias et al., 1999; Dotson et al., 2000) (Figure 14). Les complexes apparaissent sous la forme ouverte du Médiateur. On distingue une masse homogène composé des modules de Tête et du Milieu qui supporte le module de Queue. La comparaison des complexes TRAP/ARC avec le Médiateur de levure démontre la conservation structurale du module de Tête. Cependant, les différents complexes ne montrent qu'une ressemblance générale.

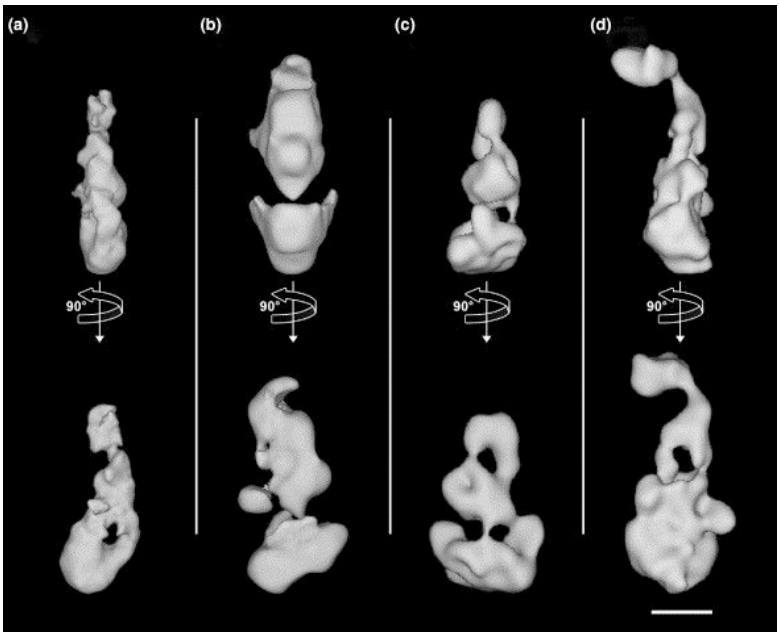


Figure 14: Comparaison des modèles des Médiateurs de levure, murin et humain.

(A) Modèle du Médiateur murin ;(B) Modèle du Médiateur de levure;
(C) Modèle du Médiateur humain CRSP ;(D) Modèle du Médiateur humain TRAP/ARC.
D'après Chadick and Asturias, (2005)

Conservation des séquences primaires des sous-unités du Médiateur

La purification et l'identification des sous-unités du Médiateur de *S. cerevisiae* ont permis la recherche d'homologie dans les banques de données. Les alignements de séquence ont d'abord permis de mettre en évidence trois protéines de métazoaires présentant une homologie avec des sous-unités du Médiateur de levure : Med6, Med7 et Med21(Srb7) (Chao et al., 1996; Lee et al., 1997; Myers et al., 1998). Ensuite, la purification du premier Médiateur humain a confirmé leur appartenance à ce complexe (Fondell et al., 1996). Néanmoins, la majeure partie des sous-unités identifiées chez la levure ne semblait alors pas être conservées. C'est la purification de nouveaux complexes dans de nombreux organismes eucaryotes, ainsi qu'une étude bioinformatique par alignement de séquence de proche en proche, qui ont révélé la conservation de la plupart des constituants du Médiateur au cours de l'évolution (Boube et al., 2002). Ceci a permis de proposer une nomenclature commune aux organismes eucaryotes pour la désignation des sous-unités du Médiateur (Bourbon et al., 2004) (Table 5)

IV.2.3 Etudes fonctionnelles et pathologies

Le Médiateur a été isolé chez les mammifères en association avec des activateurs et chez la levure grâce à sa capacité d'activer la transcription dans un système *in vitro* (Conaway et al., 2005b; Kornberg, 2005). Les expériences réalisées *in vivo*, ont ensuite révélé le rôle essentiel du complexe dans la transcription et la régulation de l'expression des gènes.

Une étude de génomique fonctionnelle réalisée à l'aide de puces à ADN chez *S. cerevisiae* a révélé que le Médiateur était crucial à la transcription *in vivo*. En effet, l'analyse d'un mutant thermosensible de la sous-unité du module de tête Med17, a montré une chute de l'expression génique d'environ 90% du génome. Cette diminution est équivalente à celle observée dans un mutant de Pol II ou du facteur général TFIIH (Holstege et al., 1998). Ce résultat témoigne de l'importance du Médiateur dans la transcription basale et activée.

Le Médiateur se trouve impliqué dans de nombreux processus biologiques chez les animaux. Le complexe joue un rôle important dans le développement. Ceci a été déterminé à partir d'études réalisées chez la drosophile, le poisson zèbre et la souris. En effet, le module Cdk8 est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes du développement de la patte, la différentiation cellulaire pendant le développement de l'œil, dans le développement des organes sensoriels externes et dans la définition des segments chez la drosophile (Boube et al., 2000; Loncle et al., 2007). Chez le poisson zèbre, le Médiateur est requis pour la

Table 5: Nomenclature unifiée du Médiateur.

				H.sapiens				
Nom	*S. cerevisiae*	*S.pombe*	*D.melanogaster*	TRAP/SMCC	ARC/DRIP	CRSP	PC2	autres
MED1	Med1	Pmc2	Trap220	TRAP220	ARC/DRIP205	CRSP200	TRAP220	PBP
MED1L								
MED2	Med2							
MED3	Pgd1/Hrs1/Med3							
MED4	Med4	Pmc4/SpMed4	Trap36	TRAP36	ARC/DRIP36		TRAP36	p34
MED5	Nut1							
MED6	Med6	Pmc5/SpMed6	Med6	hMed6	ARC/DRIP33		hMed6	p32
MED7	Med7	SpMed7	Med7	hMed7	ARC/DRIP34	CRSP33	hMed7	p36
MED8	Med8	Sep15/SpMed8	Arc32		ARC32			mMed8
MED9	Cse2/Med9		CG5134					Med25
MED10	Nut2/Med10	SpNut2	Nut2	hNut2	hMed10		hNut2	
MED11	Med11		Med21					HSPC296
MED12	Srb8	SpSrb8	Kto	TRAP230	ARC/DRIP240			
MED12L								TRALPUSH
MED13	Ssn2/Srb9	SpTrap240	Skd/Pap/Bli	TRAP240	ARC/DRIP250			
MED13L								PROSIT240
MED14	Rgr1	Pmc1/SpRgr1	Trap170	TRAP170	ARC/DRIP150	CRSP150	TRAP170	p110
MED15	Gal11	SpGal11	Arc105		ARC105		PCQAP	TIG-1
MED16	Sin4		Trap95	TRAP95	DRIP92		TRAP95	p96b
MED17	Srb4	SpSrb4	Trap80	TRAP80	ARC/DRIP77	CRSP77	TRAP80	p78
MED18	Srb5	Pmc6/Sep11	p28/CG14802					p28b
MED19	Rox3	SpRox3	CG5546					LCMR1
MED20	Srb2	SPAC17G8.05	Trfp	hTRFP			hTRFP	p28a
MED21	Srb7	SpSrb7	Trap19	hSrb7	hSrb7		hSrb7	p21
MED22	Srb6	SpSrb6	Med24					Surf5
MED23			Trap150b	TRAP150b	ARC/DRIP130	CRSP130	TRAP150b	hSur2
MED24			Trap100	TRAP100	ARC/DRIP100	CRSP100	TRAP100	
MED25			Arc92		ARC92			ACID1
MED26			Arc70		ARC70	CRSP70		
MED27		Pmc3	Trap37	TRAP37		CRSP34	TRAP37	
MED28			Med23					Fksg20
MED29			Intersex					Hintersex
MED30			Trap25	TRAP25				
MED31	Soh1	SpSoh1/Sep10	Trap18	hSoh1			hSoh1	
CDK8	Srb10/Ssn3/Ume5	SpSrb10	Cdk8	hSrb10	CDK8			
CycC	Srb11/Ssn8/Ume3	SpSrb11	CycC	hSrb11	CycC			

D'après Bourbon et al., (2004)

différentiation neuronale (Wang et al., 2006). Enfin, des souris invalidées pour les gènes *MED1* et *MED24* meurent à un stade précoce du développement et présentent de graves malformations (Ito et al., 2002; Ito et al., 2000). Chez l'homme, le Médiateur pourrait également jouer un rôle au cours de l'organogénèse, puisque des mutations de la protéine Med12 sont à l'origine du Syndrome de Opitz-Kaveggia (Risheg et al., 2007; Schwartz et al., 2007). Il s'agit d'une anomalie congénitale qui entraine de grave altération du développement.

D'autre part, le Médiateur intervient dans des processus physiologiques importants à l'échelle d'un organisme. Chez l'homme, l'interaction entre Med15 et SREBP (sterol regulatory element binding protein) intervient dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol et des lipides (Yang et al., 2006). Le Médiateur est également mis en jeu dans des perturbations du système nerveux central, puisque des patients sujets à des crises d'épilepsie chronique montrent une baisse du niveau d'expression de *MED1* (Li et al., 2006).

Enfin, le Médiateur est impliqué dans la différentiation et la prolifération cellulaire. Il intervient dans la différenciation des kératinocytes en interagissant directement avec le récepteur de la vitamine D (Hawker et al., 2007). La baisse du niveau d'expression de Med1 par ARN interférence entraine une hyper-prolifération des kératinocytes (Oda et al., 2007). Med1 joue également un rôle crucial dans la différentiation des myélomonocytes au cours de l'hématopoïèse (Urahama et al., 2005).

La prolifération cellulaire est à l'origine de nombreux cancers chez l'Homme. Le Médiateur qui est lié à ce processus, pourrait être impliqué dans ces maladies. Une étude récente réalisée sur le cancer de la prostate, montre que les gènes *MED1* et *MED17* sont surexprimés dans 50% des cellules cancéreuses testées. Cette étude révèle également que Med1 est très important dans la voie de signalisation en réponse à l'androgène. Enfin, elle montre par ARN interférence que la baisse du niveau d'expression de Med17 et de Med1, entraine une diminution de la prolifération cellulaire, inhibe le cycle cellulaire et augmente l'apoptose des cellules cancéreuses (Vijayvargia et al., 2007). Ces observations montrent que le Médiateur pourrait être une bonne cible thérapeutique pour luter contre certains cancers. Par exemple, l'inhibition à l'aide de petits peptides de l'association entre Med23 et la protéine Her2 qui est impliqué dans environ 30% des cancers du sein, entraine une très nette diminution de la prolifération et de la viabilité des cellules malignes (Asada et al., 2002).

IV.3 Mécanismes de la régulation de l'expression des gènes par le Médiateur

Le Médiateur a été identifié à partir d'un test biochimique grâce à sa propriété de stimulation de la transcription en réponse aux activateurs spécifiques (Kornberg, 2005). De nombreux cribles génétiques réalisés chez *S. cerevisiae* visant à découvrir des gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle ont identifiés des protéines du Médiateur comme Med14 (Rgr1), Med15 (Gal11) et Med16 (Sin4), (Bjorklund and Kim, 1996; Lohr et al., 1995). L'ensemble de ces données témoigne de l'importance du complexe dans la régulation de la transcription par Pol II.

IV.3.1 Interactions entre le Médiateur et les activateurs spécifiques

En aval des voies de signalisation cellulaire, la fixation des activateurs sur une région spécifique de l'ADN induit un signal de régulation positive de la transcription (Orphanides and Reinberg, 2002). Le Médiateur interagit directement avec ces activateurs pour transmettre le message à toute la machinerie de transcription afin de répondre à ce stimulus.

Les protéines régulatrices interagissent principalement avec le module de Queue du Médiateur chez *S. cerevisiae*. Les activateurs Gal4, Gcn4 et VP16 lient directement Med15, Gcn4 interagit également avec Med3 (Lee et al., 1999; Myers et al., 1999). Le module de Tête est néanmoins capable d'interagir *via* la sous-unité Med17 avec l'activateur Gal4 (Koh et al., 1998). Des expériences visant à abolir ces interactions en inactivant les gènes codant les sous-unités du module de Queue qui sont mises en jeu dans ces contacts, ont montré l'importance du module pour l'activation de la transcription, puisque le Médiateur devient alors incapable de stimuler la transcription *in vitro* (Myers et al., 1999). Des résultats similaires ont été obtenu avec la disruption de *MED14* qui isole le module de Queue du reste du Médiateur (Lee et al., 1999). Enfin, une mutation de Gal4 qui affecte spécifiquement son interaction avec Med17 réduit l'activation des gènes sous le contrôle d'un promoteur *GAL in vivo* (Koh et al., 1998).

Chez les mammifères, le complexe Médiateur a été purifié à l'aide de méthodes biochimiques variées en association avec de nombreux activateurs comme le récepteur à l'hormone thyroïdienne (Trα), le récepteur de la vitamine D (VRD), le « peroxysome proliferator-activated receptor γ » (PPARγ), le récepteur aux œstrogènes, le récepteur X au rétinoïde (RXR), le « hepatocyte nuclear factor 4 » (HNF4α), le domaine d'activation des

activateurs viraux VP16 et E1A, le « sterol response element binding protein » (SREBP), et la sous-unité p65 du facteur nucléaire NFκB, etc (Bjorklund and Gustafsson, 2004; Conaway et al., 2005b). La protéine Med1 est importante pour les interactions du Médiateur avec les récepteurs nucléaires. Le motif Leu-X-X-Leu-Leu (LxxLL) est essentiel pour ces contacts *in vitro* (Conaway et al., 2005b). Par ailleurs, des expériences d'ARN interférence ciblant Med1 ont démontré le rôle crucial du Médiateur animal et de son association aux activateurs, dans l'activation de la transcription. La baisse du niveau d'expression de Med1 entraine une diminution de l'activation du gène *CYP1A1* en réponse au TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) (Wang et al., 2004).

IV.3.2 Interactions entre le Médiateur et l'ARN polymérase II

Au cours de sa purification, le Médiateur peut être isolé sous forme libre ou associé à Pol II pour former l'holoenzyme (Kim et al., 1994). La quantité relative des deux formes varie d'une préparation à l'autre, mais il semble que le Médiateur soit majoritairement sous forme libre dans la cellule (Takagi et al., 2005). La caractérisation du Médiateur purifié a ensuite démontré que le complexe interagit avec le CTD *in vitro* (Myers et al., 1998). Plus précisément, les modules de Tête et de Milieu reconstitués sont capables d'interagir avec CTD (Kang et al., 2001). De même, le Médiateur purifié à partir de cellule murine interagit directement avec le CTD (Jiang et al., 1998). Enfin chez l'homme, la purification par affinité de plusieurs sous-unités et l'analyse par spectrométrie de masse des protéines, montre que les peptides de sous-unités de Pol II sont les seuls présents à l'exception de ceux du Médiateur (Sato et al., 2004).

Un modèle du complexe holoenzyme dépourvu du module Cdk8 a été obtenu par microscopie électronique à la résolution de 40 Å (Asturias et al., 1999) (Figure 15A). Il montre des interactions directes entre Pol II et les modules de Tête et de Milieu. Il n'est pas possible de distinguer les sous-unités du Médiateur impliquées dans ces interactions, par contre grâce à la structures cristallographiques de Pol II à 2,8 Å, l'identité de ses sous-unités en interaction avec le Médiateur ont été déterminées (Davis et al., 2002) (Figure 15B). Il s'agit de Rpb1, Rpb2, Rpb3, Rpb6, Rpb11 et Rpb12. Le modèle de l'holoenzyme montre que le Médiateur interagit sur une surface étendue à l'opposé du canal d'entrée de l'ADN et de la mâchoire. Cette organisation laisse une grande surface libre avec laquelle les facteurs généraux de la transcription peuvent interagir.

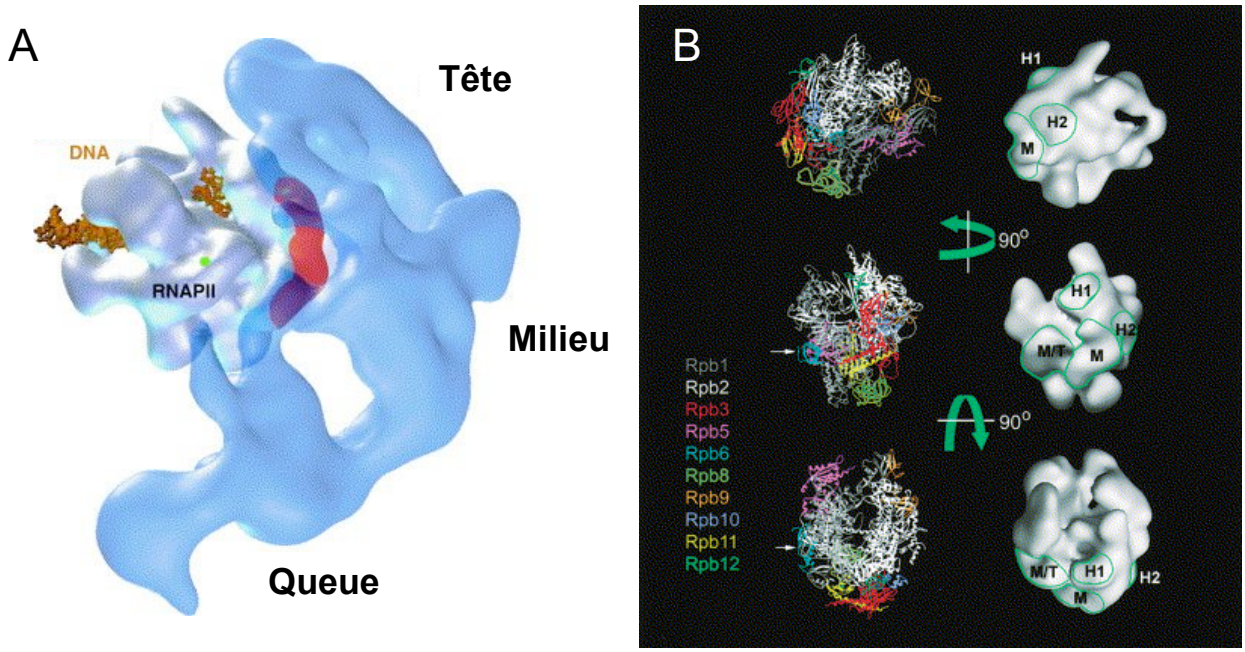


Figure 15: Modèle de microcopie électronique du complexe Médiateur/Pol II.
(A) Représentation de l'interaction entre la Pol II (sans Rpb4/7) et le Médiateur à partir des données de microscopie électronique. L'entrée de l'ADN (en orange) dans la Pol II n'est pas obstruée par la présence du Médiateur. La position du dernier résidu organisé du CTD est indiquée par un point vert. D'après (Chadick and Asturias, 2005).
(B). Représentation des régions de la Pol II en contact le Médiateur. La structure atomique de la Pol II a été glissée dans l'enveloppe de l'holoenzyme obtenue en microscopie électronique. Les régions en contact avec le Médiateur sont entourés en vert sur la carte de densité électronique à droite. Les sous-unités de la Pol II sont représentées dans la même orientation à gauche. Les régions du Médiateur impliquées dans les contacts sont étiquetées M/T pour Milieu/Queue, M pour Milieu, et H1 et H2 pour Tête. La position du CTD est indiquée par une flèche blanche. D'après Davis et al., (2002)

IV.3.3 Interaction entre le Médiateur et les facteurs généraux

Le Médiateur stimule *in vitro* la transcription basale et activée en présence des facteurs généraux de la transcription (Kim et al., 1994). Le Médiateur pourrait donc influencer la mise en place du complexe de préinitiation (PIC) par des interactions avec ces facteurs.

TFIID

La séquence d'assemblage du PIC déterminée à l'aide d'analyses biochimiques débute par la fixation de TFIID sur la molécule d'ADN (Ranish and Hahn, 1996). Des études réalisées à l'aide des complexes humains indiquent que le Médiateur peut intervenir dans cette fixation. Afin de tester l'effet synergique des deux complexes au cours de l'initiation de la transcription, des expériences ont été réalisées à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa dont le Médiateur et TFIID ont été épuisés à l'aide d'anticorps dirigés contre leurs composants (Baek et al., 2002). Ces expériences ont révélé un rôle conjoint des deux complexes qui favorisent chacun la fixation de l'autre. De plus, la préincubation de TFIID et du Médiateur permet une réponse à l'activateur Gal4-VP16 plus rapide et plus efficace (Johnson et al., 2002).

Ces données suggèrent que les deux complexes pourraient interagir physiquement. Des expériences réalisées à l'aide des modules de Tête et de Milieu reconstitués montrent que le Médiateur interagit avec la protéine TBP qui peut être - ou non - associée aux Tafs pour former le complexe TFIID (Kang et al., 2001). Un cristal associant Med8, Med18, Med20 et TBP à même été obtenu (Lariviere et al., 2006). Enfin, la kinase Cdk8 du Médiateur semble phosphoryler *in vivo*, la sous-unité Taf1 et Bdf1, une protéine associé à TFIID (Liu et al., 2004).

TFIIA

Le facteur TFIIA lie la structure formée par TFIID et l'ADN pour constituer le complexe DA. Il n'y a pas d'évidence d'interaction directe entre le Médiateur et TFIIA. Néanmoins, un complexe DA humain constitué *in vitro*, favorise le recrutement du Médiateur. Surtout, l'assemblage qui forme la superstructure DA-Médiateur (DAMed)

stimule la transcription aussi efficacement en présence ou en absence de l'activateur Gal4-VP16 (Johnson and Carey, 2003). DAMed est également suffisant pour constituer un PIC. Ceci suggère que l'association de TFIIA, TFIID et du Médiateur pourrait être une plateforme d'assemblage du PIC qui permettrait de promouvoir la transcription activée.

TFIIB

In vitro, TFIIB vient ensuite dans la séquence d'assemblage du PIC, il se fixe sur le complexe DA pour constituer la structure DAB. Les modules de Tête et de Milieu du Médiateur de *S. cerevisiae* reconstitués interagissent directement avec TFIIB (Kang et al., 2001). De plus, la structure du complexe TFIIB/Pol II a été résolue par cristallographie (Bushnell et al., 2004). Le mélange de l'image obtenue avec celle du complexe Médiateur/Pol II suggère que le Médiateur interagit avec TFIIB qui se glisse dans l'espace laissé libre (Asturias, 2004). Ces interactions pourraient favoriser le recrutement de TFIIB par le Médiateur. En effet, des expériences biochimiques réalisées sur les complexes humains montrent que le Médiateur stimule la transcription basale en facilitant l'incorporation de TFIIB au cours de l'assemblage du PIC, *in vitro* (Baek et al., 2006).

TFIIF

TFIIF interagit avec Pol II et lie le complexe DAB pendant l'assemblage du PIC (Ranish and Hahn, 1996). Au cours de la purification par affinité chez *S. cerevisiae*, Pol II se trouve associée soit au Médiateur, soit à TFIIF, mais aucune structure associant les trois complexes n'a pu être détectée (Rani et al., 2004). Néanmoins, une étude du module de Tête du Médiateur de levure, dévoile une interaction du module reconstitué avec le complexe TFIIF/Pol II (Takagi et al., 2006). Ces résultats sont cohérents avec les résultats de microscopie électronique. Un modèle du complexe formé par Pol II et TFIIF a été obtenu à la résolution de 16 Å (Chung et al., 2003). Il montre que TFIIF englobe une grande partie de la polymérase, cependant la surface d'interaction entre Pol II et le Médiateur reste libre. Surtout, un complexe TFIIF/Pol II/Médiateur reste possible d'un point de vue stérique (Takagi et al., 2006).

TFIIE

In vitro en absence de Médiateur, TFIIE est un des derniers facteurs à se fixer au promoteur. La sous-unité Med15 du module de Queue du Médiateur de *S. cerevisiae* interagit par « GST Pulldown » avec les domaines Carboxy-terminaux des deux sous-unités Tfa1 et Tfa2 du complexe TFIIE de levure (Sakurai et al., 1996). Des données génétiques s'ajoutent à ces interactions, puisqu'un double mutant tronqué des domaines carboxy-terminaux de *TFA1* et *TFA2* présente des phénotypes très proches de ceux observés avec une délétion de *MED15.* De plus, *MED15* est épistatique sur ce double mutant (Sakurai and Fukasawa, 1997). Il existerait également des contacts entre le module du Milieu du Médiateur reconstitué et la sous-unité Tfa2 (Kang et al., 2001). Toutes ces interactions découvertes au cours d'expériences *in vitro*, pourraient permettre au Médiateur d'activer la transcription en agissant directement sur TFIIE *via* ses modules de Queue et de Milieu. Cependant, TFIIE s'associe également avec la sous-unité Rpb9 de Pol II au niveau du canal d'entrée de l'ADN (Van Mullem et al., 2002). Ces données sont donc contradictoires puisque ce contact est très éloigné de la surface d'interaction de Pol II avec le Médiateur.

TFIIH

TFIIH est le dernier facteur à intervenir au cours de l'initiation *in vitro*. La caractérisation du Médiateur a montré qu'il était capable de stimuler l'activité kinase de TFIIH sur le CTD dans des systèmes *in vitro*, réalisés à l'aide d'extraits purifiés de levure et de cellules de souris (Jiang et al., 1998; Kim et al., 1994). Deux études plus récentes ont montré que le sous-module de CAK/TFIIK qui porte l'activité kinase de TFIIH est suffisant pour cette stimulation (Guidi et al., 2004; Nair et al., 2005). Enfin, chez la levure, TFIIH phosphorylerait les sous-unités du module du Milieu du Médiateur Med4 et Med14 par l'intermédiaire de Kin28 (Guidi et al., 2004; Liu et al., 2004).

IV.3.4 Etudes du recrutement du Médiateur sur l'ADN *in vivo*

L'ordre d'arrivée des complexes impliqués dans l'initiation de la transcription a été largement étudié *in vitro*. Des études de biochimie ont permis d'établir une séquence de fixation des facteurs généraux pour former le PIC (Ranish and Hahn, 1996). Cependant, l'ensemble des données ainsi collectées ne tenait pas compte des coactivateurs et des

protéines régulatrices. La technique de ChIP (Kuras, 2004) a permis d'étudier la mise en place du PIC *in vivo*.

L'étude du gène inductible *GAL1* a montré que le Médiateur lie l'UAS indépendamment des facteurs généraux de la transcription (Kuras et al., 2003). L'analyse cinétique de la fixation des complexes d'initiation au promoteur du gène *GAL1*, a montré que SAGA fixe en premier le promoteur, puis le Médiateur arrive et enfin TFIIE, TFIIH et Pol II viennent se lier (Bryant and Ptashne, 2003). Chez la drosophile, le Médiateur lie également le promoteur des gènes régulés par le facteur de transcription HSF de réponse au choc thermique avant Pol II (Park et al., 2001). L'ensemble de ces données montre que le Médiateur fixe les régions régulatrices en amont des gènes à transcrire et qu'il est recruté avant la machinerie de transcription.

Enfin le Médiateur a fait l'objet d'études de génomique fonctionnelle. La fixation du complexe à été étudiée par « ChIP on ChIP » sur l'ensemble des génomes de *S. cerevisiae* et de *Schizosaccharomyces pombe* (Andrau et al., 2006; Zhu et al., 2006). Il apparaît que le Médiateur se fixe principalement sur les régions UAS, mais il occupe également d'autres régions de l'ADN comme les ORFs. Par ailleurs, les modules de Tête, de Milieu et de Queue présentent les mêmes profils d'occupation suggérant que le Médiateur pourrait être recruté comme une seule entité (Andrau et al., 2006). Enfin, ces études ont également confirmé l'existence de deux formes du Médiateur avec ou sans le module Cdk8 (Andrau et al., 2006).

IV.3.5 Le Médiateur et les autres coactivateurs

En plus des contacts établis avec les facteurs généraux, le Médiateur crée des liens avec d'autres coactivateurs. De nombreux systèmes inductibles ont été utilisés pour analyser par ChIP les effets des coactivateurs sur leurs recrutements respectifs.

Chez les Mammifères

Il y a peu d'exemples de mécanismes de régulation de la transcription médiés par les coactivateurs chez les eucaryotes pluricellulaires. Néanmoins, le coactivateur PGC-1α (PPARγ co-activator-1α) qui est un régulateur métabolique (Puigserver and Spiegelman, 2003) agit sur la structure chromatinienne en acétylant les histones. Il permet ainsi le

recrutement de la protéine p300 qui facilite ensuite le recrutement du Médiateur (Wallberg et al., 2003).

Chez *S. cerevisiae*

Différentes études révèlent la diversité des mécanismes de régulation de la transcription par les coactivateurs. Le gène HO est un gène régulé au cours du cycle cellulaire. Son promoteur est lié successivement par les acteurs du PIC au cours du cycle de division de *S. cerevisiae*. Le coactivateur SWI/SNF lie en premier le promoteur. Il facilite ensuite le recrutement de SAGA qui va permettre l'association de l'activateur SBF sur le promoteur. Le Médiateur va ensuite être recruté directement par SBF (Bhoite et al., 2001; Cosma et al., 2001; Cosma et al., 1999).

L'activation de la transcription des gènes inductibles *ARG* requiert la fixation de l'activateur Gcn4 et l'intervention des quatre coactivateurs : RSC, SWI/SNF, SAGA et le Médiateur (Govind et al., 2005; Qiu et al., 2005; Yoon et al., 2003). Les recrutements de ces 4 complexes sont interdépendants et sont requis pour la mise en place du PIC au promoteur du gène (Govind et al., 2005).

L'activateur Met4 contrôle un réseau de gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés soufrés (Methionine et cystéine) (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997). La fixation de Met4 va permettre les recrutements indépendants du Médiateur et de SAGA (Leroy et al., 2006). Les coactivateurs vont ensuite favoriser la transcription en agissant sur la mise en place du PIC ou en modifiant la structure chromatinienne.

L'expression des gènes *GAL* peut être induite par l'apport de galactose dans un milieu qui en est dépourvu. Ce système a été largement utilisé pour étudier l'initiation de la transcription. Une analyse cinétique a montré que SAGA fixait le promoteur avant le Médiateur au cours de l'induction du gène *GAL1* (Bryant and Ptashne, 2003). De plus, des mutants de SAGA ont révélé que le recrutement du Médiateur était dépendant de la fixation du coactivateur alors que celui de SAGA n'est dépendant que de la fixation de l'activateur Gal4 (Bhaumik et al., 2004). De façon contradictoire, l'association artificielle du Médiateur au promoteur favorise celles de SAGA et SWI/SNF. De surcroit, le recrutement de SWI/SNF est dépendant de celui du Médiateur (Lemieux and Gaudreau, 2004). Cependant, dans ce système, l'association artificielle du Médiateur pourrait également favoriser la ré-initiation de la transcription.

IV.3.6 Le Médiateur, une plateforme pour la réinitiation

Le groupe de Steve Hahn a développé un système transcription sur matrice d'ADN immobilisée qui permet d'étudier la première initiation et la réinitiation de la transcription *in vitro* (Yudkovsky et al., 2000a). Le complexe de préinitiation est formé à partir d'extraits nucléaires de *S. cerevisiae* sur un promoteur lié à des billes de sépharose. L'ajout de nucléotides au système pendant deux minutes permet de suivre un seul cycle de transcription. Après lavage, le promoteur peut être séparé des billes grâce à un site de restriction, afin de permettre l'analyse de la composition du complexe de préinitiation. Dans ce système, Pol II n'est pas retrouvé puisqu'elle est partie en élongation et les facteurs TFIIB et TFIIF se désolidarisent du promoteur. TFIIA, TFIID, TFIIH, TFIIE et le Médiateur restent associés à la matrice (Yudkovsky et al., 2000b). Pour observer de nouveaux cycles de transcription, des extraits nucléaires sont ajoutés. Lorsque les extraits sont préparés à partir de souches mutées dans des sous-unités essentielles des facteurs restés sur la matrice, on observe toujours de la réinitiation. Les résultats de ces expériences suggèrent qu'ils forment un échafaudage pour la réinitiation de la transcription. Cette plateforme permettrait d'accélérer l'étape de formation du PIC et donc d'atteindre des niveaux de transcription plus importants. Deux mutants du Médiateur, *Δ-med3* et *Δ-med16*, affectent ce processus. Ils déstabilisent l'association du Médiateur avec Pol II et n'entrainent pas de défaut pour le premier cycle de transcription mais diminuent le niveau de transcription au cours des cycles suivants (Reeves and Hahn, 2003).

IV.3.7 Activité de modification des histones du Médiateur

Les activités d'acétylation des histones portées par de nombreux coactivateurs jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de régulation de l'expression génétique. De telles modifications sont souvent associées à la fluidification de la chromatine et favoriseraient la transcription (Li et al., 2007). Des expériences de mobilité sur gel ont montré que le Médiateur de levure peut se lier au nucléosome. Il est également capable d'acétyler les histones H3 et H4 (Lorch et al., 2000). La sous-unité Med5 du module de Queue du Médiateur est un membre de la super-famille des acétyltransferases proches de la protéine Gcn5. Med5 porte l'activité acétyltransférase du Médiateur (Lorch et al., 2000). Cependant l'importance de celle-ci dans la transcription n'est pas encore connue.

IV.3.8 Régulation négative de la transcription par le Médiateur

Une étude des profils d'expression des gènes de *S. cerevisiae* réalisée avec des mutants des sous-unités non essentielles du Médiateur, indique un rôle négatif du complexe dans la régulation de la transcription (van de Peppel et al., 2005). Si le module Cdk8 semble particulièrement impliqué dans ce mécanisme, l'ensemble du Médiateur pourrait y participer (Bjorklund and Gustafsson, 2005).

Régulation négative par le module Cdk8

La kinase du module Cdk8 semble être un acteur important dans la répression de la transcription. En effet, la délétion de sous-unités du module mène à l'augmentation de l'expression de nombreux gènes chez *S. cerevisiae* (Hengartner et al., 1998b; Holstege et al., 1998; van de Peppel et al., 2005). Le mécanisme d'inhibition de la transcription des gènes par la forme du Médiateur comprenant le module Cdk8 n'est pas encore complètement élucidé. Néanmoins, la kinase Cdk8 est capable de phosphoryler les sérines 2 et 5 du CTD (Borggrefe et al., 2002). Ce profil de phosphorylation au promoteur entrainerait une inhibition de la transcription par Pol II (Hengartner et al., 1998b). De plus, chez les mammifères, il a été montré que Cdk8 est capable d'inhiber l'activité de TFIIH au cours de l'initiation de la transcription, en phosphorylant directement la Cycline H (Akoulitchev et al., 2000). Enfin, le module Cdk8 est capable d'inhiber l'activité de stimulation de la transcription du Médiateur en phosphorylant directement la sous-unité du module de Queue, Med2 (Hallberg et al., 2004; van de Peppel et al., 2005). Ainsi, Cdk8 inhibe trois acteurs essentiels de l'initiation de la transcription en phosphorylant le Médiateur lui-même, le complexe TFIIH et le CTD de Pol II.

Liens du Médiateur avec les represseurs

Chez la levure, le complexe répresseur Tup1-Ssn6 est recruté sur le promoteur par des protéines qui lient des séquences spécifiques de l'ADN. Grâce à l'interaction entre Tup1 et Cdk8, ce complexe recrute le Médiateur qui transmet le message d'inhibition *via* le module Cdk8 (Zaman et al., 2001). Ce modèle est étayé par les études réalisées chez les eucaryotes pluricellulaires. En effet, le facteur de transcription C/EBPβ (CCAAT/Enhancer-Binding protein β) passe de l'état de répresseur à celui d'activateur lorsqu'il est phosphorylé par l'oncoprotéine Ras. Il agit sur l'expression des gènes *via* le complexe Médiateur : il recrute le

Médiateur dépourvu de module Cdk8 pour activer la transcription, et le Médiateur associé au module Cdk8 pour la réprimer (Mo et al., 2004). Le facteur de transcription pourrait ainsi interférer sur le niveau d'expression des gènes, en agissant sur la stabilité de l'association du module Cdk8 avec le reste du Médiateur. D'ailleurs, l'analyse du recrutement du Médiateur par ChIP séquentiel (reChIP) chez *S. cerevisiae* montre l'existence de deux Médiateurs avec ou sans le module Cdk8 (Andrau et al., 2006). Enfin, une analyse par microscopie électronique et par Co-immunoprécipitation de protéine chez *S. pombe* révèle que l'association du module Cdk8 avec le reste du Médiateur inhiberait stériquement l'interaction du complexe avec Pol II (Elmlund et al., 2006)

L'ensemble de ces données montre que le module Cdk8 est important pour la régulation négative de la transcription par le Médiateur. Cependant, le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé. Par ailleurs, le module peut également activer la transcription de certains gènes (van de Peppel et al., 2005). Dans les modèles aujourd'hui proposés il est difficile d'expliquer cette observation.

IV.3.9 Le Médiateur : un facteur général de la transcription

Les facteurs généraux sont définis par leur capacité d'induire une transcription basale de Pol II, *in vitro* (Ranish and Hahn, 1996). En présence de ces facteurs, le Médiateur permet d'augmenter très fortement le niveau de la transcription basale rendant ainsi le système plus proche de la réalité physiologique (Kim et al., 1994; Takagi and Kornberg, 2006). C'est pourquoi, il doit être défini comme un facteur général de la transcription (Takagi and Kornberg, 2006). De plus, le Médiateur est essentiel à la régulation de la transcription par les activateurs spécifiques (Kim et al., 1994; Takagi and Kornberg, 2006). *In vivo*, des études d'analyse de transcriptome par puce à ADN réalisée à l'aide de mutants thermosensibles montrent, qu'à l'instar de Pol II et TFIIH, le Médiateur contrôle la transcription de la quasi-totalité des gènes de *S. cerevisiae* (Holstege et al., 1998).

Le mécanisme d'action du Médiateur reste cependant mal connu. Deux études montrent sans pouvoir le définir, qu'il est essentiel à la mise en place du PIC (Bhaumik et al., 2004; Qiu et al., 2004). Il reste donc encore beaucoup de choses à apprendre sur ce complexe. Une carte d'interaction génétique réalisé chez *S. cerevisiae* à l'aide de 743 mutants, montre que le module de Queue est lié génétiquement aux activateurs, que le module du Milieu est lié au facteur d'élongation TFIIS et que le module de Tête est lié à TFIIF, TFIIH et à Pol II (Collins et al., 2007) (figure 15). Si les interactions du Médiateur avec TFIIF et Pol II et si le

lien entre le module de Queue et les activateurs, sont bien décris (Bjorklund and Gustafsson, 2005; Kim and Lis, 2005; Malik and Roeder, 2005; Takagi et al., 2006), la signification des liens entre le Médiateur et TFIIS ou TFIIH reste à déterminer.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux interactions entre le Médiateur et le facteur d'élongation TFIIS et à celles entre le Médiateur et le facteur général TFIIH. Nous voulions ainsi pouvoir comprendre son rôle dans la mise en place du PIC et comment le Médiateur pouvait influencer la phosphorylation du CTD par TFIIH.

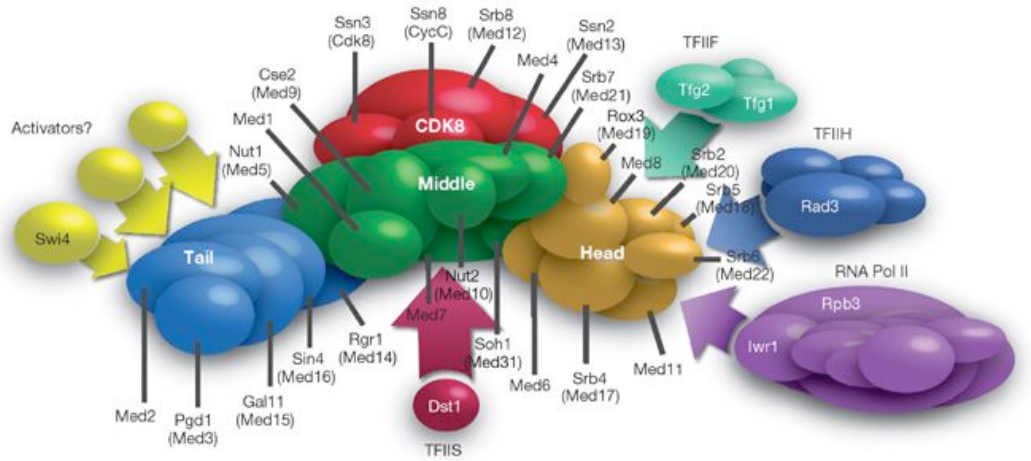


Figure 16: Carte d'interactions génétiques du Médiateur chez *S. cerevisiae*.
Carte des interactions fonctionnelles entre les modules du Médiateur et les intervenants de la transcription établie à partir d'une analyse bioinformatique qui regroupe les profils d'interactions génétique réalisés à l'aide de 743 gènes chez *S. cerevisiae*. D'après Collins et al., (2007).

RESULTATS ET DISCUSSION

I Rôle du Médiateur et de TFIIS dans l'étape d'initiation

I.1 Contexte du travail

De nombreux facteurs sont requis pour la synthèse des ARN de classe II. A l'exception de Pol II et du facteur TFIIF, les étapes d'initiation et d'élongation nécessitent des complexes différents. Néanmoins, des données génétiques suggèrent que deux autres protéines pourraient être également impliquées dans les deux processus, Med31 et TFIIS (Fan et al., 1996; Malagon et al., 2004).

Med31 est une sous-unité du module du Milieu du Médiateur (Bourbon et al., 2004; Guglielmi et al., 2004; Linder and Gustafsson, 2004). C'est une protéine qui n'est pas essentielle chez la levure bien que ce soit la protéine la mieux conservée du complexe. *MED31* a été initialement identifiée comme un suppresseur du phénotype de recombinaison engendré par la délétion de *HPR1*, qui code pour un des composants du complexe d'élongation THO/TREX (Chavez et al., 2000; Piruat and Aguilera, 1998; Prado et al., 1997). La délétion de *MED31* est colétale avec la délétion du gène *DST1* qui code pour le facteur d'élongation TFIIS, et avec celle du gène *SET2* qui code une histone métyltransferase nécessaire à la progression de Pol II au cours de l'élongation (Krogan et al., 2003; Malagon et al., 2004). L'ensemble de ces données suggèrent donc un rôle de Med31 au cours de l'étape d'élongation. Cependant, en tant que sous-unité du Médiateur, Med31 semblerait plutôt être impliquée dans l'initiation de la transcription. L'inactivation du gène *MED31* est de surcroit colétale avec celles des gènes *RPB1*, *RPB2* et *SUA7* qui codent pour des sous-unités de Pol II et pour le facteur général TFIIB (Fan et al., 1996). Néanmoins, les études de génomique fonctionnelle visant à étudier l'occupation du Médiateur par ChIP on chip chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, ont montré que le Médiateur pouvait se trouver sur les promoteurs et la phase codante de certains gènes (Andrau et al., 2006; Zhu et al., 2006). Tous ces résultats indiquent que Med31 pourrait jouer un rôle dans les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription par Pol II.

TFIIS est un facteur d'élongation très bien caractérisé. Il permet de stimuler l'activité de clivage de Pol II qui est nécessaire à la réactivation de l'enzyme après un blocage devant un obstacle (Fish and Kane, 2002; Gu et al., 1993; Rudd et al., 1994; Wang and Hawley, 1993). Néanmoins, ce facteur pourrait également jouer un rôle au cours de l'initiation. En

effet, le domaine I de TFIIS interagit avec Spt8 et Med13 des unités de SAGA et du Médiateur (Wery et al., 2004). Ces deux complexes sont des coactivateurs qui sont mis en jeu au cours de l'étape d'initiation. De plus, une étude montre par ChIP que TFIIS est recruté sur le promoteur de plusieurs gènes inductibles (*GAL1*, *ARG1* et *AHP1*) et de plusieurs gènes constitutifs (*TEF1*, *PDC1*, et *PMA1*) (Prather et al., 2005). Il peut être recruté au promoteur du gène *GAL1* indépendamment de l'ARN polymérase et permet une induction efficace de *GAL1* en favorisant le recrutement de Pol II (Prather et al., 2005). Chez *S. cerevisiae*, l'inactivation du gène *DST1* qui code le facteur est colétale avec celle de *MED31* qui code une sous-unité du Médiateur. Cette colétalité peut être supprimée par la surexpression de protéines impliquées dans l'initiation comme Sua7 (TFIIB) et Med15 (Médiateur) (Malagon et al., 2004). Enfin, une étude à grande échelle d'interaction génétique suggère un lien entre le module du Milieu du Médiateur et TFIIS (Collins et al., 2007).

Afin de définir le lien entre le Médiateur et TFIIS, et de déterminer les activités de TFIIS qui sont mises en jeu dans cette interaction génétique, nous avons analysé la colétalité entre *DST1* et *MED31*. De façon surprenante, nous avons constaté que le domaine II et le linker de TFIIS complémente la double délétion de *DST1* et *MED31* (*dst1-Δ med31-Δ*). Le domaine I et le domaine III qui contient le motif RSADE, nécessaire à la stimulation de l'activité de clivage des ARN, ne sont pas requis en absence de *MED31* et *DST1*. De plus, nous avons remarqué que dans le contexte génétique *med31-Δ*, la mutation *dst1-R200A* entraine un phénotype de thermosensibilité. *In vitro*, ce mutant est affecté dans l'association de TFIIS avec Pol II (Awrey et al., 1998). Ceci suggère que cette propriété soit importante dans l'interaction génétique entre TFIIS et le Médiateur. Néanmoins, l'analyse de la croissance du mutant *dst1-R200A* sur mycophénolate (MPA), suggère qu'il ne soit pas affecté dans l'étape d'élongation. Nous avons donc fait l'hypothèse que TFIIS puisse jouer un rôle au cours de l'initiation de la transcription indépendamment de l'activité de stimulation du clivage des ARN. Nous avons alors étudié par ChIP, l'association de TFIIS sur les promoteurs et les ORF de gènes dont le niveau d'expression est affecté sur puce à ADN dans le contexte *med31-Δ dst1-R200A*. En accord avec un rôle au cours de l'initiation, nous avons remarqué que TFIIS occupe le promoteur de ces gènes. Nous avons ensuite montré que le recrutement de TFIIS est indépendant de celui de Pol II. De plus, TFIIS semble contribuer au recrutement de Pol II puisque l'occupation de l'ARN polymérase II diminue dans le mutant *med31-Δ dst1-R200A*. L'ensemble de ces données nous permet de proposer un nouveau rôle de TFIIS au cours de l'étape d'initiation de la transcription où TFIIS *via* son interaction avec

Rpb1, joue un rôle conjoint avec le Médiateur dans le recrutement au promoteur de l'ARN polymérase II.

Enfin, une étude biochimique du facteur TFIIS soumise en même temps que la notre, montre également que TFIIS fait partie du PIC, et qu'il en influence la formation et l'activité de façon indépendante de son domaine III, *in vitro* (Kim et al., 2007). De plus, cette étude suggère un rôle du Médiateur et de SAGA dans le recrutement de TFIIS (Kim et al., 2007).

I.2 Article 1

TFIIS elongation factor and Mediator act in conjunction during transcription initiation *in vivo*.

Benjamin GUGLIELMI*,[1], Julie SOUTOURINA*, Cyril ESNAULT and Michel WERNER[@]

CEA, iBiTecS, Bâtiment 144, CEA/Saclay, Gif-sur-Yvette Cedex, F-91191, France.

[1]Present address: Molecular and Cell Biology Department, 16 Barker Hall, 94720-3204, Berkeley, CA , USA

*These authors contributed equally to this work.

Running title : TFIIS and Med31 role in transcription initiation.

[@]Corresponding author:

Telephone: 33-(0)1 69 08 93 42

FAX: 33-(0)1 69 08 47 12

E-mail: michel.werner@cea.fr

Classification: Biological Sciences - Biochemistry

Character count: 44535 including the Figures

Abstract: 119 words

Keywords: Mediator; TFIIS; RNA polymerase II; Transcription regulation; *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

The transcription initiation and elongation steps of protein coding genes usually rely on unrelated protein complexes. However the TFIIS elongation factor is implicated in both processes. We found that in the absence of the Med31 Mediator subunit, yeast cells required the TFIIS Pol II-binding domain, but not its RNA cleavage stimulatory activity that is associated with its elongation function. We also found that the TFIIS Pol II-interacting domain was needed for the full recruitment of Pol II to several promoters in the absence of Med31. This work demonstrated that, in addition to its thoroughly characterized role in transcription elongation, TFIIS is implicated through its Pol II-binding domain in the formation or stabilization of the transcription initiation complex *in vivo*.

Introduction

Transcription of protein coding eukaryotic genes by RNA polymerase II requires three successive steps, initiation, elongation, and termination. Transcription initiation of class-II genes involves the binding of activators to regulatory sequences, the recruitment of RNA polymerase II (Pol II) to core promoter via interactions with activators, coactivators and general transcription factors (GTFs) and the initiation reaction *per se* with the DNA strands opening and abortive initiation (1). A major coactivator target of transcriptional activators is the Mediator (2, 3). One of its activities is the recruitment and/or stabilization of Pol II at core promoters (4). After transcription initiation, Pol II enters elongation, during which it can be arrested due to the presence of specific DNA sequences that promote pausing or because of obstacles such as DNA damage or bound proteins. To avoid or escape arrest, Pol II requires different elongation factors including TFIIS (5). Evidence suggests that TFIIS could be implicated in both initiation and elongation.

In vitro, TFIIS can reactivate arrested elongation complexes by stimulating endonucleolytic cleavage by Pol II of the nascent RNA (5). TFIIS is composed of three domains that fold independently as demonstrated by NMR analysis of its structure (6, 7). The cleavage stimulating activity minimally requires the C-terminal two thirds of the protein, that is its domain II and III separated by a 15 amino acid linker (7, 8). Domain II forms a three-helix bundle followed by three short helices, with a basic patch on the third helix (α-3) that is essential for TFIIS binding to Pol II (7). Crystallographic analysis of a TFIIS-Pol II complex confirmed that this basic patch lies at the TFIIS-Pol II interface (7, 8). TFIIS binding to Pol II is required for domain III to reach the Pol II active site. Domain III forms a Zinc ribbon that contains a conserved RSADE motif, responsible for the stimulation of RNA cleavage (7, 8).

TFIIS is also implicated in transcription initation. First, the deletion of the *DST1* gene, encoding TFIIS in yeast, is colethal with the deletion of the gene encoding the Med31 subunit of the Mediator complex (9). Second, TFIIS is recruited to the promoter of *GAL1* and the deletion of *DST1* reduces the recruitment of the transcription machinery on the promoter of *GAL1* (10). However, the reported experiments did not investigate the generality of the TFIIS requirement in transcription initiation, neither what are TFIIS elements required for this function.

Here, we analysed more precisely which activity of TFIIS was responsible for the colethality of *dst1-Δ* with *med31-Δ*. Remarkably, mutants of TFIIS impaired in its cleavage stimulatory activity could grow in a *MED31* deleted strain. In line with these observations, domain II and the linker together, i.e. the Rpb1-interacting domain of TFIIS, were sufficient to rescue *dst1-Δ med31-Δ* colethality. We thus hypothesised that TFIIS could play a role in transcription initiation independent of its cleavage activity. We demonstrated that TFIIS is recruited at *ADH1*, *VTC3* and *MET17* promoters, and that the Pol II binding activity of TFIIS was required for efficient recruitment of Pol II to these promoters *in vivo* in the absence of *MED31*. These data fit nicely with those obtained by Ranish and colleagues indicating that, *in vitro*, TFIIS contributes to the formation of the Pol II preinitiation complexes independently of its role in elongation (see accompanying manuscript). Thus, we propose that TFIIS is required for optimal occupancy of Pol II at promoters of a subset of *S. cerevisiae* genes.

Results

TFIIS domain II and linker are sufficient to complement dst1-Δ med31-Δcolethality

Since TFIIS is composed of three domains that fold independently (6-8), we designed truncation mutants of TFIIS, using its structure as a guide (Figure 1A, and B left column), to find which parts of the protein are required for complementation of the *dst1-Δ med31-Δ* colethality. These truncation mutants were transformed in a strain deleted for both *MED31* and *DST1*, complemented by the *MED31* gene on a *URA3* centromeric plasmid. The various mutant strains were then tested for sensitivity to mycophenolic acid (MPA) or for growth on 5-fluoro-oroatic acid (5FOA). MPA is an inhibitor of guanine nucleotide biosynthesis. Transcriptional elongation defects due to the loss of TFIIS cleavage activity prevents growth on MPA (11), while the absence of growth on 5FOA revealed colethality of the *dst1* truncation mutation with *med31-Δ*. The second line of Figure 1B confirms that deletion of the entire *DST1* gene is lethal in the *med31-Δ* context. We found that TFIIS capacity to stimulate the hydrolytic activity of Pol II was dispensable in the *med31-Δ* context, since complete truncation of amino acids (aa) 266-309 of TFIIS domain III did not lead to lethality (Figure 1B line 3), but renders the strain sensitive to MPA. Conversely, domain III alone was not sufficient to render the strain viable (Figure 1B line 4). This observation confirms that TFIIS cleavage activity is dispensable to complement *dst1-Δ med31-Δ* colethality.

We thus investigated the requirement for TFIIS domains I and II in this assay. The deletion of TFIIS domain I (aa 1-132) did not lead to MPA sensitivity or to colethality (Figure 1B line 5). Accordingly, the domain I alone was unable to complement either phenotype (Figure 1B line 6). However, domain II and the following linker were sufficient to restore growth in the double deleted strain (Figure 1B line 7), but were unable to restore

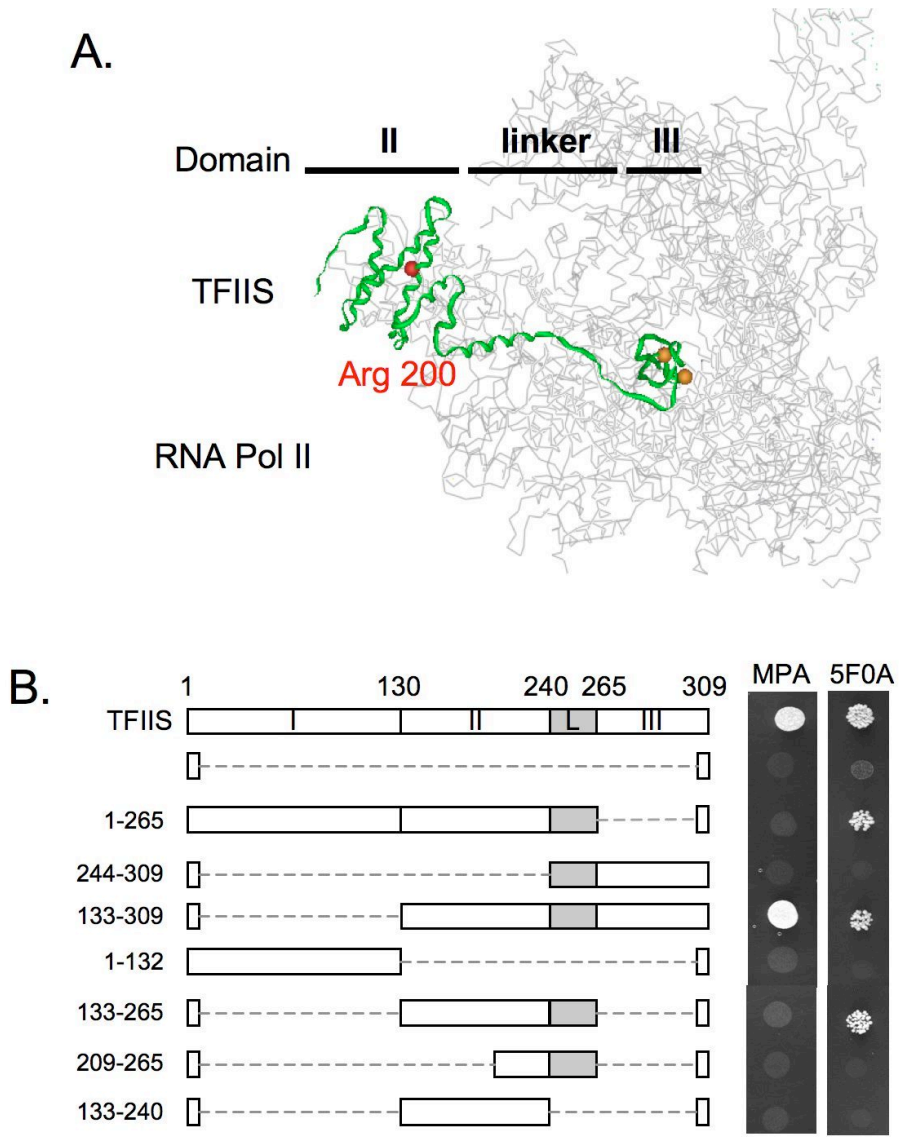


Figure 1: The cleavage activity and the N-terminus of TFIIS are not necessary to complement the colethality of *dst1-Δ* with *med31-Δ*.

A. Molecular structure of TFIIS-RNA polymerase II complex (8). TFIIS is indicated in green and Pol II in grey. The position of the R200A mutated residue used in this study appears as a red ball. Orange balls outline residues essential for TFIIS cleavage activity. Black bars indicate TFIIS domains. Domain I is not represented since its structure was not solved in the complex with Pol II. **B.** Test of *DST1* truncation mutant growth on MPA and 5FOA medium at 30°C. Left panel: schematic representation of TFIIS deletion mutants used relative to the wild-type protein. The amino acid positions bordering the fragments are indicated on the left.

resistance to MPA. This minimal domain, named TFIIS-(133-265), could not be shortened further (Figure
1B line 8, 9). In conclusion, the minimal sequence needed to complement *dst1-Δ med31-Δ* colethality consisted of domain II and the linker to domain III.

The TFIIS-R200A domain II mutant could not complement dst1-Δ med31-Δ colethality and was not impaired in elongation.

We found the TFIIS domain II plus linker to be required for complementation of the *dst1-Δ med31-Δ* colethality. Since the only previously known function of TFIIS domain II is Pol II binding *in vitro* through an interaction with Rpb1, we investigated the role of this function for the *dst1-Δ med31-Δ* complementation. Structural and biochemical data suggest that a basic patch of TFIIS domain II is essential for Pol II binding (7, 8). We mutated the arginine 200 residue of the TFIIS basic patch to an alanine (*dst1-R200A*) and investigated its effect on complementation of the *dst1-Δ med31-Δ* colethal phenotype. As shown in the upper panel of Figure 2A, the *dst1-R200A med31-Δ* double mutant strain grew as well as the *DST1 med31-Δ* strain at 30°C. However, when grown at 37°C, the *dst1-R200A* mutant was colethal with *med31-Δ*, while wild-type *DST1* and *dst1-(133-265)*, remained fully viable. This observation suggested that the the Pol II-binding function of TFIIS is essential in the *med31-Δ* context.

Reciprocally, we tested whether *dst1-R200A* mutation decreased TFIIS transcription elongation activity. At 37°C, wild-type yeast strains are killed by lower MPA concentrations than those required to hamper growth at 30°C. We plated the *dst1-R200A* mutant strain on complete synthetic medium with 1 μg/ml MPA at 37°C (Figure 2B). Contrary to the *dst1-Δ* strain, *dst1-R200A* grew as well as the *DST1* wild-type strain, indicating that *dst1-R200A* was not defective in TFIIS transcription elongation activity.

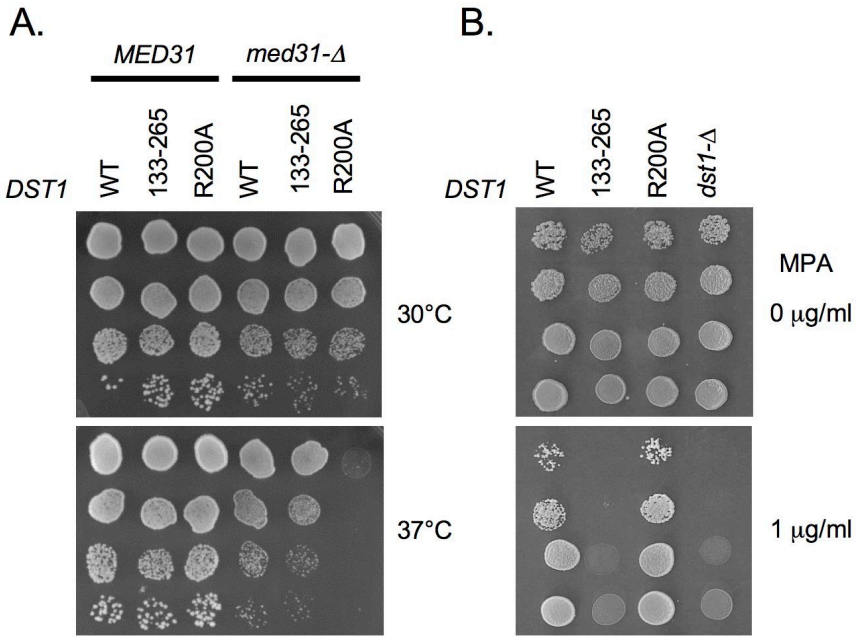


Figure 2: The TFIIS-R200A mutation hampers complementation of *dst1* colethality with *med31*, but not sensitivity to MPA.

A. Growth of *dst1-(133-265)* and *dst1-R200A* mutated strains relative to wild-type *DST1* in *MED31* or *med31-Δ* context. Suspensions of the strains were serially diluted, spotted on glucose rich medium (YPD) and grown at 30°C or 37°C for two days. **B.** Sensitivity to MPA of *dst1-(133-265)* and *dst1-R200A* strains compared to wild-type strain. Suspensions of the strains were serially diluted, spotted on synthetic complete medium and grown at 37°C in the presence or absence of mycophenolate for six days.

Requirement of R200 residue of TFIIS and Med31 for Pol II recruitment at a subset of yeast promoters.

In order to find genes affected in their transcription in the *dst1-R200A* context, we turned to global transcriptome analysis. *DST1 med31-Δ* and *dst1-R200A med31-Δ* cells were cultured at 30°C in YPD glucose rich medium in exponential growth phase, then half of the culture was shifted to 37°C for 30 minutes. mRNAs were analyzed using DNA micro-arrays as previously described (12). Ninety-two genes were expressed at least two fold less in the *dst1-R200A med31-Δ* strain compared to the *DST1 med31-Δ* strain when grown at 30°C, and 82 genes were less expressed in the *dst1-R200A med31-Δ* strain compared to the *DST1 med31-Δ* strain at 37°C (Supplementary Table 2). Shifting cells to 37°C increased only slightly the gene expression defect in the *dst1-R200A med31-Δ* strain. At 37°C, the transcription of 18 genes increased two-fold or more in the mutant compared to the wild-type. The maximum induction was only 3.3 fold for *BIK1* gene. Since the number of genes that were induced and the magnitude of the effect on mRNA levels was rather low, we did not investigate the significance of this observation further.

We analyzed more thoroughly three genes that were affected in the *dst1-R200A med31-Δ* strain: *ADH1*, *MET17* and *VTC3*. We measured by RT-PCR the mRNA quantities in *dst1-R200A med31-Δ* at 30°C and 37°C. We found that mRNA levels decreased 1.5 and 2.5 fold for *ADH1* at the permissive and restrictive temperature respectively, 2.1 and 3.8 fold for *MET17* and, 2.4 and 2.3 fold for *VTC3* in good agreement with the micro-array data.

TFIIS is recruited to the promoter of ADH1, MET17 and VTC3.

We looked for TFIIS recruitment on these genes through chromatin immunoprecipitation (ChIP). We used an N-terminal HA tagged version of TFIIS, the fusion being expressed from the chromosome (a gift from M. Wery and P. Thuriaux). Primer pairs

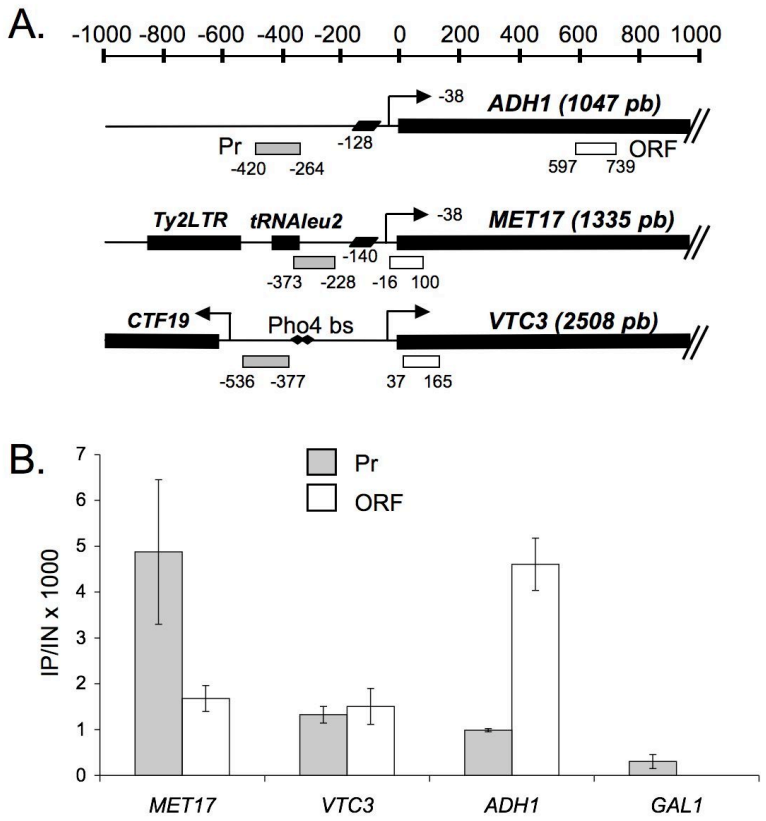


Figure 3: TFIIS is recruited to the promoter and coding sequence of three different genes.

A. Schematic promoter and coding region organization of *ADH1*, *MET17* and *VTC3* showing the location of primer pairs used in ChIP analysis. Scale is of 200 base pairs for one graduation. A promoter specific primer pair (labelled Pr) and an ORF specific primer pair (labelled ORF) are used for each gene. The location of the major transcription start site (TSS) relative to ATG of genes is indicated in base pairs. TSS are located at -61, -49, -43, -38, -33, -31, -20 and -12 for *ADH1*, at -52, -43, -40 and -38 for *MET17* (32). Their position is unknown for *VTC3*. Diamonds indicate activator-binding sequences (taken from *Saccharomyces* Genome Database). Small parallelograms indicate the position of the TATA box (33). The arrows indicate the position of the TSS. Only confirmed neighbor genes are represented (*Saccharomyces* Genome Database). **B.** ChIP analysis of 3HA-TFIIS binding to promoter or ORF of *ADH1*, *MET17* and *VTC3*. Analysis of non-transcribed *GAL1* ORF served as control for TFIIS background binding. Cells were grown to exponential phase in glucose rich medium (YPD) at 30°C before crosslinking.

were designed to amplify the promoters or the coding sequences of *ADH1*, *MET17* and *VTC3* (Figure 3A). Primers pairs amplifying *GAL1* sequences were used for background noise estimation, since *GAL1* is not transcribed in YPD glucose medium. We saw enrichment of TFIIS above background on the promoters and ORFs of all three genes (Figure 3B). Since the presence of the HA tag could alter the function of TFIIS, we also performed the ChIP experiments with anti-TFIIS antibodies (Supplementary Figure 1). The results were essentially the same even though the background level was higher. In the case of *MET17* and *VTC3*, the amount of TFIIS on the promoter was greater than or equal to the amount on the ORF, suggesting a role for TFIIS in transcription initiation in addition to that in transcription elongation on these genes.

TFIIS domain II is required for the recruitment of Pol II to the promoter of ADH1, MET17 and VTC3.

The growth defect observed in the *dst1-R200A* mutant could result from lower Pol II recruitment or stability on affected promoters. Thus Pol II occupancy on *ADH1*, *MET17* and *VTC3* genes was studied by ChIP. Cells were grown in YPD glucose-rich medium at 30°C and the culture was shifted to 37°C for 30 min before crosslinking. Pol II was immunoprecipitated with 8WG16 anti-CTD antibody. Figure 4A shows that, taking the error margin into account, Pol II recruitment to promoters or ORFs was not modified in any TFIIS mutant strains compared to wild-type strain in a *MED31* wild-type background. However, deletion of *MED31* decreased the levels of Pol II on the promoters and ORFs by a factor two to four (compare black histogram values of Figure 4A and 4B), showing that the *ADH1*, *MET17* and *VTC3* genes depend on Med31 for highest occupancy. Pol II recruitment to promoters or ORFs did not change significantly in *dst1-(1-265) med31-Δ* compared to the *DST1 med31-Δ* strain, confirming that the cleavage activity of TFIIS domain III does not

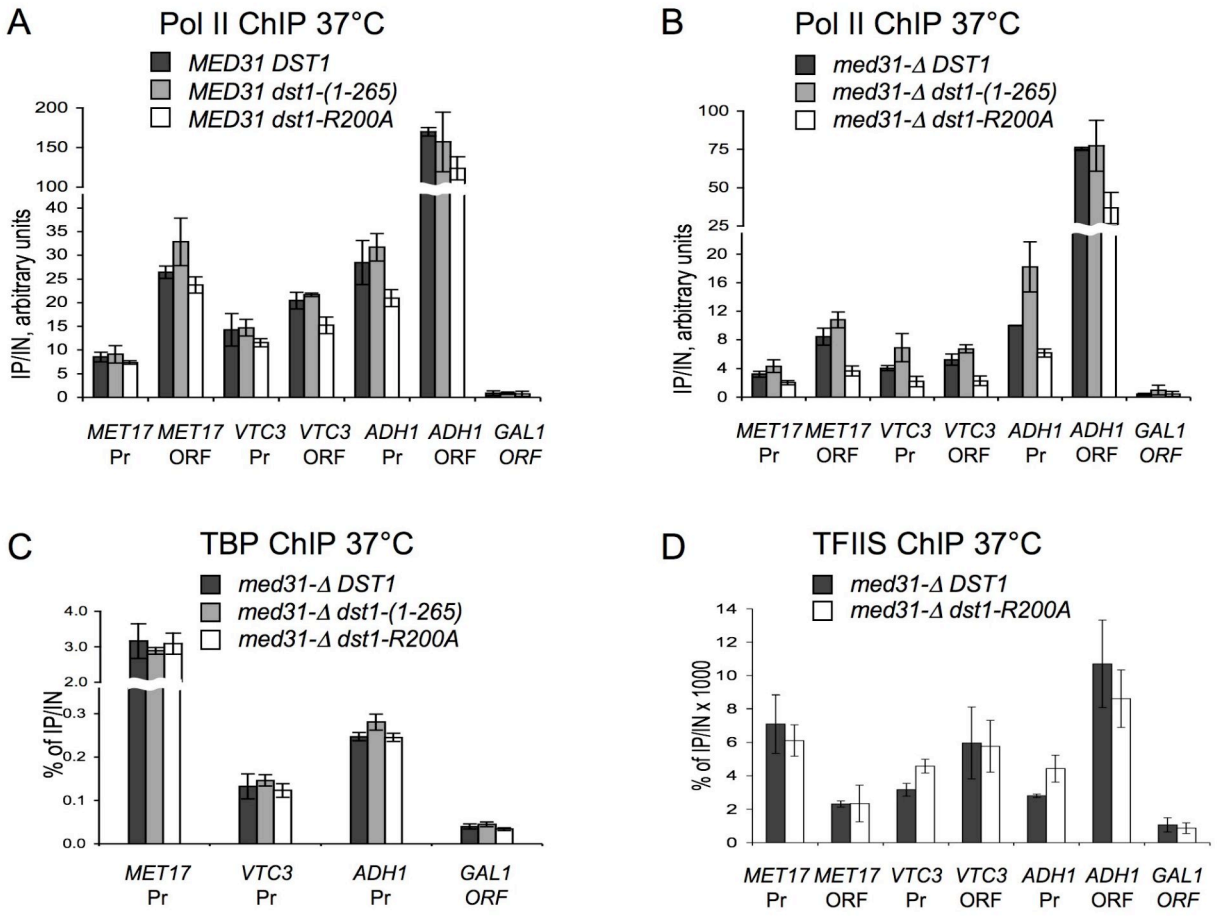


Figure 4: ChIP analysis of the occupancy of promoter and ORF of *ADH1*, *MET17* and *VTC3* in *DST1* and *MED31* mutant contexts.

A. ChIP analysis of Pol II in *DST1*, *dst1-(1-265)*, *dst1-R200A* and *MED31* strains grown in rich glucose medium at 37°C. Immunoprecipitation signal over input signal is represented in arbitrary units. **B.** ChIP analysis of Pol II in *DST1*, *dst1-(1-265)*, *dst1-R200A* in *med31-Δ* background grown in rich glucose medium at 37°C. **C.** ChIP analysis of TBP in *DST1*, *dst1-(1-265)*, *dst1-R200A* and *med31-Δ* strains grown in rich glucose medium at 37°C. **D.** ChIP analysis of TFIIS binding to promoter or ORF of *ADH1*, *MET17* and *VTC3* in *med31-Δ DST1* and *med31-Δ dst1-R200A* strains. Cells were cultured to log phase in glucose rich medium at 30°C, and then shifted at 37°C for 30 min before crosslinking. Anti-TFIIS polyclonal antibodies were used for immunoprecipitation.

influence Pol II occupancy of *ADH1*, *MET17* and *VTC3*, even in the *med31-Δ* mutant context (Figure 4B). On the contrary, recruitment of Pol II was diminished two fold on promoters and coding sequences in the *dst1-R200A med31-Δ* strain compared to the *DST1 med31-Δ* strain. At 30°C, similar results were obtained (Supplementary Figure 2), in agreement with mRNA levels. We concluded that the correct transcription of *ADH1*, *MET17* and *VTC3* did not require TFIIS cleavage activity, but that Pol II recruitment or stabilisation on promoters of these genes depends on TFIIS Pol II-binding activity in the absence of Med31.

Recruitment of TBP and TFIIS independent of Pol II to ADH1, MET17 and VTC3.

Since Pol II occupancy was diminished at *ADH1*, *MET17* and *VTC3* promoters and ORFs in *dst1-R200A med31-Δ* cells, we wanted to know whether or not other components of the preinitiation complex followed the same pattern. TBP recruitment was analysed by ChIP, using anti-TBP antibodies (a gift from A. Weil), in *DST1 med31-Δ* and *dst1-R200A med31-Δ* cells after a shift of 30 minutes to 37°C. Figure 4C showed that no defect in TBP recruitment could be seen.

TFIIS recruitment was analysed by ChIP, using anti-TFIIS antibodies (a gift from C. Kane), in *DST1 med31-Δ* and *dst1-R200A med31-Δ* cells after a shift of 30 minutes to 37°C. We looked at TFIIS occupancy using the same chromatin preparations as for the Pol II ChIP experiments of Figure 4B. Figure 4D showed that no defect in TFIIS recruitment could be seen in the *dst1-R200A* mutant compared to wild-type. We concluded that TFIIS was recruited independently of Pol II on these genes.

TFIIS cleavage activity is not required for rescuing dst1-Δ coletality with an Rpb1 CTD deletion.

TFIIS inactivation exerts a synthetic effect with mutations in numerous genes, a number of which are implicated in transcription. Thus, we wanted to know if the domain II and linker were sufficient to rescue the colethality of *dst1-Δ* with mutants other than *med31-Δ*. We investigated the well-established colethality of *DST1* deletion with the Rpb1 C-terminal domain (CTD) truncation. In yeast, Rpb1 CTD is composed of 26 or 27 repeats of a heptapeptide. Reducing the number of these repeats to 10-12, as in the *rpb1-Δ104* strain, is colethal with *dst1*-Δ (13). We modified the *rpb1-Δ104* strain (14) by fully deleting *DST1* and complementing it with a wild-type copy on a *URA3* vector. This strain was transformed with vectors carrying the *DST1* truncations used above, and cells containing the *DST1* wild-type copy were counterselected on a 5FOA containing medium. We confirmed the colethality of *rpb1-Δ104* mutation with *dst1*-Δ (Supplementary Figure 3 last row). However, the colethality was fully complemented by a TFIIS fragment composed of domain II and linker alone (Supplementary Figure 3 row 4).

Discussion.

In this work, we show that the TFIIS elongation factor has a function required for the optimal transcription of selected genes. Importantly, this new function of TFIIS is independent of its cleavage activity but requires its Pol II binding domain. We show that TFIIS is required in conjunction with the Med31 Mediator subunit for full Pol II occupancy *in vivo,* and has thus a dual and independent role in transcription initiation and elongation at a subset of genes. This conclusion is also supported by the independent finding by Ranish and colleagues that TFIIS is important for preinitiation complex formation *in vitro*.

Domain II binds strongly to RNA polymerase II *in vitro* through residues of a basic patch (7, 8). We mutated the R200A basic patch residue and found that the mutation was conditionally colethal with *med31-Δ,* but did not affect MPA sensitivity strongly suggesting a lack of effect on transcription elongation. Indeed, Struhl and colleagues showed that in a TFIIS mutant sensitivity to 6-aza uracil, which is like MPA a nucleotide depleting drug, correlated with decreased transcription processivity and stimulated transcription through an arrest site *in vivo* (15, 16). The *dst1-R200A* mutation in the *med31-Δ* background affected the transcription of 80 to 90 genes and the recruitment of Pol II on the three genes (*ADH1*, *MET17*, *VTC3*) that were selected among those that were transcription impaired. However, eliminating the RNA cleavage stimulatory activity had no effect on Pol II occupancy. TFIIS was recruited to the promoters of these genes, which is not the general situation (10). Contrary to Pol II, TFIIS itself was still recruited to the impaired genes, implicating an independent recruitment mechanism for TFIIS and Pol II. TBP association with promoters was not altered either, indicating that the *dst1-R200A* mutation did not affect the early steps of preinitiation complex formation *in vivo*.

We propose the following model. TFIIS would be recruited by activators or coactivators independently of Pol II to selected gene promoters. Then, TFIIS in conjunction

with coactivators such as the Mediator complex would stimulate Pol II recruitment or stabilization on promoters via a direct interaction with the enzyme through its Pol II-binding site.

In vitro, the TFIIS basic patch is important for TFIIS binding to RNA polymerase II (7, 8). Whereas the TFIIS-R200A mutation reduced Pol II occupancy at promoters of selected genes, it did not affect sensitivity to MPA or occupation of TFIIS on ORFs, suggesting that *in vivo* this mutation renders TFIIS Pol II-binding limiting for preinitiation complex formation, but not for transcription elongation.

The TFIIS minimal domain required for full complementation of *dst1-Δ med31-Δ* colethality and full occupancy of Pol II on promoters contained the linker domain in addition to domain II. We were able to construct a viable but very slow growing *dst1-Δ med31-Δ* strain complemented by the first three α-helices of TFIIS domain II alone (data not shown). The presence of the linker sequence could protect domain II from degradation in its free form *in vivo* or might stabilise domain II association with Pol II.

TFIIS domain II and linker were sufficient to complement the colethality of the Rpb1 CTD truncation with *dst1-Δ*. Rpb1 CTD is bound by the Mediator complex and may be required for Pol II recruitment to activated promoters (17). Colethality of *rpb1-Δ104* with *dst1-Δ* may also be due to a synergistic defect in Pol II recruitment to promoters. This possibility is reinforced by the colethality of *rpb1-Δ104* with *med31-Δ* (18). Thus TFIIS Pol II-binding activity may be required when the transcription machinery is defective in Pol II recruitment on activated promoters.

In our experiments with *ADH1*, *MET17* and *VTC3*, we did not use mutants of TFIIS domain I, since *dst1-(133-265)* lacking this domain was not colethal with *med31-Δ*. The Pol II ChIP results obtained using such a mutated strain were very variable, despite our best efforts (data not shown). This situation may be due to an unknown role of this domain.

Indeed, it has been shown that domain I interacts with the Med13 (Srb9) Mediator subunit and the Spt8 SAGA subunit (19). Moreover, TFIIS domain I is required when the Rpb4 subunit of Pol II is absent. It is thus possible that TFIIS domain I, as the Pol II-binding domain, might have a role in transcription initiation at some promoters when subunits of the transcription machinery are lacking, as suggested by the data in the accompanying paper by Kim et al. indicating that domain I contributes to PIC assembly *in vitro*.

Med31 is the most conserved subunit of Mediator in terms of protein sequence conservation, and is present in most, if not all, eukaryotic organisms (20). It has been proposed previously that the most conserved subunits of Mediator form a core complex oriented towards Pol II (21). These subunits belong to the Mediator middle module known to contact Pol II (22), and they are essential in yeast. Med31 interacts with subunits of the middle module (23, 24), but is essential neither in *S. cerevisiae* nor in *Schizosaccharomyces pombe* (25) in spite of its strong conservation. This situation could be explained if the role of Med31 and TFIIS in conjunction during transcription initiation also holds in other eukaryotes species than *S. cerevisiae*, a very likely possibility in view of the strong conservation of TFIIS throughout the eukaryotic kingdom.

In conclusion, we provide novel insights into the *in vivo* function of the TFIIS transcription factor independent of its well-characterized stimulatory activity on Pol II RNA cleavage and requiring its Pol II binding domain. TFIIS acts in transcription initiation in conjunction with the Med31 Mediator subunit and contributes to the optimal Pol II occupancy at a subset of gene promoters *in vivo*.

Experimental procedures

Oligonucleotides.

The sequence of the oligonucleotides used in this study can be found in the Supplementary Materials section.

Plasmids construction and cloning.

All cloning was done using the Gateway Invitrogen cloning method following the standard protocol. The *DST1* cloned sequences were transferred into pVV204 (*CEN TRP1 pTetO$_7$)* vector (26) by the LR reaction. *R200A* point mutation in *DST1* was obtained by PCR overlap extension mutagenesis (27), and cloned using the Gateway standard method and transferred into pVV204 as well.

MED31 was cloned the same way as *DST1* and transferred into pVV208 (*CEN URA3 pTetO$_7$)* vector (26).

Yeast strains.

MED31 was deleted in YPH500 background (*MAT**a** ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-63 lys2-801 leu2-1*) and replaced by a *kan* marker using standard one-step method (28).

The ESH1 (19) strain deleted for *DST1* was transformed with the *CEN URA3 pTetO$_7$:MED31* plasmid and then deleted for *MED31* with a *kan* marker. The collection of cloned *DST1* mutants were transformed into this strain. The rpb1-Δ104 strain (14) was transformed with a *CEN URA3 pTetO$_7$:DST1*, then the chromosomal copy of *DST1* was deleted by a *HIS3MX6* marker (28). The resulting strain was transformed with the collection of cloned *DST1* mutants.

5FOA and MPA assays.

The collection of strains bearing the truncation mutants of *DST1* were spotted on complete medium with MPA 25µg/ml to test for elongation defect, or streaked on SD medium supplemented with uracil and then spotted on 5FOA medium minus uracil to counter select the wild-type *MED31* bearing plasmid.

Chromatin immunoprecipitation.

Chromatin immunoprecipitations were done essentially as described previously (29, 30). The HA tagged proteins were immunoprecipitated with 12CA5 antibody bound to IgG magnetic beads (Dynabead). Pol II was immunoprecipitated with 8WG16 anti-CTD antibody (Covance). Rabbit antibody to recombinant yeast TFIIS was a gift from C. Kane. Anti-TBP antibody was a gift from A. Weil.

Immunoprecipitated DNA was analysed by quantitative real time PCR on an ABI Prism 7000 machine (Applied Biosystem). Relative quantification using a standard curve method was performed and the occupancy level for a specific fragment was defined as the ratio of immunoprecipitated DNA over total DNA. The respective locations of the amplified PCR products are indicated on the Figures.

When cells were shifted from 30°C to 37°C, half of an exponentially growing culture was collected by centrifugation, immediately mixed with medium heated at and incubated further at 37°C for 30 min under agitation. Three independent experiments were averaged. The corresponding standard deviations are indicated in the Figures. When cells were cultivated in YPD medium, *GAL1* ORF region was used as a non-transcribed control.

Quantitative RT-PCR.

mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR. RNA was extracted as described by Schmitt *et al.* (31). Reverse transcription of 5 μg RNA samples was performed in the presence of Super Script II and random primers (Invitrogen) for 1-2 h at 42 °C in appropriate buffer. 25S rRNA was used as internal control for normalization.

Micro-array analysis.

Gene expression was monitored with DNA micro-arrays manufactured by the Service de Génomique Fonctionnelle (CEA/Evry, France) as described previously (12) except that an indirect cDNAs labelling protocol of the targets was used (adapted from P. Brown, http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/aadUTPCouplingprocedure.htm). The micro-arrays were scanned with a GENEPIX 4000B scanner. Spot intensities and fluorescence ratios were measured using the GENEPIX 4.0 software (Axon Laboratories). Temperature shift of the culture was done as described for ChIP experiments. For each growth condition (30°C or 37°C), seven hybridizations were performed with three batches of RNA extracted from *med31*-Δ *DST1* and *med31*-Δ *dst1-(R200A)* strains and labels were exchanged in half of the hybridizations. The data were analyzed with the GeneSpring software (Agilent Technologies).

Acknowledgments

We thank L. Kuras for initiating us to the ChIP method, C. Kane for anti-TFIIS antibody, A. Weil for anti-TBP antibody, P. Thuriaux, M. Wery and E. Shematorova for discussion and yeast strains, C. Mann for improving the manuscript, F. Amiot and X. Gidrol for providing DNA micro-arrays. B.G. was supported by grants from the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche and from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

References

1. Hampsey, M. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 465-503.
2. Koh, S. S., Ansari, A. Z., Ptashne, M. & Young, R. A. (1998) *Mol Cell* 1: 895-904.
3. Lee, Y. C., Park, J. M., Min, S., Han, S. J. & Kim, Y. J. (1999) *Mol Cell Biol* 19: 2967-76.
4. Zaman, Z., Ansari, A. Z., Gaudreau, L., Nevado, J. & Ptashne, M. (1998) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 167-71.
5. Wind, M. & Reines, D. (2000) *Bioessays* 22: 327-36.
6. Olmsted, V. K., Awrey, D. E., Koth, C., Shan, X., Morin, P. E., Kazanis, S., Edwards, A. M. & Arrowsmith, C. H. (1998) *J Biol Chem* 273: 22589-94.
7. Awrey, D. E., Shimasaki, N., Koth, C., Weilbaecher, R., Olmsted, V., Kazanis, S., Shan, X., Arellano, J., Arrowsmith, C. H., Kane, C. M. & Edwards, A. M. (1998) *J Biol Chem* 273: 22595-605.
8. Kettenberger, H., Armache, K. J. & Cramer, P. (2003) *Cell* 114: 347-57.
9. Malagon, F., Tong, A. H., Shafer, B. K. & Strathern, J. N. (2004) *Genetics* 166: 1215-27.
10. Prather, D. M., Larschan, E. & Winston, F. (2005) *Mol Cell Biol* 25: 2650-9.
11. Ubukata, T., Shimizu, T., Adachi, N., Sekimizu, K. & Nakanishi, T. (2003) *J Biol Chem* 278: 8580-5.
12. Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J.-C., Lombardia, L. J., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M. & Labarre, J. (2002) *Mol. Cell* 9: 713-723.
13. Lindstrom, D. L. & Hartzog, G. A. (2001) *Genetics* 159: 487-97.
14. Nonet, M. L. & Young, R. A. (1989) *Genetics* 123: 715-24.
15. Mason, P. B. & Struhl, K. (2005) *Mol Cell* 17: 831-40.
16. Kulish, D. & Struhl, K. (2001) *Mol Cell Biol* 21: 4162-8.
17. Thompson, C. M., Koleske, A. J., Chao, D. M. & Young, R. A. (1993) *Cell* 73: 1361-75.
18. Fan, H. Y., Cheng, K. K. & Klein, H. L. (1996) *Genetics* 142: 749-59.
19. Wery, M., Shematorova, E., Van Driessche, B., Vandenhaute, J., Thuriaux, P. & Van Mullem, V. (2004) *Embo J* 23: 4232-42.
20. Linder, T. & Gustafsson, C. M. (2004) *J Biol Chem*.
21. Bjorklund, S. & Gustafsson, C. M. (2004) *Adv Protein Chem* 67: 43-65.
22. Davis, J. A., Takagi, Y., Kornberg, R. D. & Asturias, F. A. (2002) *Mol Cell* 10: 409-15.
23. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. & Sakaki, Y. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4569-74.
24. Guglielmi, B., van Berkum, N. L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H. M., Holstege, F. C. & Werner, M. (2004) *Nucleic Acids Res* 32: 5379-91.
25. Grallert, A., Grallert, B., Zilahi, E., Szilagyi, Z. & Sipiczki, M. (1999) *Yeast* 15: 669-86.
26. Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. & Vandenhaute, J. (2003) *Yeast* 20: 739-46.
27. Higuchi, R., Krummel, B. & Saiki, R. K. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 7351-67.
28. Longtine, M. S., McKenzie, A., III, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philipsen, P. & Pringle, J. R. (1998) *Yeast* 14: 953-961.
29. Kuras, L. & Struhl, K. (1999) *Nature* 399: 609-13.
30. Kuras, L., Borggrefe, T. & Kornberg, R. D. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13887-91.

31. Schmitt, M. E., Brown, T. A. & Trumpower, B. L. (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 3091-2.
32. Zhang, Z. & Dietrich, F. S. (2005) *Nucleic Acids Res* 33: 2838-51.
33. Basehoar, A. D., Zanton, S. J. & Pugh, B. F. (2004) *Cell* 116: 699-709.

Supplementary Materials

Oligonucleotides used for TFIIS constructions.

The primers pairs used to construct the different TFIIS fragments were the following: *dst1-(1-309)*: a5-f3, *dst1-(1-265)*: a5-e3, *dst1-(244-309)*: d5-f3, *dst1-(133-309)*: b5-f3, *dst1-(1-132)*: a5-b3, *dst1-(133-265)*: b5-e3, *dst1-(209-265)*: c5-e3, *dst1-(133-240)*: b5-d3. The oligonucleotide sequences are the following :

a5: ATGGATAGTAAGGAAGTACTGG

b3: TCATCTTGGTTTAGTGCTGACG

b5: ATGAATAGTAAGAACGATGG

c3: TCATGGGTTATTCTTTGATATGACG

c5: ATGAAGAATAACCCAGATCTC

d3: TCAGGGCGCTGGTGCCAGATCC

d5: ATGGCGCCCTTAAAGCAAAAG

e3: TCAGACTGACCTTTCTATGG

e5: ATGACCGATAGATTTACATGTGG

f3: CTAAGAGAATTTCCATCTG

Primers used for ChIP analysis.

The following primers were used for quantitative real time PCR:

for *GAL1* ORF amplification: forward AAAGAAACTTGCACCGGAAA, reverse GGCCCATATTCGCTTTAACA;

for *MET17* promoter: forward GGGTTCGAATCCCTTAGCTC, reverse GATGGCGCCTTGACTAACTT;

for *MET17* ORF 5' region: forward TACCCCCATCCATACAATGC, reverse GAAGTGGTGGCGTAAATTGG;

for *VTC3* promoter: forward TCGGCGGACTCCAACTATTA, reverse ACAGGGAAAAATGTGCCAAG;

for *VTC3* ORF 5' region: forward CCTCCCTGGAAGGATTCATA, reverse CTTTATCCAAGGCCTCCACA;

for *ADH1* promoter: forward ATAGGCGCATGCAACTTCTT, reverse CATCAGCTCTGGAACAACGA;

for *ADH1* ORF: forward GGGTATTGACGGTGGTGAAG, reverse AAACGTTGATGACACCGTGA.

Primers used for RT-PCR measurements of mRNA quantities.

The following oligonucleotides were used in real time PCR reactions:

for *MET17*, *VTC3* and *ADH1* mRNA quantitations, we used the same primers as described above for ChIP analysis on ORF 5' region; for 25S rRNA quantitation we used: forward GGTTATATGCCGCCCGTCTTGA, reverse CCCAACAGCTATGCTCTTACTC.

Supplementary Table 1. Yeast strains

Name	Genotype	Reference
YPH500	*MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1*	
ESH1	*MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-1 trp1-Δ63 lys2-801 leu2-Δ1 dst1::hisG*	Wery et al. 2004
YBG4405	*MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 med31::kanMX4*	This work
YBG4239	*MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-1 trp1-Δ63 lys2-801 leu2-Δ1 dst1::hisG med31::kanMX4 / CEN URA3 pTetO$_7$::MED31*	This work
YC041	*MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-1 trp1-Δ63 lys2-801 leu2-Δ1 TRP1::pADH::3HA::DST1*	Gift from M.Wery and P. Thuriaux
rpb1-Δ104	*MATα CAN1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 rpb1-Δ104*	Nonet et al. 1989
YJS4084	*MATα CAN1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 rpb1-Δ104 dst1::HIS3MX6 / CEN URA3 pTetO$_7$::DST1*	This work

Supplementary Table 2. DNA micro-arrays

30°C repressed DST1/dst1R200A, 92 genes			
Systematic	Normalized	t-test P-value	Common
YPL281C	5.8096046	2.4344817E-4	ERR2
YMR084W	5.5943527	0.07185557	
YOR393W	5.4000463	1.4117849E-4	ERR1
YPL036W	4.8134937	0.0011583896	PMA2
YMR323W	4.490331	0.0015112711	ERR3
YCL042W	4.401912	0.010296523	
YMR170C	4.361306	0.2194174	ALD2
YJL012C	3.8422482	3.2506778E-5	VTC4
YPL019C	3.776924	9.77005E-5	VTC3
YBR181C	3.7008464	0.027939728	RPS6B
YIR044C	3.683535	0.0018439151	
YML123C	3.6369038	8.072403E-5	PHO84
YER125W	3.3395205	6.9733016E-4	RSP5
YPR080W	3.2079666	0.011163822	TEF1
YOR302W	3.1712005	0.046445064	CPA1 uORF
YAL005C	3.1220117	0.004981092	SSA1
YDR103W	3.1211996	0.15873335	STE5
YKR093W	3.077735	7.684073E-4	PTR2
YNL278W	3.0256152	0.16574593	CAF120
YER172C	3.0210154	0.0021178017	BRR2
YBR122C	2.9988256	0.1577491	MRPL36
YBR145W	2.9681137	3.4382296E-4	ADH5
YBR012W-B	2.9479473	0.0067267236	
YAL062W	2.8746374	7.1403506E-4	GDH3
YJL080C	2.8470645	0.0025855107	SCP160
YMR147W	2.810813	0.030431435	
YML121W	2.7492456	0.13000001	GTR1
YOR204W	2.7432497	0.0026762919	DED1
YMR211W	2.7307136	1.5533788E-4	DML1
YBR012W-A	2.7182052	0.012108067	
YEL030W	2.7112248	2.109155E-4	ECM10
YNL190W	2.6581635	4.3319704E-4	
YBL075C	2.6274552	4.6403595E-4	SSA3
YHR136C	2.5836692	5.5991595E-6	SPL2
YGR162W	2.5730436	8.813892E-4	TIF4631
YLR249W	2.5719595	0.0030584096	YEF3
YPR081C	2.563341	5.5890204E-4	GRS2
YJR025C	2.5583043	7.488894E-6	BNA1
YBL104C	2.5423963	0.057645705	
YGL178W	2.541095	0.0049723587	MPT5
YML103C	2.5319493	0.045870885	NUP188
YHR007C	2.4920664	4.172517E-4	ERG11
YMR017W	2.47108	0.16214977	SPO20
YGR240C	2.4524913	1.4757298E-4	PFK1
YBR019C	2.426669	0.04013296	GAL10
YMR051C	2.3939335	0.023277171	
YMR012W	2.3835082	0.0012079931	CLU1
YDL055C	2.328466	0.0014593562	PSA1
YJL076W	2.2892826	0.0027095918	NET1
YBL076C	2.2710268	0.001761408	ILS1

YBR017C	2.258858	0.10719073	KAP104
YLR347C	2.2583578	4.724217E-4	KAP95
YBR110W	2.2524157	6.330134E-4	ALG1
YPL022W	2.2490819	5.443055E-5	RAD1
YML045W	2.2454667	0.016652431	
YDL160C	2.2434115	0.02004961	DHH1
YBL111C	2.2325604	0.07509289	
YLR098C	2.2194014	0.0069134715	CHA4
YFL067W	2.2192287	8.219703E-4	
YKL014C	2.2141201	8.7622134E-4	URB1
YDL066W	2.2124877	1.1899139E-4	IDP1
YLL024C	2.212106	0.00902005	SSA2
YPL221W	2.1910994	9.062578E-4	HUF1
YOR243C	2.185716	0.0010140988	PUS7
YOR108W	2.183217	0.00275137	LEU9
YNL197C	2.1659248	0.0018574486	WHI3
YHR163W	2.1522942	0.03065399	SOL3
YML099C	2.1482108	0.09931762	ARG81
YJR045C	2.14814	0.0023873965	SSC1
YOR347C	2.1325204	0.0032353324	PYK2
YBL066C	2.123372	0.0020817593	SEF1
YBR015C	2.1144936	0.0027467	MNN2
YOR375C	2.1140082	0.00828406	GDH1
YDR385W	2.1043458	4.2191523E-4	EFT2
YBR275C	2.0909657	0.00628011	RIF1
YAL038W	2.0900903	0.13494232	CDC19
YDL058W	2.0723238	0.0057931007	USO1
YJR041C	2.072014	0.0022358438	URB2
YLL028W	2.0671086	1.7989272E-5	TPO1
YGR180C	2.0667202	0.0011949507	RNR4
YER156C	2.0574553	0.12075526	
YFR053C	2.0377274	5.6193025E-5	HXK1
YGL008C	2.0356684	0.0039307293	PMA1
YGL025C	2.0332954	0.24136934	PGD1
YCL024W	2.029392	0.0063557513	KCC4
YNL104C	2.0276017	3.8042688E-4	LEU4
YNL328C	2.0246866	4.7072023E-4	MDJ2
YMR162C	2.017815	0.02158397	DNF3
YHR092C	2.0132163	0.016120471	HXT4
YGL090W	2.0114424	0.45883635	LIF1
YMR207C	2.0113244	0.0051588723	HFA1
YJR091C	2.0004601	0.0020471131	JSN1

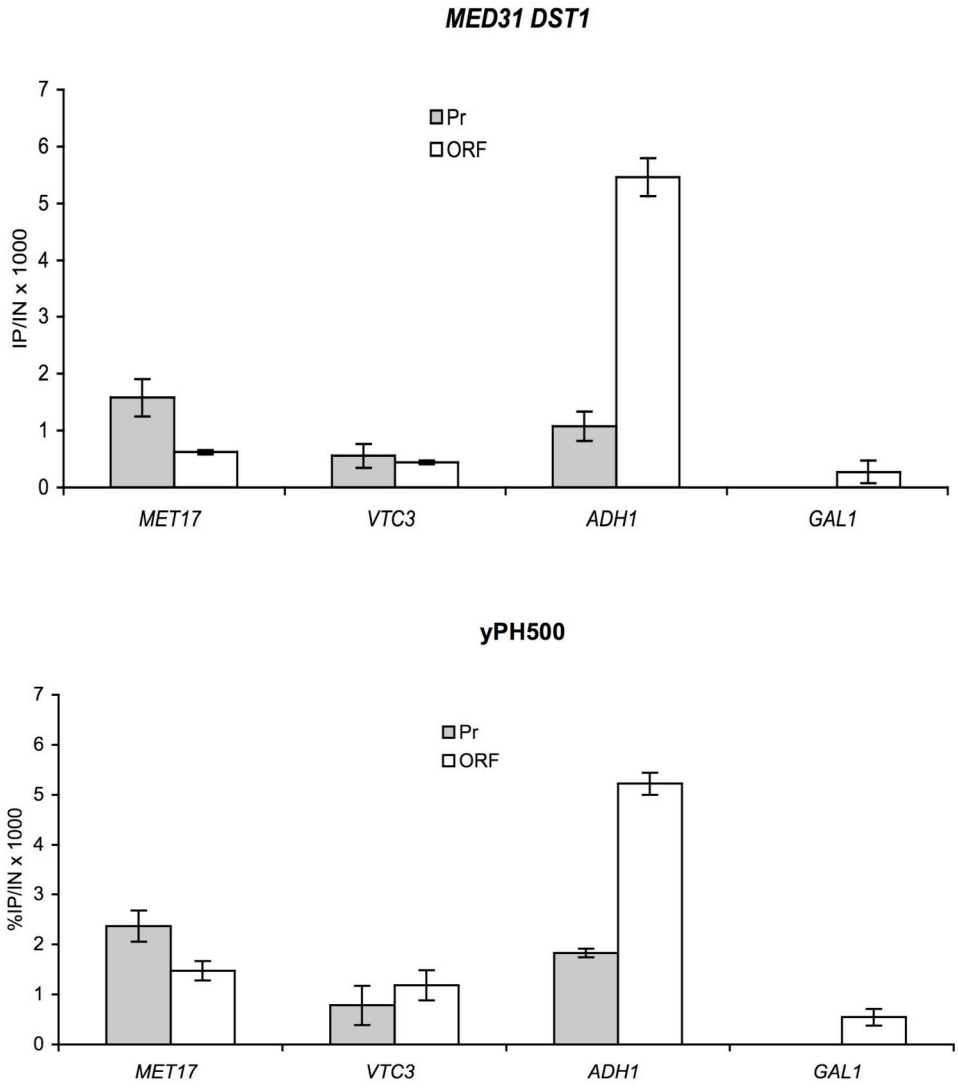
37°C repressed DST1/dst1R200A, 82 genes			
Systematic	Normalized	t-test P-value	Common
YCL042W	11.910676	1.3213082E-5	
YMR323W	4.8163567	0.0028059043	ERR3
YOR393W	4.604986	1.6544684E-4	ERR1
YMR170C	4.5177474	0.13548985	ALD2
YPL281C	4.5147505	1.7231998E-4	ERR2
YMR211W	4.258103	0.003595365	DML1
YPL036W	4.222123	0.0028597496	PMA2
YJL012C	3.3865547	0.0010662209	VTC4

YPL179W	3.1619525	0.0012969011	PPQ1
YPL019C	3.017697	0.0026598831	VTC3
YIR044C	3.010092	7.510344E-4	
YAL005C	2.9635892	0.036785867	SSA1
YOR204W	2.9306805	7.281474E-4	DED1
YDL227C	2.8814058	0.03314386	HO
YKR093W	2.7956462	0.0014137957	PTR2
YOR087W	2.791809	0.009584989	YVC1
YGL090W	2.736303	0.009870371	LIF1
YER172C	2.6998951	0.0043968144	BRR2
YBR015C	2.69313	0.0015240022	MNN2
YBR145W	2.670404	0.0016182346	ADH5
YER125W	2.6610107	0.0016898969	RSP5
YMR147W	2.634666	0.0058871834	
YOR302W	2.6019876	0.05294093	CPA1 uORF
YNL190W	2.561562	0.0038732472	
YML123C	2.5362768	9.6025324E-4	PHO84
YEL030W	2.4713242	0.0071977796	ECM10
YMR171C	2.4676363	0.045842085	
YIL015W	2.441102	1.1026532E-4	BAR1
YLR347C	2.4362483	4.5317455E-4	KAP95
YLR249W	2.421507	7.979479E-4	YEF3
YLR245C	2.397226	0.33300582	CDD1
YOR108W	2.3822482	0.004170435	LEU9
YLR397C	2.3737085	0.017979186	AFG2
YPL022W	2.3726695	0.0018598322	RAD1
YBL111C	2.3718107	0.0052779196	
YMR309C	2.371035	0.36134794	NIP1
YPL067C	2.3322275	0.0059381863	
YBR012W-B	2.3299918	0.024906537	
YJL080C	2.329523	0.0023655738	SCP160
YJR025C	2.315802	1.8783614E-6	BNA1
YGR240C	2.3048332	2.5211554E-4	PFK1
YGL178W	2.2968252	0.028256444	MPT5
YBR181C	2.2766054	0.2438245	RPS6B
YGR162W	2.2759058	0.0029097612	TIF4631
YKL014C	2.2602265	0.00563935	URB1
YFL067W	2.258611	0.00434074	
YML121W	2.2527173	0.2158843	GTR1
YDL055C	2.2463944	0.0022231536	PSA1
YDL037C	2.2456377	0.013730226	BSC1
YPR080W	2.2236946	0.10822851	TEF1
YBR012W-A	2.1891377	0.005291434	
YGL055W	2.1860301	5.5154116E-4	OLE1
YLL024C	2.1771245	0.05149137	SSA2
YPL085W	2.1760736	0.037948526	SEC16
YBR017C	2.1505742	0.25780323	KAP104
YDL160C	2.1493008	0.029132312	DHH1
YHR007C	2.1165755	0.0022641541	ERG11
YPL221W	2.112234	0.03899264	HUF1
YOR347C	2.1111243	4.3159386E-4	PYK2
YPL132W	2.1098213	0.0047161845	COX11
YNL016W	2.0965974	0.0018783616	PUB1
YPL283C	2.0853455	0.047559284	YRF1-7

YMR207C	2.0833032	0.036591217	HFA1
YLR087C	2.0825484	0.055066198	CSF1
YHR163W	2.0607312	0.12896714	SOL3
YGL008C	2.0597687	0.0028013324	PMA1
YHR208W	2.0419285	0.0028554383	BAT1
YFL007W	2.040527	0.013478235	BLM3
YML099C	2.0382657	0.20463185	ARG81
YGR143W	2.0355682	7.2555E-4	SKN1
YBR275C	2.0355632	0.12353811	RIF1
YLR098C	2.0341733	0.0072464566	CHA4
YNL327W	2.033067	3.213913E-4	EGT2
YDL066W	2.0319407	0.0031476368	IDP1
YAL038W	2.0307848	0.08348997	CDC19
YML045W	2.0261712	0.0035168326	
YLR058C	2.0214179	4.3039458E-4	SHM2
YJL076W	2.0201666	0.020851605	NET1
YMR051C	2.0149696	0.007965938	
YNL240C	2.0099154	0.0061759413	NAR1
YER087W	2.00662	0.001984322	
YPR159W	2.0064251	6.978369E-4	KRE6

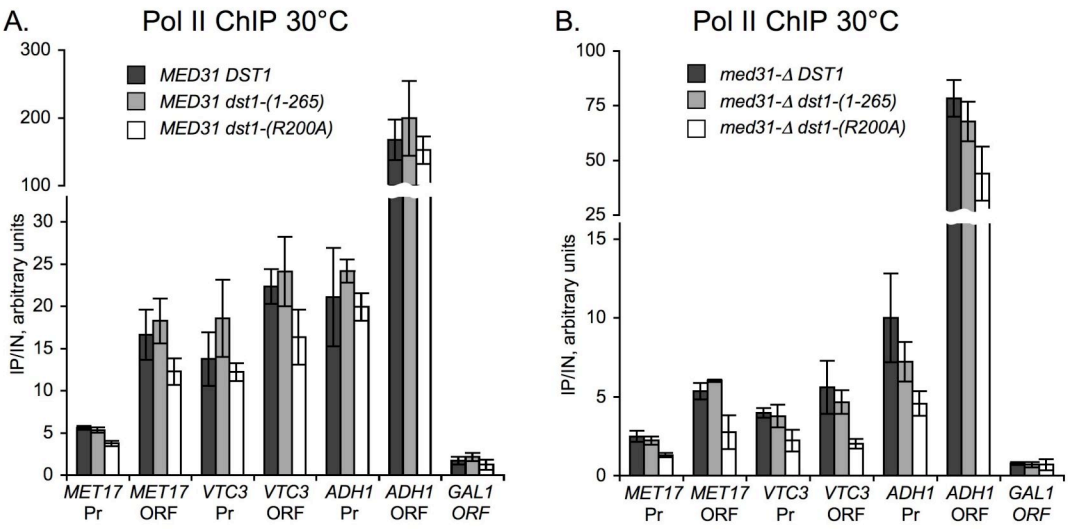
30°C induced DST1/dst1R200A, 8 genes			
Systematic	Normalized	t-test P-value	Common
YGL018C	0.49429312	0.115805976	JAC1
YDR363W	0.4877885	0.17078935	ESC2
YIL040W	0.45454302	0.02089827	APQ12
YGR225W	0.4536027	0.20381127	AMA1
YGR273C	0.43555102	0.050855286	
YDR374C	0.43509305	0.008763097	
YKL187C	0.38437206	0.26907063	
YCL029C	0.362283	0.06208729	BIK1

37°C induced DST1/dst1R200A, 18 genes			
Systematic	Normalized	t-test P-value	Common
YIL092W	0.4968155	0.044339787	
YPR151C	0.4942812	2.5577773E-4	SUE1
YDR171W	0.48986936	0.0029004612	HSP42
YNL030W	0.48441124	9.332922E-4	HHF2
YBR009C	0.47996512	0.0017736859	HHF1
YGR142W	0.47358608	5.032553E-4	BTN2
YBL078C	0.4732325	2.9388093E-4	AUT7
YDR007W	0.4695307	3.2550565E-4	TRP1
YKL108W	0.4575877	0.033840287	SLD2
YHR055C	0.45446163	9.2747454E-5	CUP1-2
YGR237C	0.44489345	0.019109268	
YHR053C	0.4437604	3.584166E-5	CUP1-1
YOL155C	0.43363535	3.086013E-4	HPF1
YAL027W	0.42231995	0.049227703	
YNL036W	0.39890704	1.1488106E-5	NCE103
YOL053W	0.37850937	5.844045E-4	
YOR186W	0.3686175	0.0012679279	
YCL029C	0.30717024	0.014790582	BIK1



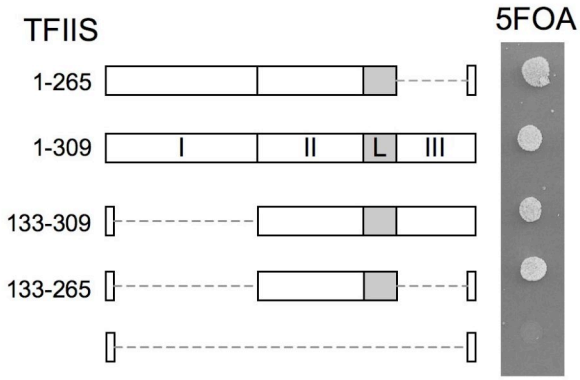
Supplementary Figure 1: TFIIS is recruited to the promoter and coding sequence of three different genes.

ChIP analysis of TFIIS binding to promoter or ORF of *ADH1*, *MET17* and *VTC3* was performed in strains *MED31 DST1* and YPH500 as described in Figure 3 with anti-TFIIS antibodies. Analysis of non-transcribed *GAL1* ORF served as control for TFIIS background binding. Cells were grown to exponential phase in glucose rich medium (YPD) at 30°C before cross-linking.



Supplementary Figure 2: ChIP analysis of RNA polymerase II binding to promoter or ORF of *ADH1*, *MET17* and *VTC3* in *DST1* and *MED31* mutant contexts at 30°C.

A. ChIP analysis of Pol II in strains bearing *DST1*, *dst1-(1-265)*, *dst1-R200A* in *MED31* wild-type context, grown in rich glucose medium at 30°C. Immunoprecipitation signal over input signal is represented in arbitrary units. All signals were normalized following the rule that signal on *ADH1* promoter in *DST1 med31-Δ* strain represents 10 units. **B.** ChIP analysis of Pol II in *DST1*, *dst1-(1-265)*, *dst1-R200A* in *med31-Δ* background grown in rich glucose medium at 30°C.



Supplementary Figure 3: Colethality between *dst1-Δ* and *rpb1-Δ104* can be rescued by TFIIS domain II and linker.

Various TFIIS truncation mutants of TFIIS were introduced in a *dst1-Δ rpb1-Δ104* strain containing a *URA3 DST1* plasmid and tested for their ability to complement the colethality by growth on 5FOA containing medium.

II Rôle du Médiateur dans la mise en place du PIC *in vivo*

II.1 Contexte du travail

L'ARN polymérase II est incapable d'initier seule la transcription. Elle nécessite la présence des facteurs généraux. L'initiation de la transcription commence par la mise en place du complexe de préinitiation (PIC), qui apparaît comme une étape séquentielle *in vitro*. Cependant, la présence de complexes coactivateurs pourrait influencer l'assemblage du PIC *in vivo*.

Le Médiateur qui a été initialement purifié chez *S. cerevisiae*, permet de moduler le niveau de transcription en réponse aux signaux de régulation positif ou négatif. *In vitro*, il est nécessaire à l'activation de la transcription en réponse aux activateurs spécifiques, il augmente le niveau de la transcription basale et stimule l'activité kinase de TFIIH (Kim et al., 1994). *In vivo*, le Médiateur est requis pour la transcription de la quasi totalité des gènes de *S. cerevisiae* (Holstege et al., 1998). Les analyses temporelles de mise en place du PIC montrent qu'il lie le promoteur des gènes avant les facteurs généraux (Bryant and Ptashne, 2003; Park et al., 2001). De plus, l'altération de son recrutement ou une mutation affectant son intégrité empêche la formation du PIC, suggérant ainsi un rôle essentiel du Médiateur dans la mise en place du complexe de préinitiation. Enfin, une étude à grande échelle d'interaction génétique montre des liens du module de Tête du Médiateur avec Pol II, TFIIF et TFIIH (Collins et al., 2007).

Afin de découvrir comment le Médiateur peut augmenter le niveau de la transcription basale, stimuler la transcription et la phosphorylation du CTD par TFIIH, et comment il peut influencer la mise en place du PIC, nous avons étudié le rôle d'une sous-unité essentielle et conservée du module de Tête du Médiateur : Med11. Nous avons identifié par double-hybride une interaction entre Med11 et un domaine conservé de Rad3, une hélicase du complexe TFIIH. Nous avons ensuite confirmé cette interaction par co-immunoprécipitation de protéine (CoIP) sur les protéines entières.

Pour étudier le rôle de cette interaction et la fonction de Med11, nous avons réalisé une mutagénèse aléatoire de la protéine suivie d'un crible de thermosensibilité. Elle nous a permis d'obtenir huit mutants ponctuels, répartis sur l'ensemble de la protéine. Nous avons alors caractérisé ces mutants par double-hybride entre Med11 et ses partenaires : Med17, Med22 et Rad3. Nous avons ainsi identifié trois mutants particulièrement intéressants pour la compréhension des mécanismes mis en jeu par le Médiateur : le mutant *med11-T47A* qui est

spécifiquement affecté pour l'interaction avec Rad3 (TFIIH), le mutant *med11-G108S* qui est spécifiquement affecté pour l'interaction avec Med17 (Médiateur) et le mutant *med11-L82P* qui est affecté pour toutes les interactions testées (Rad3, Med17 et Med22). Après avoir confirmé le défaut d'interaction entre Med11-T47A et Rad3 par CoIP, nous avons vérifié dans les trois mutants (*med11-T47A*, *-L82P* et *-G108S*), l'intégrité du Médiateur et la capacité du complexe à interagir avec Pol II. Nous avons observé que seul le mutant présentant un défaut pour toutes les interactions connues de Med11 (*med11-L82P*), affecte l'intégrité du module. Ceci est en accord avec le rôle central de Med11 dans la structure du module Tête (Takagi et al., 2006). Par contre les trois mutants sont toujours capables d'interagir avec l'ARN polymérase II. Néanmoins, une analyse des effets de ces mutations sur la transcription par RT-PCR (« Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ») montre qu'à 37°C, ces trois mutants sont affectés dans la quantité des ARN messagers testés.

Ces trois mutants nous ont ensuite permis d'étudier le rôle du Médiateur dans la mise en place du PIC. Après nous êtres assurés qu'ils n'affectent pas le niveau d'expression de protéines clefs de la transcription, nous avons étudié par ChIP l'assemblage du PIC. La protéine TBP et le Médiateur se fixent normalement sur le promoteur des gènes étudiés. Par contre, les trois mutants réduisent l'occupation des derniers intervenants du PIC : Pol II, TFIIE et TFIIH. De façon surprenante, contrairement à la séquence d'assemblage établie *in vitro*, le mutant *med11-G107S* qui est spécifiquement affecté dans l'interaction entre Med11 et Med17, présente un défaut d'occupation de Pol II sans affecter ceux de TFIIE et TFIIH. Ceci suggère un recrutement indépendant de ces trois facteurs. Le mutant *med11-T47A* qui est affecté dans l'interaction avec Rad3, réduit spécifiquement le niveau d'occupation du module TFIIK. Ceci suggère que l'interaction entre le Médiateur et Rad3 est importante pour la stabilisation et l'association des sous-complexes de TFIIH. Enfin, le mutant *med11-L82P* qui est affecté pour toutes les interactions testées, réduit l'occupation de Pol II, TFIIE et de l'ensemble du complexe TFIIH sur la chromatine. Ces trois mutants indiquent que le Médiateur influence la mise en place du PIC en favorisant indépendamment l'occupation de Pol II et de TFIIH/TFIIE et en stabilisant l'association entre TFIIK et le cœur de TFIIH.

Enfin, TFIIH phosphoryle le CTD de Pol II par l'intermédiaire de son module TFIIK. Cette étape est essentielle dans la transition entre l'initiation et l'élongation de la transcription. Nous avons donc analysé l'effets des mutants de Med11 sur la phosphorylation du CTD, *in vivo*. Nous avons ainsi pu remarquer, en accord avec la baisse du niveau d'occupation du module TFIIK sur le promoteur du gène *ADH1*, que le niveau de phosphorylation du CTD diminuait dans le mutant *med11-T47A*. Une des propriétés du

Médiateur est de stimuler indépendamment de Rad3, l'activité kinase de TFIIK *in vitro* (Guidi et al., 2004; Nair et al., 2005). Nous nous sommes alors assurés que le mutant Med11-T47A, n'était pas affecté dans cette activité.

L'ensemble de ces résultats indiquent que le Médiateur influence l'assemblage du PIC en favorisant l'occupation de Pol II indépendamment de TFIIH et TFIIE, et en stabilisant le complexe TFIIH. Il permettrait ainsi de stimuler la transcription et la phosphorylation du CTD *in vivo*.

II.2 Article 2

Mediator-dependent recruitment of TFIIH modules in preinitiation complex.

Cyril ESNAULT[1], Sylvain BRUN[1,4], Julie SOUTOURINA[1], Nynke VAN BERKUM[2], Claire BOSCHIERO[1], Frank HOLSTEGE[2] and Michel WERNER[1,3]

[1]CEA, iBiTec-S, F-91191 Gif-sur-Yvette cedex, France.

[2]Department of Physiological Chemistry, University Medical Center Utrecht, Universiteitsweg, Utrecht, The Netherlands

Short title: Mediator role in TFIIH and TFIIE recruitment.

[3]Corresponding author:

Telephone: 33-(0)1 69 08 93 42

FAX: 33-(0)1 69 08 47 12

E-mail: michel.werner@cea.fr

[4]Present address: Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, Université Paris Sud, F-91405 Orsay cedex, France.

Summary

In vitro, without Mediator, the association of general transcription factors (GTF) and RNA polymerase II (Pol II) in preinitiation complex (PIC) occurs in an orderly fashion. In this work, we explore the *in vivo* function of Mediator in GTFs recruitment to PIC. We identified a direct interaction between Med11 head Mediator subunit and Rad3 TFIIH subunit. We explored the significance of this interaction and those of Med11 with Med17 and Med22 head module subunits and found that impairing these interactions could differentially affect the recruitment of TFIIH, TFIIE and Pol II in PIC. We also found that a *med11* mutation that altered promoter occupancy by TFIIK kinase module of TFIIH reduced Pol II CTD serine 5 phosphorylation. We conclude that the Mediator head module plays a critical role in TFIIH and TFIIE recruitment in PIC. We identify steps in PIC formation that suggest a branched assembly pathway.

Introduction

In eukaryotes, RNA polymerase II (Pol II) is responsible for the transcription of coding genes and a large number of non-coding RNAs. The first step in transcription activation is the recognition of DNA motifs by activators that trigger the recruitment of co-activators, general transcription factors (GTFs) and ultimately Pol II to form a preinitiation complex (PIC).

The pathway to the formation of PIC was initially investigated *in vitro* using a reconstituted system with template DNA, purified Pol II and GTFs (Buratowski et al., 1989; Ranish and Hahn, 1996). It was shown that a system consisting of TFIIA, -B, -D, -E, -F and -H GTFs, in addition of Pol II and promoter DNA, was sufficient to drive transcription at a basal level. An order of assembly of GTFs was determined with TFIID binding promoter DNA first, then TFIIA, -B and Pol II associated with TFIIF. Last, TFIIE and -H completed the PIC allowing the transition from transcription initiation to elongation after phosphorylation of the carboxy-terminal domain (CTD) of Pol II largest subunit and DNA strand separation by TFIIH (Akoulitchev et al., 1995; Holstege et al., 1996). In total, five sub-complexes, assembled in a unique order, were identified in the pathway leading to PIC formation.

TFIIH plays an essential role in controlling the transition from transcription initiation to elongation (Holstege et al., 1996). In addition to its role in basal transcription, TFIIH is implicated in transactivation, cell cycle, and nucleotide excision repair (NER) (Fisher, 2005; Zurita and Merino, 2003). It is composed of ten subunits highly conserved from yeast to mammals (Giglia-Mari et al., 2004; Ranish et al., 2004). Low resolution models of TFIIH structure have been obtained for the yeast (Chang and Kornberg, 2000) and human complexes (Schultz et al., 2000). They show an overall

conservation of shape with a ring topped by a protrusion. TFIIH can be separated in two subcomplexes, core TFIIH (cTFIIH) and TFIIK/CAK (in yeast and human, respectively) containing the Kin28/Cdk7 kinase that is responsible for CTD phosphorylation (Feaver et al., 1994; Keogh et al., 2002). Core TFIIH contains two helicases of opposite polarities Rad3/XPD and Ssl2/XPB that are both implicated in human autosomal recessive disorders such as xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD). These syndromes are due to defects of TFIIH in one of its enzymatic or other structural functions, which might inhibit not only NER but also transcription (Egly, 2001; Zurita and Merino, 2003). XPB/Rad25 and XPD/Rad3 play a crucial role in the two pathways, NER and transcription initiation (Egly, 2001; Guzder et al., 1994a; Guzder et al., 1994b). In addition, XPD subunit bridges the core and CAK modules of TFIIH (Drapkin et al., 1996; Reardon et al., 1996), and stimulates transcription by anchoring the CAK module (Tirode et al., 1999).

Even though DNA, Pol II and GTFs are sufficient to drive basal transcription *in vitro*, they are unable to respond to activators. This observation supported the notion that a co-activator was needed for the response to DNA-binding activator and prompted the purification of Mediator from yeast (Flanagan et al., 1991; Kelleher III et al., 1990; Kim et al., 1994). Independent genetic evidence led to the finding that Pol II can be found associated with Mediator suggesting that it activates transcription by recruiting the enzyme to activated promoters (Koleske and Young, 1994). Importantly, a mutation in Med17 Head subunit of Mediator shuts down the expression of nearly all yeast genes transcribed by Pol II indicating that it is generally required for class II transcription (Holstege et al., 1998). Later on, Mediator was isolated from different animal models on the basis of its association with transcription activators (Conaway

et al., 2005). *In vitro* studies of the function of Mediator indicated that it stimulates basal transcription and TFIIH kinase activity on serine 5 of CTD that is a key event for promoter clearance and for the disruption of Mediator and Pol II interaction (Kim et al., 1994; Guidi et al., 2004; Nair et al., 2005; Sogaard and Svejstrup, 2007). In addition, Mediator and TFIID were found to stabilize each other in PIC and stimulate TFIIB assembly (Baek et al., 2006; Johnson et al., 2002).

In *Saccharomyces cerevisiae*, Mediator comprises 25 subunits (Bjorklund and Gustafsson, 2005; Guglielmi et al., 2004) most of which are conserved in fungi, plants and animals (Boube et al., 2002). The overall structural organization of Mediator is conserved in *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammals with four modules termed the head, the middle, the tail and the Cdk8 module (Dotson et al., 2000; Elmlund et al., 2006). Numerous transcription activators interact with the tail module possibly to recruit the complex to promoters (Bjorklund and Gustafsson, 2005). The Cdk8 module is thought to have a mostly repressive role (Bjorklund and Gustafsson, 2005). The middle and head modules surround Pol II and interact with some of its subunits (Davis et al., 2002). The head module is essential for the interaction with Pol II and for basal and activated transcription (Takagi et al., 2006; Takagi and Kornberg, 2006).

The order of recruitment of various components involved in PIC formation was investigated *in vivo* in *S. cerevisiae* and *Drosophila* (Bhoite et al., 2001; Bryant and Ptashne, 2003; Cosma et al., 1999; Park et al., 2001). In both organisms, Mediator was recruited before Pol II and the GTFs suggesting that it is required for their binding. In addition, mutations that abolish the recruitment of Mediator or grossly affect its head module prevent the association of the GTFs (Bhaumik et al., 2004; Takagi et al., 2006). However, current studies do not allow to decide if *in vivo* the

GTFs and Pol II are assembled in the PIC in a stepwise fashion as they are *in vitro* and how Mediator stimulates this process.

In this work, we found a direct interaction between a head Mediator subunit and a TFIIH core subunit. We found that this interaction is important for the association of TFIIK module of TFIIH to promoters. We also show *in vivo* that the recruitment of TFIIH and TFIIE to PIC can occur independently of Pol II in a Mediator-dependent fashion. Based on our observations, we propose that several pathways for the assembly of GTFs leading to PIC formation coexist *in vivo*.

Results

Med11 Mediator subunit interacts with Rad3 subunit of TFIIH.

To better understand Mediator organization and function, we screened its subunits for protein-protein interactions in the two-hybrid system with a yeast DNA fragments library (Fromont-Racine et al., 1997). Interactions between Mediator subunits were previously reported (Guglielmi et al., 2004). Additional interactions between Mediator subunits and proteins belonging to other nuclear complexes were found in this screen. In particular, Med11, a 131 amino acid subunit of Mediator head (Gustafsson et al., 1998) was found to interact with Rad3, one of the two helicases of TFIIH (Figure 1A) suggesting a role for Mediator in TFIIH recruitment. Med11 is essential for yeast survival and is a conserved protein in the eukaryote kingdom (Backstrom et al., 2007; Boube et al., 2002; Sato et al., 2003). It is important for Mediator Head module organization (Takagi et al., 2006). In addition to its interaction with Rad3, Med11 binds Med17 and Med22 in the two-hybrid system (Guglielmi et al., 2004). The 72-256 fragment of Rad3 that interacts with Med11 corresponds to its DEAD_2 domain (according to PFAM database; Figure 1B), a conserved region present in a large number of DNA-binding helicases. Members of this family include proteins of eukaryotic, bacterial and archaeal origins. To confirm the interaction between the two proteins, we coimmunoprecipitated (CoIP) Med11 fused to a TAP tag (Rigaut et al., 1999) and Rad3 fused to a 3HA tag. TAP-Med11 and Rad3-3HA were overexpressed on a 2μ plasmid under the control of *PGK1* promoter in yeast and immunoprecipitated from crude extract with magnetic beads coupled to IgG to retain the TAP tag. The CoIP assay confirmed that Rad3 and Med11 interacted with each other (Figure 1C). This interaction was resistant to 400 mM NaCl.

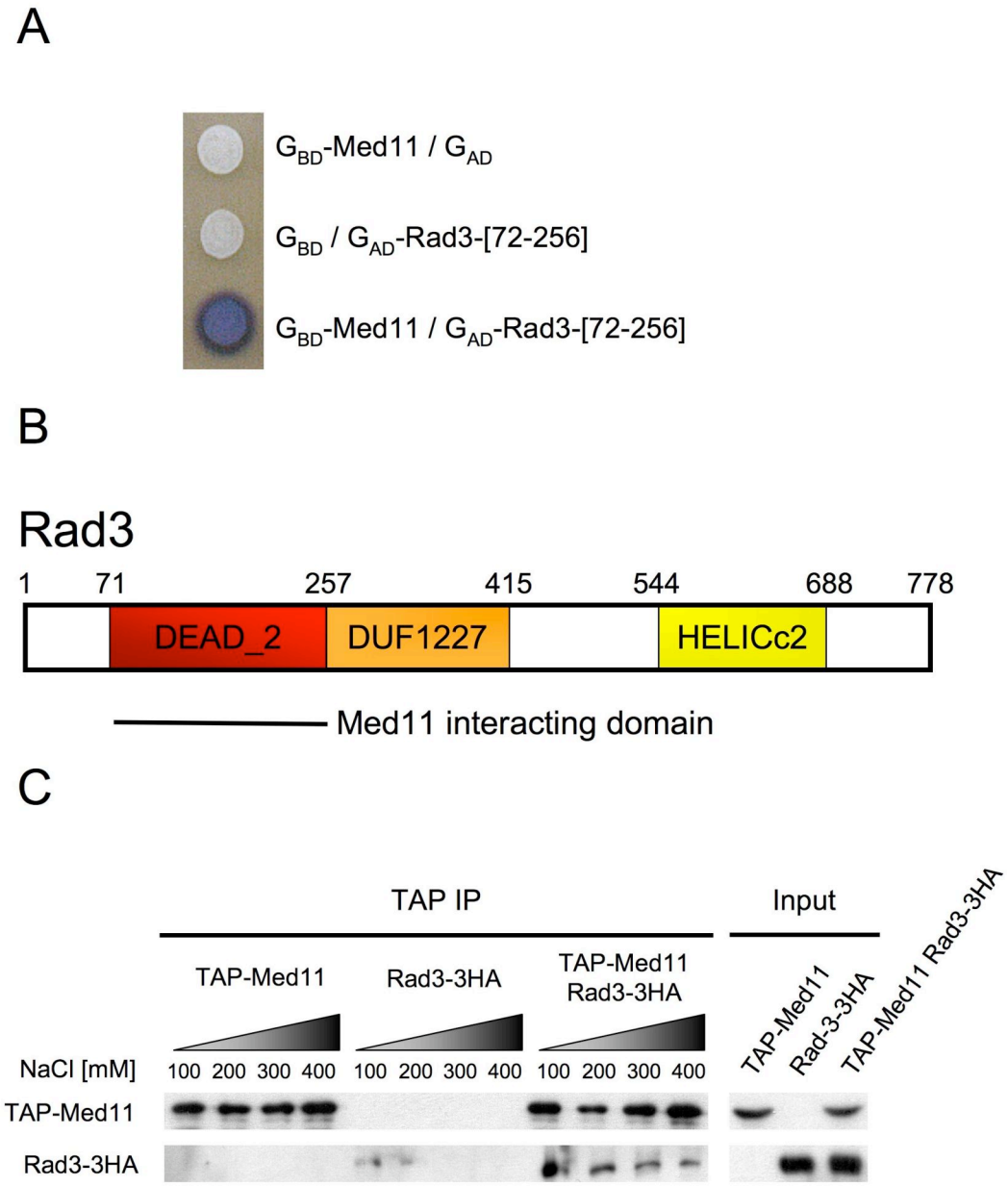


Figure 1. Med11 Mediator subunit interacts with Rad3 helicase of TFIIH.
(A) Two-hybrid interaction between Med11 and Rad3. Two-hybrid assays were performed in Y190 strains transformed by pGBT9, expressing Gal4 DNA-binding domain (G_{BD}) or pGBT9-Med11 (G_{BD}-Med11) and pACTII, expressing the Gal4 activating domain (G_{AD}) or pACTII-Rad3-[72-256] (G_{AD}-Rad3-[72-256]). Interaction activated a *lacZ* reporter gene that was revealed by a blue color in an X-gal overlay assay (Werner et al., 1993).
(B) Rad3 conserved domain organization according to PFAM database (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/). A line indicates the Rad3 interaction domain with Med11.
(C) Coimmunoprecipitation of Med11 and Rad3. Proteins from strains overexpressing TAP-Med11, Rad3-3HA or both proteins were immunoprecipitated with magnetic beads coupled to IgG. The IPs were performed in buffers containing 100 to 400 mM NaCl. After immunoprecipitation, the proteins were revealed by Western blotting using 12CA5 or PAP antibodies, binding respectively to HA or TAP tag.

Mutations of Med11 alter specific interactions with its partners.

To investigate the role of Med11 in PIC organization and to determine the importance of the interaction between Mediator and TFIIH during the initiation step of Pol II transcription, we wanted to obtain mutations affecting specifically one contact at a time between Med11 and its partners. We mutagenized *MED11* by error-prone PCR and introduced the mutated fragment in pVV204 vector bearing the *TRP1* marker by gap-repair in the yCE001 strain in which *med11* deletion is complemented by wild-type *MED11* borne on a *URA3* vector. After chasing the wild-type *MED11* allele on 5-FOA, colonies growing at 30°C were replica plated at 37°C to identify thermosensitives colonies. As an alternative source of *med11* mutants, we separated the three mutations of *med11-1* that were previously obtained (Han et al., 1999). Med11 protein has three conserved domains of unknown function (Figure 2A and S1). In total, we obtained 8 independent mutations distributed along the protein, one in the non-conserved N-terminus, two in Med11 conserved domain 1, two in domain 2 and one in domain 3. In addition, two truncation mutants which eliminated part of domain 3 were selected (Figure 2A). These results indicated that domain 3, though important for Med11 function, is dispensable. The growth of *med11-L82P* and the two truncation mutants was affected at 30°C. These mutants had the strongest growth phenotype at 37°C. The growth of all other mutants, except *med11-Q41R*, which was only marginally affected, was strongly reduced at 37°C (Figure 2B).

We then tested the ability of Med11 mutant subunits to interact with Med17, Med22 and Rad3-[72-256] in two-hybrid assays (Figure 3A). Except for Med11-Q41R, each mutant showed a decreased interaction with at least one partner. The two truncation mutations and the three point mutations in the C-terminal half of Med11 (Med11-V68D, -L82P and -G108S) affected Med17 interactions. This observation suggested

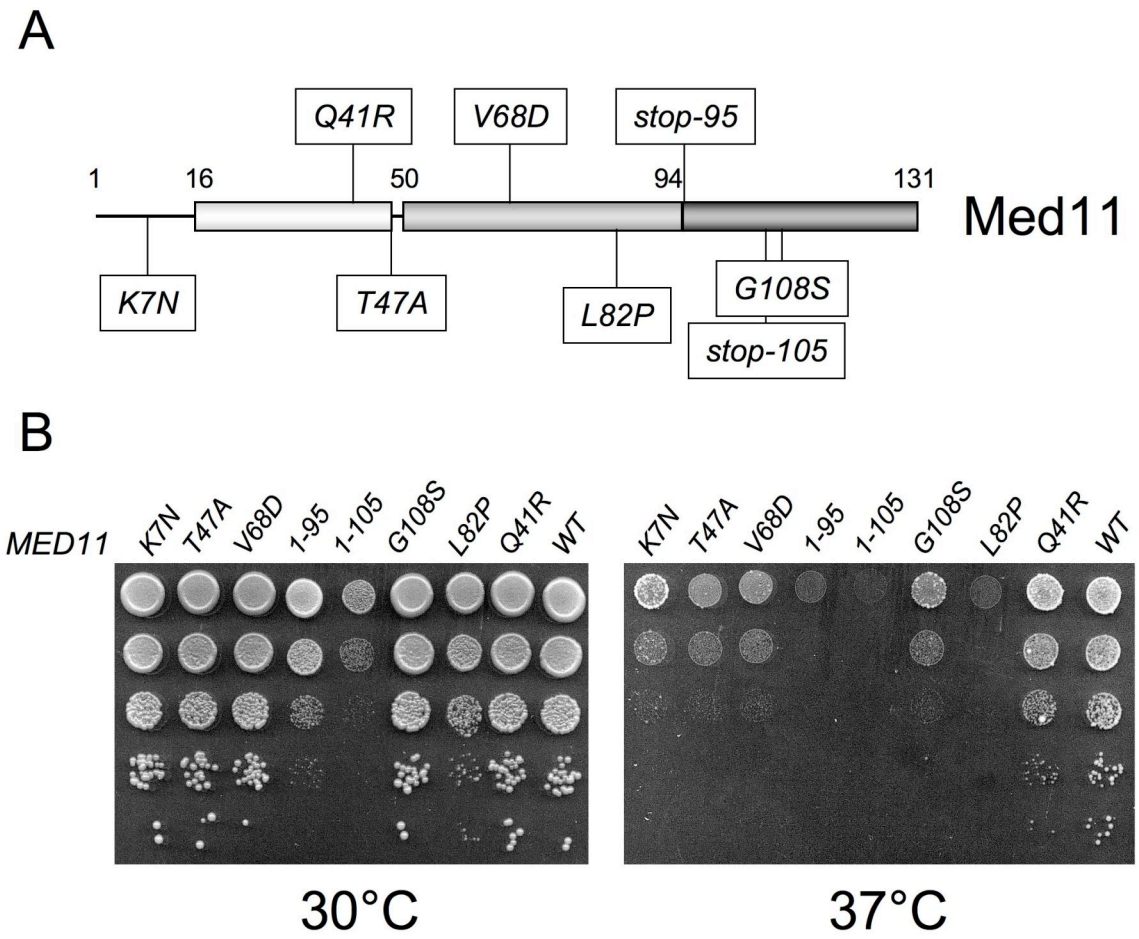


Figure 2. *med11* thermosensitive mutants.
(A) Schematic representation of the localization of Med11 point mutations. The grey boxes indicate the positions of the conserved domains.
(B) Thermosensitive phenotype of the *med11* mutants. Cultures of wild-type (WT) and mutant *med11* yeast strains were serially diluted and spotted on YPD agar plates. Each plate was incubated for 3 days at either the permissive (30°C) or non-permissive (37°C) temperature.

that the Med11 C-terminal half is required to bind Med17. In addition, six mutants were deficient in Rad3 interaction. Med11-[1-95] and Med11-L82P were strongly affected, while four Med11 mutants (Med11-K7N, -T47A, -V68D and -[1-105]) had a milder effect which was quantified by a β-galactosidase assay for Med11-T47A (Figure 3B). Med11-L82P was the only mutant which impaired Med11 association with Med22. To confirm that Med11-T47A was affected in Rad3 interaction, we performed CoIP assays. We immunoprecipitated TAP-tagged wild-type Med11 or Med11-T47A in extracts from strains expressing Rad3-3HA (Figure 3C). In agreement with the two-hybrid assay, the *med11-T47A* mutation impaired Rad3 coimmunoprecipitation with Med11. The other mutants were unaffected in this assay (data not shown).

Three mutants were selected for further study: *med11-G108S* and *med11-T47A,* since they are affected for only one interaction (with Med17 and Rad3, respectively), and *med11-L82P*, which was affected for the interactions with all its partners.

Effect of *med11* mutations on Mediator stability, Mediator interaction with Pol II and mRNA levels.

Since Mediator is required for transcription of nearly all yeast class II genes, we wondered whether the level of GTFs could be affected in *med11* mutants at restrictive temperature. We measured the levels of subunits of complexes belonging to the Pol II transcription machinery by Western blotting using antibodies recognizing their subunits or a 3HA epitope in tagged strains. Protein levels of selected subunits of Mediator (Med15-3HA, Med5-3HA, Med7-3HA, Med21-3HA, Med17-3HA, Med18 and Cdk8-3HA), TFIIH (Ssl1-3HA, Rad3-3HA, Ccl1-3HA and Kin28-3HA), TFIIE (Tfa1-3HA), TBP and Pol II (Rpb1) did not change indicating that the *med11*

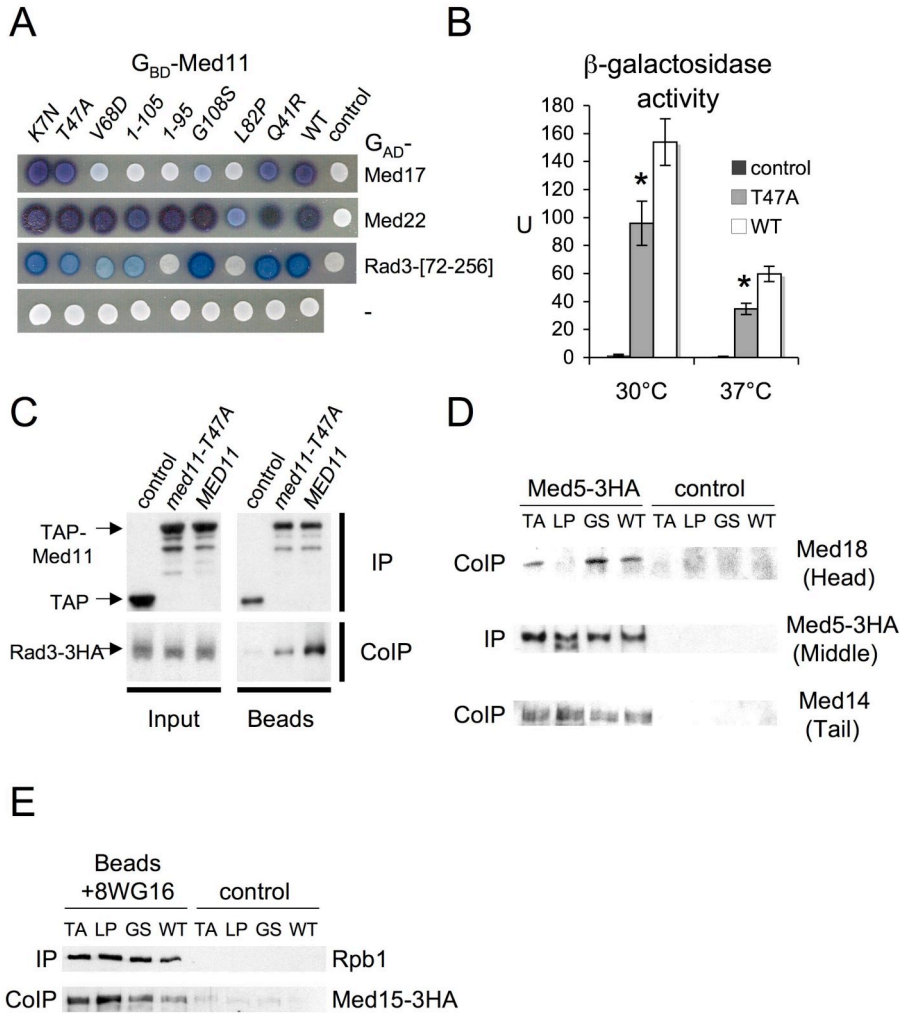


Figure 3. Med11 mutations affect the interactions with its partners.

(A) Effect of the mutations on two-hybrid interactions between Med11 and its partners. Two-hybrid assays were performed in Y190 strains transformed by pGBT9 or pGBT9-Med11 mutants (G_{BD} or G_{BD}-Med11), pACTII, pACTII-Med17, pACTII-Med22 or pACTII-Rad3-[72-256] (G_{AD}, G_{AD}-Med17, G_{AD}-Med22 or G_{AD}-Rad3-[72-256]). The X-Gal agarose assay was performed as in Figure 1. An interaction between Med11 or its mutants and Med17, Med22 or Rad3-[72-256] is indicated by the blue color. A paler shade of blue compared to wild-type indicates a decrease in the strength of interaction between a Med11 mutant protein and its partner.

(B) β-galactosidase activity quantification of the weakened interaction between Med11-T47A and Rad3-[72-256]. β-Galactosidase was assayed according to the Miller method from extract of strains grown at 30°C or at 37°C for 45 minutes (Miller, 1972). Values represent the average of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation. * represent a significant difference between the wild-type and the mutant at p-value < 0,05 in a Student t-test.

(C) Med11-T47A mutation decreases Rad3 coimmunoprecipitation with Mediator. Strains expressing TAP, TAP-Med11 or TAP-Med11-T47A and Rad3-3HA were grown to exponential phase at 30°C. Protein extracts of these strains were immunoprecipitated in a buffer containing 400 mM NaCl with magnetic beads coupled to mouse IgG (Invitrogen). After immunoprecipitation, the proteins were revealed by Western blotting using 12CA5 or PAP antibodies.

(D) Mediator integrity revealed by CoIP in mutant strains. Wild-type and mutant strains were grown 45 min at 37°C. Med5-3HA was immunoprecipitated from cell extracts using magnetic beads coupled to anti-HA antibodies. Co-immunoprecipitations of Mediator subunits were revealed by Western blotting using anti-HA, -Med18 or -Med14 antibody.

(E) Mediator and Pol II coimmunoprecipitated in Med11 mutant strains. Wild-type and mutant strains were grown 45 min at 37°C. Pol II was immunoprecipitated from cell extracts using magnetic beads coupled to an anti-Rpb1 antibody (8WG16). Negative controls were magnetic beads without antibody. After immunoprecipitation, the coimmunoprecipitated proteins were revealed by Western blotting using 8WG16 or 12CA5 antibody.

mutations did not affect the level of the Pol II transcription machinery (Figure S2). Then we checked Mediator integrity by protein coimmunoprecipitation (CoIP) between subunits of head, middle and tail module (Figure 3D). In *med11-T47A*, *med11-G108S* and wild type strain, we observed that Mediator Head and Tail module subunits coimmunoprecipitated with Med5 Middle module subunit. In contrast, in *med11-L82P* mutant that is affected in protein interaction with all Med11 partners, Med18 was undetectable suggesting a head structural defect. Mediator is associated with Pol II in soluble cell extracts (Kim et al., 1994). We wondered if the mutations could alter this association. Pol II was immunoprecipitated with anti-CTD antibodies in extracts from wild-type or *med11* mutant strains expressing Med15-3HA. As shown on Figure 3E, the mutations did not significantly affect Mediator association with Pol II.

We investigated the effect of *med11* mutations after transfer at 37°C on mRNA abundance of five genes (*ADH1*, *PYK1*, *GLT1*, *MET17* and *VTC3*) that are expressed at different levels. All mutants affected the level of *ADH1*, *PYK1*, *VTC3* and *MET17* mRNAs but only marginally that of *GLT1*. As expected from its strong phenotype, *med11-L82P* had the more pronounced defect (Figure S3).

med11 mutations differentially affect Pol II, TFIIE or TFIIH core and kinase modules occupancy

We next asked if *med11* mutations affected the gene occupancy of Mediator, Pol II or the general transcription factors on promoters. To investigate PIC formation, we immunoprecipitated the chromatin (ChIP) prepared from mutant strains grown in YPD rich media for 45 min at restrictive temperature (37°C). Chromatin associated to Mediator was immunoprecipited from a Med5-3HA strain. The association of

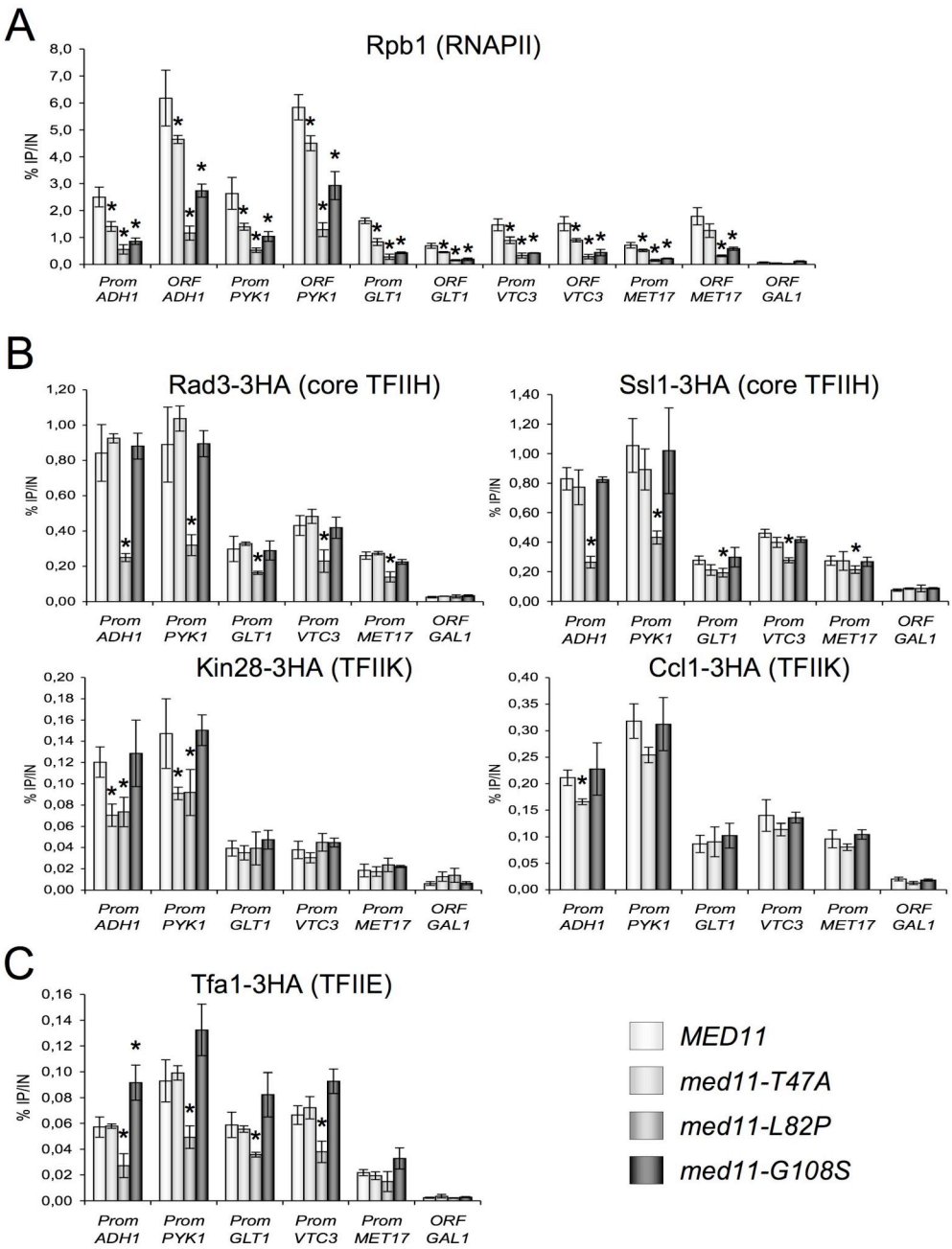


Figure 4. Effect of *med11* mutations on Pol II, TFIIE, core TFIIH and TFIIK occupancy.

Immunoprecipitated fragments from ChIP experiments were amplified with primers as indicated in Supplementary Materials and Methods. The *GAL1* ORF was used as a control. Values represent the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviation and * indicates a significant difference between the wild-type and the mutant at p-value <0.05 in a Student t-test.

(A) Pol II occupancy. Cells were grown on YPD to OD=0.6 at 600 nm, then transferred for 45 minutes to 37°C. Standard ChIP assays were performed on chromatin prepared from WT, *med11-T47A*, *med11-L82P* and *med11G108S* using an antibody against CTD (8WG16).

(B) CTFIIH and TFIIK subunits occupancy. Strains expressing Rad3-3HA, Ssl1-3HA, Kin28-3HA or Ccl1-3HA in wild-type or mutant backgrounds were grown for 45 minutes at 37°C. Standard ChIP assays were performed using anti-HA antibody (12CA5).

(C) TFIIE occupancy. Strains expressing Tfa1-3HA in wild-type or mutant backgrounds were grown for 45 minutes at 37°C. Standard ChIP assays were performed using anti-HA antibody (12CA5).

Mediator with the promoters of *ADH1*, *PYK1*, *GLT1*, *VTC3*, *MET17* remained unchanged (Figure S4A). *GAL1* open reading frame (ORF) was used as a negative control since this gene is repressed in YPD. TBP occupancy in *med11* mutants and the wild type strains were similar (Figure S4B).

Rpb1-associated chromatin was immunoprecipitated with 8WG16 anti-CTD antibody (Figure 4A). *med11-T47A* mutation led to a slight decrease in Rpb1 occupancy (23 to 49% depending on the promoter and ORF) while *med11-G108S* led to a larger defect (55 to 73% decrease). *med11-L82P* had the more pronounced effect on Pol II occupancy (77 to 83% decrease) in line with its severe growth phenotype. *In vitro* and in the absence of Mediator, TFIIH, together with TFIIE, is the last GTF to enter the PIC (Buratowski et al., 1989). Since Mediator and TFIIH contact each other via the Med11-Rad3 interaction, we wondered if some of *med11* mutants could impair TFIIH occupancy on promoters *in vivo*. Two subunits of cTFIIH (Rad3 and Ssl1) and of its CTD kinase module TFIIK (Kin28 and Ccl1) were 3HA-tagged for ChIP experiments. Ccl1 could not be tagged in *med11-L82P* strain since the addition of a 3HA tag was lethal in this genetic background (Figure S5). *med11-L82P* mutant showed the more pronounced defect since the recruitment of cTFIIH and TFIIK on promoters was impaired drastically. Unexpectedly, *med11-G108S* did not affect promoter occupancy by cTFIIH or TFIIK, indicating that Pol II association with promoter is not a prerequisite for TFIIH recruitment *in vivo*. *med11-T47A* mutations did not lead to lower occupancy of cTFIIH but it had an effect as large as that of *med11-L82P* on TFIIK indicating that the two TFIIH sub-complexes were recruited or stabilized independently of each other by Mediator (Figure 4B). Since TFIIE and TFIIH enter the PIC together *in vitro*, we investigated TFIIE occupancy in *med11* mutants. Interestingly, neither the *med11-T47A*, nor the *med11-G108S* mutation

affected Tfa1-3HA binding (Figure 4C), indicating that Mediator is the prime determinant for the recruitment of TFIIE to the PIC *in vivo*.

Med11-Rad3 interaction stimulates CTD phosphorylation *in vivo*

Phosphorylation of Serine 5 of Pol II CTD by TFIIK is an important step for transcription initiation (Akoulitchev et al., 1995) and is activated by Mediator (Guidi et al., 2004; Nair et al., 2005). We found that *med11-T47A* had a defect in TFIIK occupancy on *ADH1* and *PYK1* promoters. We thus wondered if this mutant could decrease CTD phosphorylation. We used an antibody (H14) directed against phosphorylated CTD on serine 5 (Pol II S5P) to look at the Pol II S5P occupancy profile on *ADH1* gene and compared it to that of total Pol II (Figure 5A). We confirmed the decrease of total Pol II occupancy for *med11-L82P* and *med11-G108S* and the slight effect observed in *med11-T47A*. The ratio of Pol II S5P to total Pol II remained unchanged in *med11-L82P* and *med11-G108S* on *ADH1* gene. However, the Pol II S5P to total Pol II ratio was decreased on *ADH1* promoter and ORF in *med11-T47A* in good agreement with the decrease in TFIIK occupancy in this mutant (Figure 5B).

In addition to defective TFIIK association in PIC, *med11-T47A* could also affect the CTD kinase stimulatory activity of Mediator. To test this possibility, we set up a CTD phosphorylation assay containing TFIIH, recombinant GST-CTD, labeled ATP and wild-type or mutant Mediator. Cellular extracts in which Med5 was not tagged in wild type or mutant background were subjected to the same immunopurification procedure and used as a negative control in the CTD phosphorylation assays (Figure 5C). Phosphorimager quantification of labeled GST-CTD indicated that stimulation of TFIIH kinase activity by Mediator was identical in *med11-T47A* and wild-type

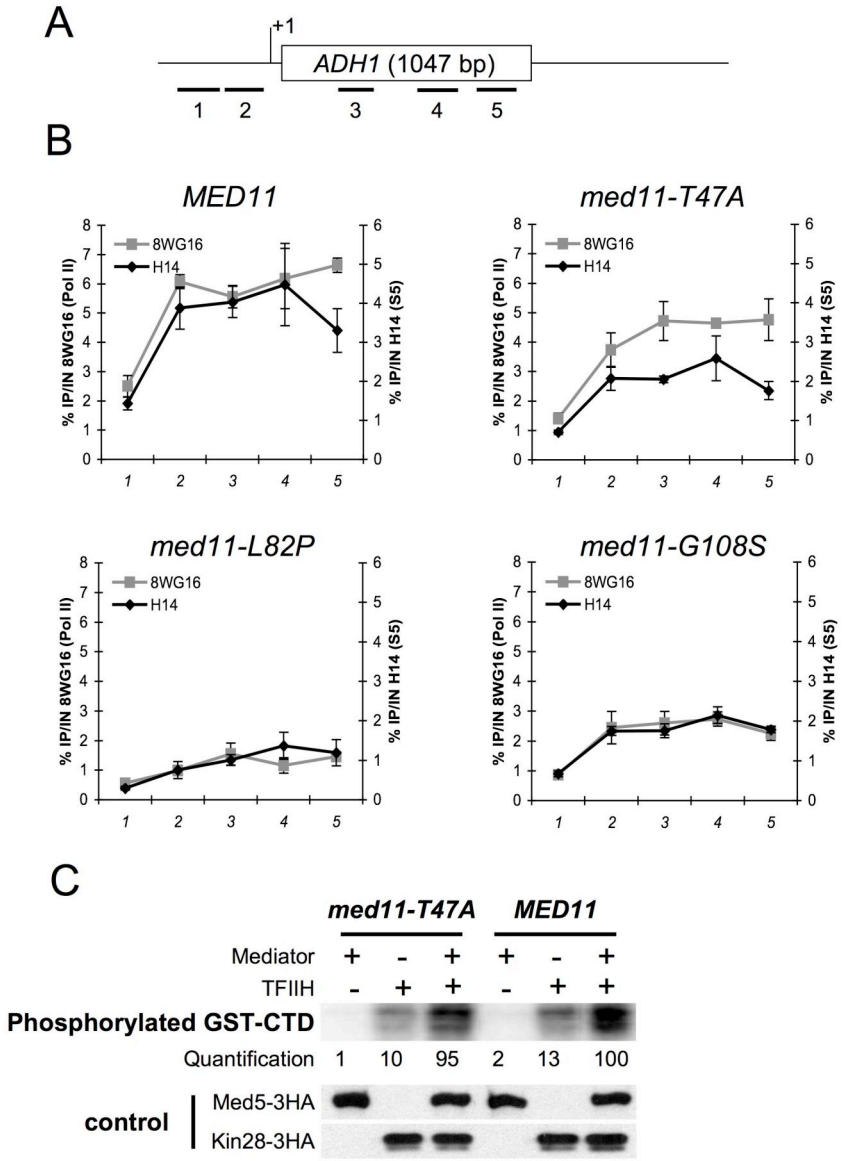


Figure 5. *med11-T47A* mutation affects Pol II phosphorylation.
(A) Schematic promoter and coding region organization of *ADH1*. The location of PCR fragments amplified in ChIP analysis is indicated. The open reading frame (ORF) is indicated as an open box. The vertical line indicates the position of the transcription initiation site.
(B) Profile of total and phosphorylated serine 5 Pol II on *ADH1* in *med11* mutants. Wild-type or mutant cells were grown as in Figure 4. Standard ChIP assays were performed using an antibody against total (8WG16) or against CTD phosphorylated on serine 5 (H14). Values represent the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviation.
(C) Effect of *med11-T47A* mutation on stimulation of CTD phosphorylation by Mediator *in vitro*. Strains expressing Med5-3HA in wild-type or *med11-T47A* background were grown in YPD rich media for 45 minutes at 37°C. Mediator was prepared by immunoprecipitation with anti-HA antibody (12CA5). As a negative control, we applied the immunoprecipitation protocol to untagged wild-type or mutant strains. TFIIH was prepared by immunoprecipitation from a Kin28-3HA strain. An untagged strain was used as a negative control. The phosphorylation assays were performed with immunoprecipitated TFIIH, wild-type or mutant immunoprecipitated Mediator, 4 μg recombinant GST-CTD and [α-^{32}P] ATP for 30 min at 30°C. I**n the bottom panel, protein level in the assay was verified by Western blotting using anti-HA antibody.**

Mediator. This observation demonstrated that the main defect in *med11-T47A* is due to the decreased occupancy of TFIIK on promoters, resulting from a weaker interaction with Rad3.

Discussion

In this work, we discovered a role for the Mediator of transcription activation in the recruitment of TFIIH and TFIIE *in vivo*. We showed that TFIIH and TFIIE general transcription factors can be assembled in PIC intermediates in the absence of Pol II. Moreover, we identified subunits in Mediator and TFIIH that contacted each other and found that their interaction was important for TFIIK kinase module incorporation in the PIC. Altogether, our results demonstrate that Mediator is a key element for the assembly of TFIIH and TFIIE in PIC.

While screening Med11 in the two-hybrid assay with a yeast genomic library, we selected a fragment of Rad3 encompassing the DEAD_2 helicase domain suggesting an interaction between Mediator and TFIIH. Two additional lines of evidence confirm the significance of this protein-protein contact. First, a direct interaction between Med11 and Rad3 could be observed by co-immunoprecipitation of the two proteins from yeast extracts. Second, we could select mutations in Med11 that selectively decreased the interaction between Rad3 and Med11 and led to a diminished TFIIK association with promoters (see below). Interestingly, a recent map of genetic interactions between genes coding subunits of complexes involved in transcription suggested a connection between Mediator head and TFIIH (Collins et al., 2007).

In addition to its interaction with Rad3, Med11 was found to contact two essential head Mediator subunits, Med17 and Med22 (Guglielmi et al., 2004; Kang et al., 2001). None of the mutations that altered the interaction with Med17, Med22 or Rad3, impaired the association of Mediator or TBP with promoters. Conversely, each mutation resulted in a specific pattern of alteration of TFIIH, TFIIE and Pol II

occupancy. We observed that the Med11-L82P mutation, which disrupts the interactions with Med17 and Med22, is affected in the organization of the head module as revealed by the loss of Med18 head subunit in coimmunoprecipitation experiments with Med5 Middle module subunit. Moreover, Med11-L82P presents the strongest phenotype among all the mutants we selected. These observations are consistent with the proposal that Med11, Med17 and Med22 constitute a platform for the assembly of the head Module (Takagi et al., 2006). Med11-G108S impaired the recruitment of Pol II but not that of TFIIE and TFIIH, indicating that these two GTFs can be recruited independently of Pol II. This result is at odds with previous results showing that Pol II association with promoters is required for the recruitment of TFIIE and TFIIH *in vitro* (Buratowski et al., 1989). In this study, the pathway leading to PIC formation was investigated using a system lacking Mediator which might explain the discrepancies between the two studies. Med11-T47A affected the association of TFIIK module of TFIIH. Med11-T47A impaired the protein-protein contact between Med11 and Rad3, that belongs to cTFIIH, suggesting that this contact is important for the recruitment and/or stabilization of TFIIK. This hypothesis fits well with the bridging role of Rad3/XPD between the two modules of TFIIH (Drapkin et al., 1996; Reardon et al., 1996) and is consistent with a role of Rad3/XPD in facilitating optimal transcription by anchoring the CAK subcomplex to the cTFIIH (Tirode et al., 1999). Hence, Mediator could stimulate basal and activated transcription by the stabilization of the full TFIIH complex on promoter. Altogether, these observations strongly argue in favor of a role for Med11, which belongs to a core of essential Mediator subunits, in the recruitment of these complexes. While Pol II interaction with Mediator has been documented extensively (Bjorklund and Gustafsson, 2005), our data support

the notion that Mediator plays a critical role in the recruitment of TFIIH and TFIIE independently of Pol II.

The DEAD_2 domain is highly conserved in eukaryotes. Mutations in the DEAD_2 domain of XPD, the human homolog of Rad3, lead to defects in nucleotide excision repair and in basal and activated transcription (Dubaele et al., 2003). We hypothesize that some of XPD mutations that lead to trichothiodystrophy result from poor interaction between TFIIH and Mediator.

TFIIH plays a critical role in NER, in general, and transcription coupled repair (TCR), in particular (Laine and Egly, 2006). Since Mediator is required for TFIIH association with promoters, one wondered if Mediator could affect its function in repair. We found that none of the *med11* mutations increased the UV sensitivity of the mutant strains (data not shown) indicating that the loading of TFIIH at promoters stimulated by Mediator is not required for repair and suggests that TFIIH can access damaged sites directly.

TFIIH controls promoter clearance by Pol II through its helicase activity that is required for DNA strand separation and through its CTD kinase activity that is stimulated by Mediator (Egly, 2001; Kim et al., 1994). In two mutants, Med11-L82P and -G108S, the amount of total and phophosphorylated Pol II decreased in the same proportion on *ADH1* gene, indicating that the TFIIH kinase activity was unaffected. In contrast, the amount of total and phophosphorylated Pol II decreased in Med11-T47A compared to wild type. This effect could result from the decreased association of TFIIK with promoters and/or from lower kinase activity. *In vitro* assays indicated that the mutation did not impair the kinase stimulatory activity of Mediator. These results suggest that in *med11-T47A*, the decrease in CTD phosphorylation is accounted for by the decreased recruitment of TFIIK.

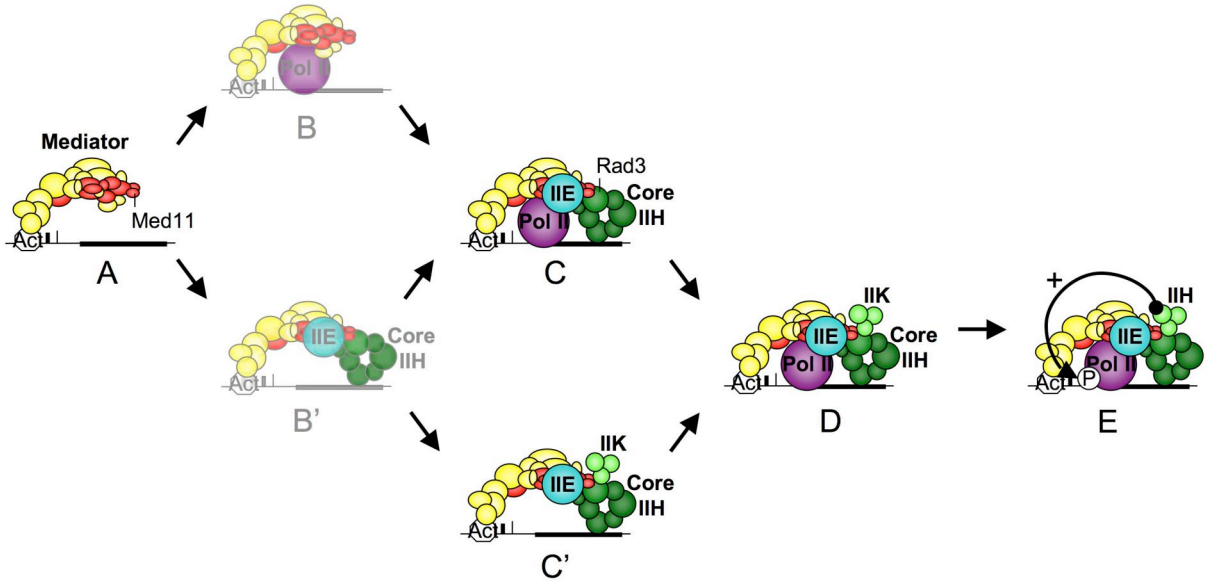


Figure 6. Branched pathway of PIC formation.
The steps leading to PIC formation are depicted in the cartoon. Arrows connect the preinitiation intermediates in a branched pathway leading to PIC formation and Pol II phosphorylation. The intermediates that have been observed are indicated by solid colors. The intermediates that were inferred are indicated by the translucent colors.
The color code used in the following is: red: essential Mediator subunits; yellow: dispensable Mediator subunits; dark green: cTFIIH; light green: TFIIK; blue: TFIIE; violet: Pol II.

Altogether, our results demonstrate that the recruitment of TFIIH and TFIIE is unlinked to that of Pol II and lead us to propose a branched model of PIC formation (Figure 6). Med11-T47A diminished the association of TFIIK to promoters without affecting that of Pol II, TFIIE or cTFIIH. Conversely, Med11-G108S affected Pol II association but not that of TFIIE, cTFIIH or TFIIK suggesting the existence of two PIC intermediate complexes, Mediator•Pol II•TFIIE•cTFIIH (Figure 6C) and Mediator•TFIIE•TFIIH (Figure 6C'). These complexes could lead to a full PIC in a single step by the recruitment of a single factor, TFIIK in the first case, and Pol II in the second. Two hypothetical intermediates could lead to Mediator•Pol II•TFIIE•cTFIIH formation. The first one would entail a complex consisting of Mediator and Pol II (Figure 6B) that has not been observed *in vivo* but can be proposed on the basis of the association of Pol II and Mediator in cell extracts (Kim et al., 1994). The second one would consist of Mediator•TFIIE•cTFIIH as suggested by our observation that TFIIK is not always present simultaneously with cTFIIH (Figure 6B'). Interestingly, this intermediate could also lead to the formation of the Mediator•TFIIE•TFIIH complex by the recruitment of TFIIK.

In conclusion, Mediator appears to play a critical role in PIC assembly at the level of TFIIH and TFIIE recruitment. Several pathways leading to PIC formation may coexist with several intermediates that might be more or less abundant depending on specific promoters. The various pathways leading to PIC formation could be differentially regulated, expanding the repertoire of mechanisms for the regulating gene transcription.

Experimental Procedures

Oligonucleotides

The sequence of the oligonucleotides used in this study can be found in the Supplementary Table 1.

Plasmid constructions and cloning

All cloning were done using the Gateway Invitrogen cloning method. Wild-type *MED11* gene was amplified from YPH499 genomic DNA using oligonucleotides matching the gene sequence initiation codon and following codons for the 5' forward primer and the stop codon and preceding codons for the 3' reverse primer. The oligonucleotides were flanked with *attB1* or *attB2* sequences, respectively. The amplified sequence was cloned into pDONR201 (Invitrogen) using standard BP reaction. The recombinant plasmid was sequence verified. The cloned sequence was then transferred into pVV208 (*CEN URA3 pTetO7*) or pVV204 (*CEN TRP1 pTetO7*) vector (Van Mullem et al., 2003) by the LR reaction. *RAD3* was cloned into pVV221 (*2µ URA3 pTetO7*) and the *MED11* alleles into pVV220 (*2µ TRP1 pTetO7*), pVV212 (derived from pGBT9) and pVV213 (derived from pACTII) using a similar procedure.

K7N, V68D and G108S point mutations in Med11 were obtained by PCR overlap extension mutagenesis (Higuchi et al., 1988), cloned using the Gateway standard method and transferred into pVV204.

Yeast strains

Strains are listed in supplementary Table 2. *MED11* was deleted in YPH499 (*MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-63 lys2-801 leu2-1*) complemented with pVV208-*MED11* and replaced by a Kan-MX6 marker using the standard one-step method (Longtine et al., 1998).

For ChIP experiments, the Med5-3HA, Tfa1-3HA, Ccl1-3HA, Ssl1-3HA, Rad3-3HA and Kin28-3HA strains were derived from yCE001 (*MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-63 lys2-801 leu2-1 med11:Kan-MX6/CEN URA3 pTetO$_7$::MED11*). The tagged strains were obtained by insertion of 3HA epitopes followed by a *his3MX6* marker using the method of Longtine et al (Longtine et al., 1998). The sequence was inserted between the last codon and the stop codon of the target ORF. The yCE001-8 strains were transformed with the pVV204-*MED11*, pVV204-*med11-T47A*, pVV204-*med11-L82P* and pVV204-*med11-G108S* plasmids. The pVV208-*MED11* was then chased on 5-FOA medium.

Random mutagenesis

MED11 was amplified from pVV208-MED11 by PCR with pVV208-forward and pVV208-reverse oligos. After 10 cycles of PCR, 1mM $MnCl_2$ was added and 30 PCR cycles were performed. The PCR products were transformed with pVV204 linearized by *Bsp*E1 in yCE001. The PVV208-MED11 plasmid was counter-selected on 5FOA medium. Colonies of the mutagenized strain were then replicated on YPD at 30°C or at 37°C for three days and thermosensitive mutants were selected. All the plasmids were isolated, re-transformed in yCE001 and sequenced.

Yeast two-hybrid assays

The two-hybrid assays were performed in Y190 (*MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,112 URA3::GAL1::lacZ LYS2::GAL4(UAS)::HIS3 cyhR*). The β-galactosidase activity was revealed by an X-Gal overlay assay (Werner et al., 1993). β-galactosidase was assayed on three clones for each experiment by the classical method of Miller (Miller, 1972).

Coimmunoprecipitations

Whole-cell extracts were prepared from 100 ml of cells growing exponentially in yeast YPD medium. Cells were collected at an optical density of 0.6 to 0.8 at 600 nm (OD_{600}), washed twice with water and twice with lysis buffer (50 mM HEPES [pH 7.5], 100 to 400 mM NaCl, 20% glycerol, 1 mM dithiothreitol [DTT], 0.05% NP-40) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete; Roche) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and resuspended in 0.5 ml of the same buffer. Lysis was performed in the presence of glass beads (0.2 ml, 425 to 600 μm) by vortexing for 30 min at 4°C. The cell debris were eliminated by centrifugation (15 min at 4°C at 18,000 × g, twice). The supernatant was collected and stored at −80°C.

During the immunoprecipitation procedure, the incubations and washes were performed at 4°C with agitation. A total of 2×10^7 anti-mouse immunoglobulin G (IgG)-magnetic beads (Dynal M450) were washed with 0.1% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4) and preincubated for 30 min in 0.1% bovine serum albumin in PBS. We used the beads with 8WG16 antibodies for Pol II, with 12CA5 for Med5-3HA or alone for TAP immunoprecipitation. The 8WG16 antibodies (200 ng/μl) were added for 1 h, after which the beads were washed three times for 5 min and twice shortly with lysis buffer. The protein extracts (15 μg/μl, 100 μl) were incubated with the beads for 3 h,

after which the beads were washed three times (5 min) with lysis buffer. The affinity-purified proteins were released from the beads by boiling for 10 min. Eluted proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and analyzed by Western blotting with 12CA5 anti-HA, PAP Peroxydase anti-Peroxydase, 8WG16 anti-CTD of Rpb1 (Covance) or anti-Med18 and anti-Med14 (gift from R. Kornberg).

Chromatin immunoprecipitation

Crosslinked chromatin was prepared essentially as described previously (Kuras et al., 2003; Kuras and Struhl, 1999). 100 ml cell cultures were grown exponentionally to OD_{600}=0.6, shifted for 45 minutes to 37°C and cross-linked with 1 % formaldehyde for 10 min. The 3HA-tagged proteins were immunoprecipitated with 12CA5 antibody bound to IgG magnetic beads (Dynabead). Pol II was immunoprecipitated with 8WG16 anti-CTD antibody (Covance). Rabbit antibody to recombinant yeast TBP was a gift from A. Weil. Immune complexes were washed as described previously (Kuras and Struhl, 1999). Elution of immunoprecipated chromatin, crosslink reversal and DNA purification were performed as described (Kuras et al., 2003). Immunoprecipitated DNA was analysed by quantitative real time PCR on an ABI Prism 7000 or 7300 machine (Applied Biosystem). The PCR reactions were carried out in 25 µl containing 0.4 µM of each primer, and 12.5 µL of Mastermix SYBR green PCR reaction (Applied Biosystem). Relative quantification using a standard curve method was performed and the occupancy level for a specific fragment was defined as the ratio of immunoprecipitated DNA over total DNA. In each case, three independent experiments were averaged. The corresponding standard deviations

are indicated in the Figures. The cells were cultivated in YPD medium, *GAL1* ORF region was used as a non-transcribed control.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad (Graphpad Software Inc). Differences between mutants and wild type were compared by the student t-test and considered statistically significant at the $P<0.05$ level of confidence. Data are expressed as the mean ± standard deviation.

Kinase assay

TFIIH was immunoprecipitated with 12CA5 anti-HA antibody as described above from yCE002 strain. Strains deriving from yCE006 expressing Med5-3HA in wild-type or *med11-T47A* mutant background were grown for 45 min at 37°C in YPD. Mediator was immunoprecipitated from the extracts with 12CA5 antibody. Immunoprecipitated complexes, TFIIH or Mediator, were eluted in 50 μl of kinase buffer (20 mM Tris pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2.5 mM $MnCl_2$, 1 mM dithiotreitol (DTT)) with 0.5 μg/μl of 3HA peptide. Kinase reactions were then performed with 30 μl of each purified complex supplemented with 10 μCi of [α-^{32}P] ATP and 4 µg of CTD peptide for 30 min at 30°C as previously described (Hermand et al., 1998). As a negative control for CTD phosphorylation stimulation by Mediator, we used immunoprecipitated extracts from mutant strains in which Med5 was untagged. To control for non-specific phosphorylation by TFIIH, we performed the immunoprecipitation procedure from a strain in which TFIIH was not tagged and used the proteins adsorbed non-specifically instead of immunoprecipitated TFIIH.

Acknowledgments

We thank R. Kornberg and A. Weil for antibodies, D. Hermand for strains. We also thank, B. Guglielmi and J.-M. Egly for discussions and A. Sentenac, P. Thuriaux and C. Mann for critical reading of the manuscript. C.E. was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

References

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.

Backstrom, S., Elfving, N., Nilsson, R., Wingsle, G., and Bjorklund, S. (2007). Purification of a plant mediator from Arabidopsis thaliana identifies PFT1 as the Med25 subunit. Mol Cell *26*, 717-729.

Baek, H. J., Kang, Y. K., and Roeder, R. G. (2006). Human Mediator enhances basal transcription by facilitating recruitment of transcription factor IIB during preinitiation complex assembly. J Biol Chem *281*, 15172-15181.

Bhaumik, S. R., Raha, T., Aiello, D. P., and Green, M. R. (2004). In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. Genes Dev *18*, 333-343.

Bhoite, L. T., Yu, Y., and Stillman, D. J. (2001). The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. Genes Dev *15*, 2457-2469.

Bjorklund, S., and Gustafsson, C. M. (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. Trends Biochem Sci *30*, 240-244.

Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D. L., and Bourbon, H. M. (2002). Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. Cell *110*, 143-151.

Bryant, G. O., and Ptashne, M. (2003). Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. Mol Cell *11*, 1301-1309.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. Cell *56*, 549-561.

Chang, W.-H., and Kornberg, R. D. (2000). Electron crystal structure of the transcription and DNA repair complex, core TFIIH. Cell *102*, 609-613.

Collins, S. R., Miller, K. M., Maas, N. L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C. S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M.*, et al.* (2007). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. Nature *446*, 806-810.

Conaway, R. C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., and Conaway, J. W. (2005). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. Trends Biochem Sci *30*, 250-255.

Cosma, M. P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. Cell *97*, 299-311.

Davis, J., Takagi, Y., Kornberg, R., and Asturias, F. (2002). Structure of the Yeast RNA Polymerase II Holoenzyme. Mediator Conformation and Polymerase Interaction. Mol Cell *10*, 409.

Dotson, M. R., Yuan, C. X., Roeder, R. G., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Jiang, Y. W., Li, Y., Kornberg, R. D., and Asturias, F. J. (2000). Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. Proc Natl Acad Sci USA *97*, 14307-14310.

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 U S A *93*, 6488-6493.

Dubaele, S., Proietti De Santis, L., Bienstock, R. J., Keriel, A., Stefanini, M., Van Houten, B., and Egly, J. M. (2003). Basal transcription defect discriminates between xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy in XPD patients. Mol Cell *11*, 1635-1646.

Egly, J. M. (2001). The 14th Datta Lecture. TFIIH: from transcription to clinic. FEBS Lett *498*, 124-128.

Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelsen, C. O., Koeck, P. J., Holmberg, S., Hebert, H., and Gustafsson, C. M. (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 15788-15793.

Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Henry, N. L., and Kornberg, R. D. (1994). Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK. Cell *79*, 1103-1109.

Fisher, R. P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. J Cell Sci *118*, 5171-5180.

Flanagan, P. M., Kelleher III, R. J., Sayre, M. H., Tschoshner, H., and Kornberg, R. D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. Nature *350*, 436-438.

Fromont-Racine, M., Rain, J.-C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. Nature Genetics *16*, 277-282.

Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J. A., Hoogstraten, D., Theil, A., Wijgers, N., Jaspers, N. G., Raams, A., Argentini, M., van der Spek, P. J.*, et al.* (2004). A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. Nat Genet *36*, 714-719.

Guglielmi, B., van Berkum, N. L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H. M., Holstege, F. C., and Werner, M. (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. Nucleic Acids Res *32*, 5379-5391.

Guidi, B. W., Bjornsdottir, G., Hopkins, D. C., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Myers, L. C. (2004). Mutual targeting of mediator and the TFIIH kinase Kin28. J Biol Chem *279*, 29114-29120.

Gustafsson, C. M., Myers, L. C., Beve, J., Spåhr, H., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R. D. (1998). Identification of new mediator subunits in the RNA polymerase II holoenzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem *273*, 30851-30854.

Guzder, S. N., Qiu, H., Sommers, C. H., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S. (1994a). DNA repair gene RAD3 of S. cerevisiae is essential for transcription by RNA polymerase II. Nature *367*, 91-94.

Guzder, S. N., Sung, P., Bailly, V., Prakash, L., and Prakash, S. (1994b). RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription. Nature *369*, 578-581.

Han, S. J., Lee, Y. C., Gim, B. S., Ryu, G. H., Park, S. J., Lane, W. S., and Kim, Y. J. (1999). Activator-specific requirement of yeast mediator proteins for RNA polymerase II transcriptional activation. Mol Cell Biol *19*, 979-988.

Hermand, D., Pihlak, A., Westerling, T., Damagnez, V., Vandenhaute, J., Cottarel, G., and Makela, T. P. (1998). Fission yeast Csk1 is a CAK-activating kinase (CAKAK). Embo J *17*, 7230-7238.

Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucleic Acids Res *16*, 7351-7367.

Holstege, F. C., van der Vliet, P. C., and Timmers, H. T. M. (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*, 1666-1677.

Holstege, F. C. P., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. Cell *95*, 717-728.

Johnson, K. M., Wang, J., Smallwood, A., Arayata, C., and Carey, M. (2002). TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA. Genes Dev *16*, 1852-1863.

Kang, J. S., Kim, S. H., Hwang, M. S., Han, S. J., Lee, Y. C., and Kim, Y. J. (2001). The structural and functional organization of the yeast mediator complex. J Biol Chem *276*, 42003-42010.

Kelleher III, R. J., Flanagan, P. M., and Kornberg, R. D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. Cell *61*, 1209-1215.

Keogh, M. C., Cho, E. J., Podolny, V., and Buratowski, S. (2002). Kin28 is found within TFIIH and a Kin28-Ccl1-Tfb3 trimer complex with differential sensitivities to T-loop phosphorylation. Mol Cell Biol *22*, 1288-1297.

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.

Koleske, A. J., and Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. Nature *368*, 466-469.

Kuras, L., Borggrefe, T., and Kornberg, R. D. (2003). Association of the Mediator complex with enhancers of active genes. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 13887-13891.

Kuras, L., and Struhl, K. (1999). Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. Nature *399*, 609-613.

Laine, J. P., and Egly, J. M. (2006). When transcription and repair meet: a complex system. Trends Genet *22*, 430-436.

Longtine, M. S., McKenzie, A., III, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philipsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast *14*, 953-961.

Miller, J. H. (1972). In Molecular Genetics (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 352-355.

Nair, D., Kim, Y., and Myers, L. C. (2005). Mediator and TFIIH govern carboxyl-terminal domain-dependent transcription in yeast extracts. J Biol Chem *280*, 33739-33748.

Park, J. M., Werner, J., Kim, J. M., Lis, J. T., and Kim, Y. J. (2001). Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. Mol Cell *8*, 9-19.

Ranish, J. A., and Hahn, S. (1996). Transcription: basal factors and activation. Curr Opin Genet Dev *6*, 151-158.

Ranish, J. A., Hahn, S., Lu, Y., Yi, E. C., Li, X. J., Eng, J., and Aebersold, R. (2004). Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIH. Nat Genet *36*, 707-713.

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 U S A *93*, 6482-6487.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat Biotechnol *17*, 1030-1032.

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Banks, C. A., Sorokina, I., Parmely, T. J., Kong, S. E., Jin, J., Cai, Y., Lane, W. S., Brower, C. S.*, et al.* (2003). Identification of mammalian Mediator subunits with similarities to yeast Mediator subunits Srb5, Srb6, Med11, and Rox3. J Biol Chem *278*, 15123-15127.

Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D., and Egly, J. M. (2000). Molecular structure of human TFIIH. Cell *102*, 599-607.

Sogaard, T. M., and Svejstrup, J. Q. (2007). Hyper-phosphorylation of the carboxyterminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. J Biol Chem.

Takagi, Y., Calero, G., Komori, H., Brown, J. A., Ehrensberger, A. H., Hudmon, A., Asturias, F., and Kornberg, R. D. (2006). Head module control of mediator interactions. Mol Cell *23*, 355-364.

Takagi, Y., and Kornberg, R. D. (2006). Mediator as a general transcription factor. J Biol Chem *281*, 80-89.

Tirode, 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.

Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X., and Vandenhaute, J. (2003). Construction of a set of Saccharomyces cerevisiae vectors designed for recombinational cloning. Yeast *20*, 739-746.

Werner, M., Chaussivert, N., Willis, I. M., and Sentenac, A. (1993). Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70 kDa component of TFIIIB. J Biol Chem *268*.

Zurita, M., and Merino, C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIIH complex. Trends Genet *19*, 578-584.

Supplementary data

Supplementary Table 1. Oligonucleotides

	Name	Forward	Reverse
Cloning	*MED11*	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCTTGATGCAGGTTCTCAAT ACGAAG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAA GCTGGGTCTTACTTGGATTTCG AAGGATC
	RAD3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCTTGATGAAGTTTTATATAG ATGATTTACC	GGGGACCACTTTGTACAAGAAA GCTGGGTCTCACTGCATTTCTA TATCTTCATCTTC
	rad3-[72-256]	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCTTGATGTCTCGTACTATG TCTGAAATTG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAA GCTGGGTCCAATGCATCCGTTG TCAAGTC
	RAD3-no_stop	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCTTGATGAAGTTTTATATAG ATGATTTACC	GGGGACCACTTTGTACAAGAAA GCTGGGTCCTGCATTTCTATAT CTTCATCTTC
Mutagenesis	PVV208	ACTAAATTACCGGATCAATTCG	CTAATTACATGATGCGGCCC
ChIP and RT-PCR	PROM *ADH1*	ATAGGCGCATGCAACTTCTT	CATCAGCTCTGGAACAACGA
	ORF *ADH1*	GGGTATTGACGGTGGTGAAG	AAACGTTGATGACACCGTGA
	PROM *PYK1*	CGCACCGTCACAAAGTGTT	TGGGAAGGAAAGGAAATCAC
	ORF *PYK1*	ATGGTTGCCAGAGGTGACTT	TCTGGTTGGTCTTGGGTTGT
	PROM *GLT1*	GAAGCAATAAATTGCCCAAAA	TGGAGACGATTAGTTTGGTGTG
	ORF *GLT1*	GCGTTGGTCCATTCAAGATT	GAGCGCATCCAATTCTTGTT
	PROM *VTC3*	TCGGCGGACTCCAACTATTA	ACAGGGAAAAATGTGCCAAG
	ORF *VTC3*	CCTCCCTGGAAGGATTCATA	CTTTATCCAAGGCCTCCACA
	PROM *MET17*	GGGTTCGAATCCCTTAGCTC	GATGGCGCCTTGACTAACTT
	ORF *MET17*	TACCCCCATCCATACAATGC	GAAGTGGTGGCGTAAATTGG
	ORF *GAL1*	AAAGAAACTTGCACCGGAAA	GGCCCATATTCGCTTTAACA
	ADH1-1	ATAGGCGCATGCAACTTCTT	CATCAGCTCTGGAACAACGA
	ADH1-2	TTCCTTCATTCACGCACACT	AGGGAACGAGAACAATGACG
	ADH1-3	GGGTATTGACGGTGGTGAAG	AAACGTTGATGACACCGTGA
	ADH1-4	GGCTGGAAGATCGGTGACTA	TCAGCGGTAGCGTATTGTTG
	ADH1-5	GGTGCCAAGTGTTGTTCTGA	GACAAGCCGACAACCTTGAT
	25S rRNA	GGTTATATGCCGCCCGTCTTGA	CCCAACAGCTATGCTCTTACTC

Supplementary Table 2. Yeast strains

Name	Tagged protein	Genotype	Reference
Y190		*MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,112 URA3::GAL1::lacZ LYS2::GAL4(UAS)::HIS3 cyhRY*	Harper et al., 1993
YPH499		*MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1*	Sikorski and Hieter, 1989
YPH500		*MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1*	Sikorski and Hieter, 1989
YCE001		*MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2- Δ1 Δmed11::kan / CEN URA3 pTetO7::MED11*	This work
YCE002	Med5-3HA	*MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed11::kan MED5:3HA / CEN URA3 pTetO7::MED11*	This work
YCE003	Med15-3HA	*MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed11::kan MED15:3HA / CEN URA3 pTetO7::MED11*	This work
YCE004	Rad3-3HA	*MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed11::kan RAD3:3HA / CEN URA3 pTetO7::MED11*	This work
YCE005	Ssl1-3HA	*MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed11::kan SSL1:3HA / CEN URA3 pTetO7::MED11*	This work
YCE006	Kin28-3HA	*MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed11::kan KIN28:3HA / CEN URA3 pTetO7::MED11*	This work
YCE007	Ccl1-3HA	*MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed11::kan CCL1:3HA / CEN URA3 pTetO7::MED11*	This work
YCE008	Tfa1-3HA	*MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed11::kan TFA1:3HA / CEN URA3 pTetO7::MED11*	This work

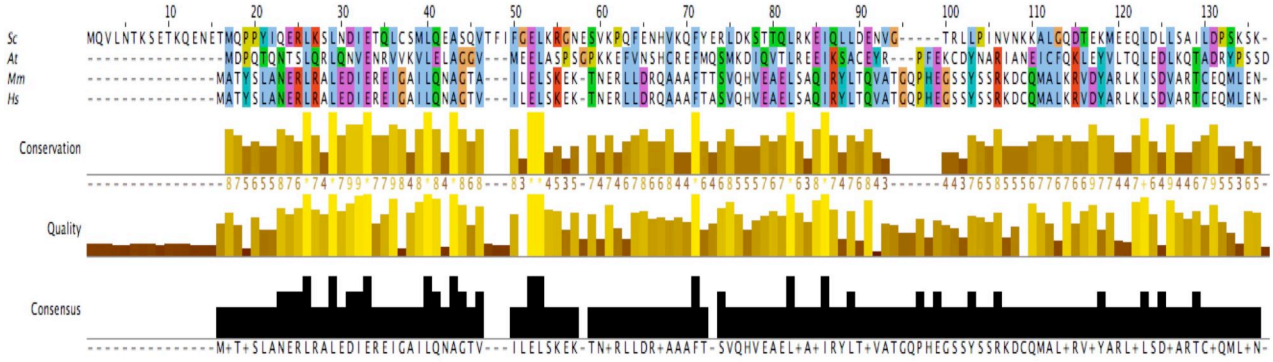


Figure S1. Alignment of Med11 sequences from various species.
The amino acid sequence of Med11 from *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus* and *Homo sapiens* were aligned with the Jalview program (Clamp et al., 2004). The conservation, the quality and the consensus are showed on the bottom of the Figure. Briefly, Conservation is measured as a numerical index reflecting the conservation of physico-chemical properties in the alignment. Quality score is inversely proportional to the average cost of all pairs of mutations observed in a particular column of the alignment. The consensus displayed below the alignment is the percentage of the modal residue per column.

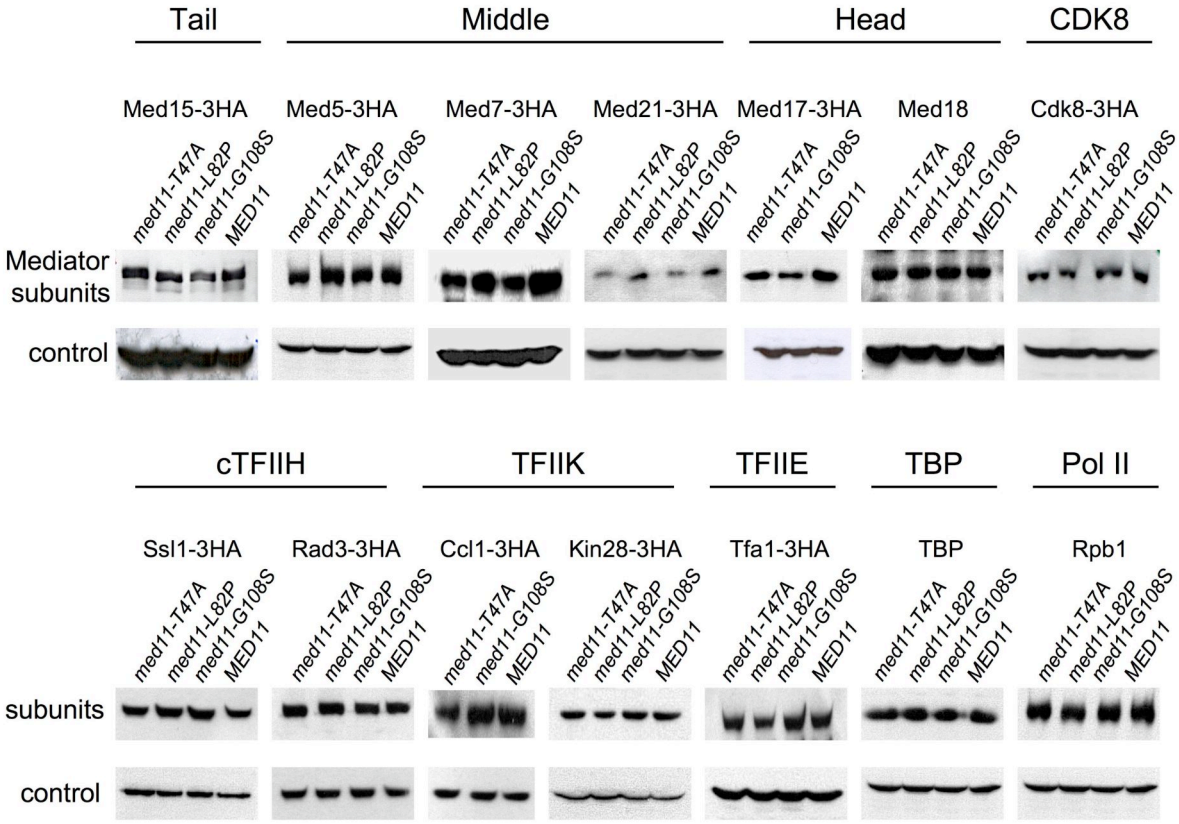


Figure S2. *med11* mutations do not affect the abundance of subunits of the transcription machinery.

Yeast strains were grown for 45 minutes at 37°C. Protein extracts from strains expressing Med5-3HA Med15-3HA, Med7-3HA, Med21-3HA, Med17-3HA, Cdk8-3HA, Tfa1-3HA, Ssl1-3HA, Rad3-3HA, Ccl1-3HA or Kin28-3HA were separated by SDS–PAGE and analyzed by Western blotting using 12CA5 anti-HA antibody. Med18, TBP and Rpb1 levels were assessed using anti-Med18, anti-TBP or anti-Rpb1 antibodies, respectively, in cell extracts from the Med5-3HA strain. Western blots with an antibody against the vacuolar ATPase were performed as a loading controls.

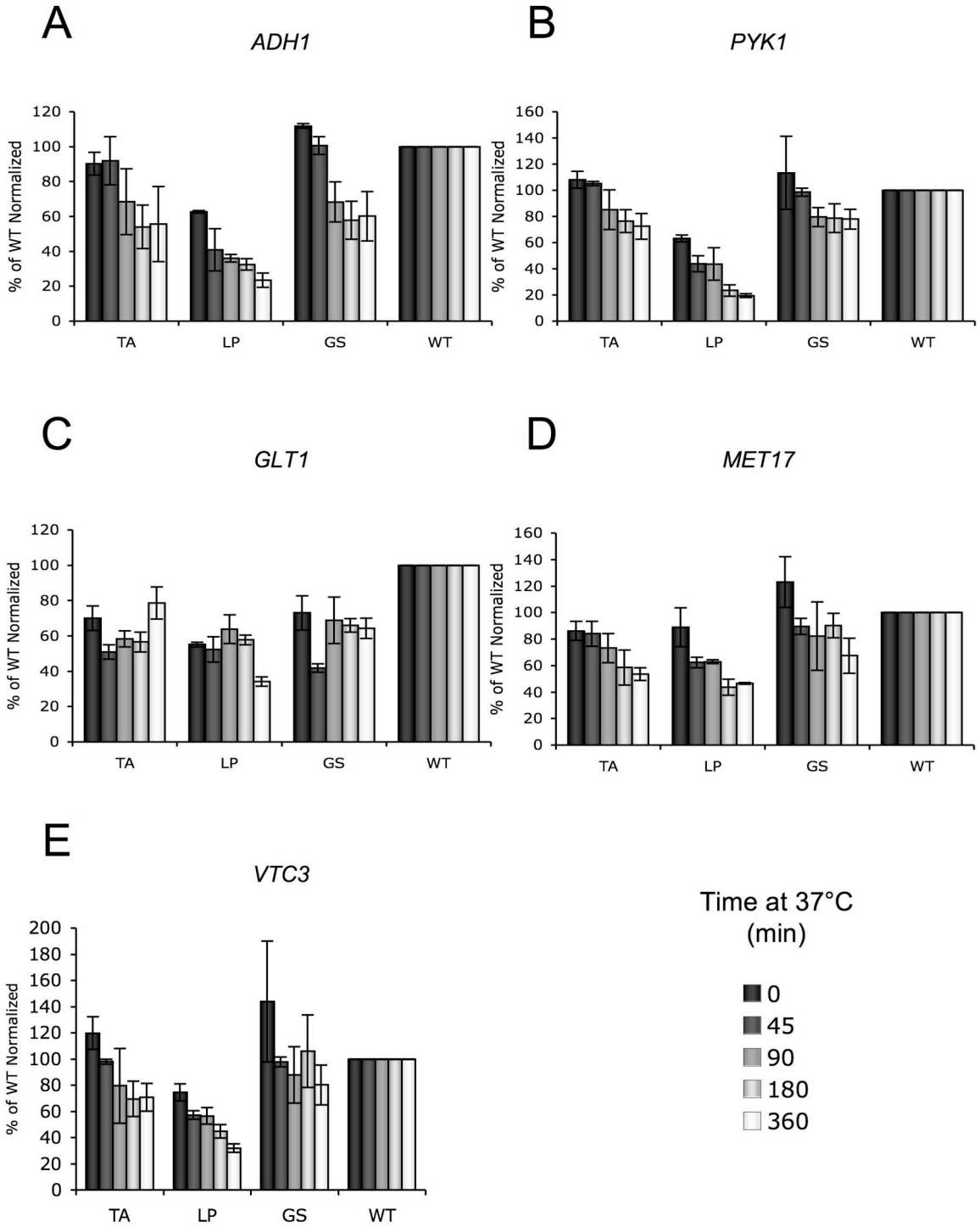


Figure S3. *MED11* alleles influence mRNA abundance after a temperature shift at 37°C.

Yeast strains expressing Med11, Med11-T47A, Med11-L82P or Med11-G108S were grown at 30°C and then shifted for the indicated time at 37°C in YPD medium. mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR. RNA was extracted as described by Schmitt et al. (Schmitt et al., 1990). Reverse transcription of 5 µg RNA samples was performed in the presence of Super Script II and random primers (Invitrogen) for 1-2 h at 42°C in appropriate buffer. Q-PCR results were normalized using 25S rRNA and to the wild-type signal. Values represent the average of two independent experiments, and error bars indicate standard deviations. 25S rRNA was used as internal control for normalization.

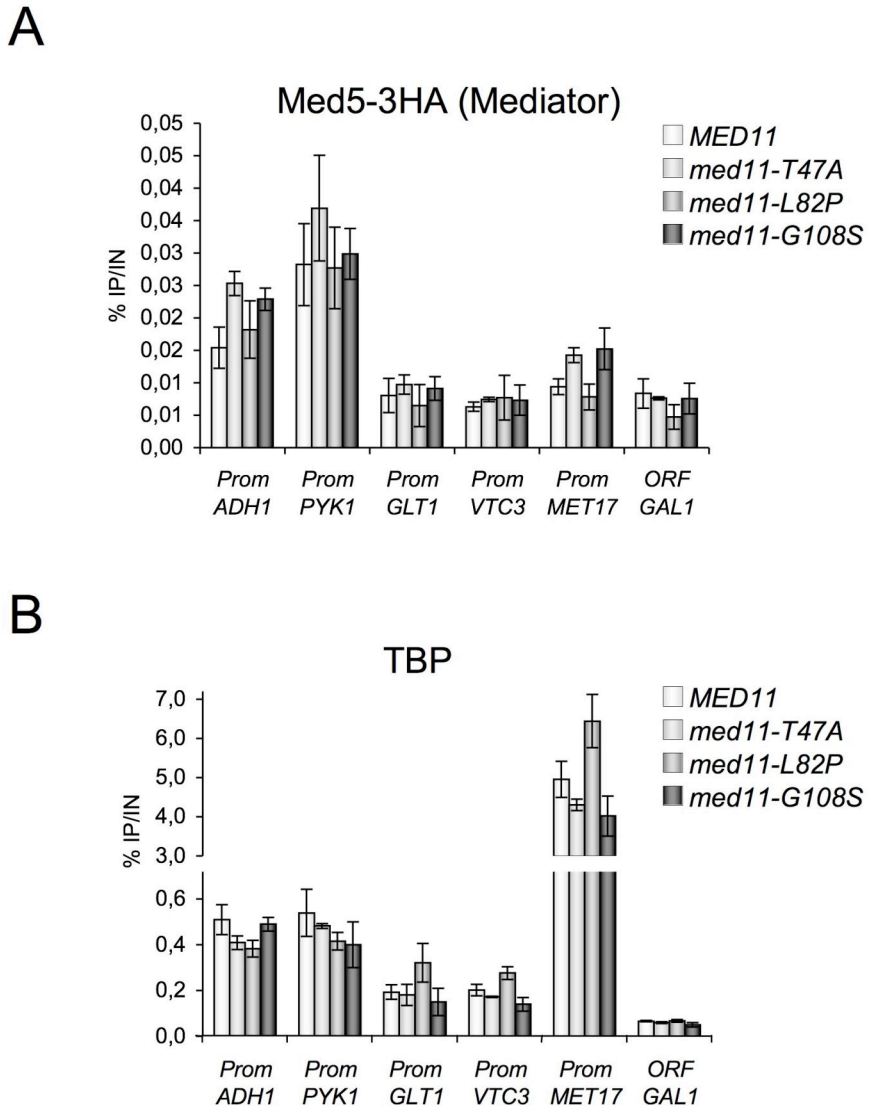


Figure S4. TBP and Mediator occupancy.
Standard ChIP assays were performed on chromatin extracts as previously described in Figure 4A using anti-HA antibody (12CA5). Values represent the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviation. No significant difference between the wild-type and the mutant at p-value <0.05 in a Student t-test was detected in these assays.
(A) Mediator occupancy. Strains expressing Med5-3HA in wild-type or mutant backgrounds were grown for 45 minutes at 37°C.
(B) TBP occupancy. Wild-type or mutant strains were grown for 45 minutes at 37°C.

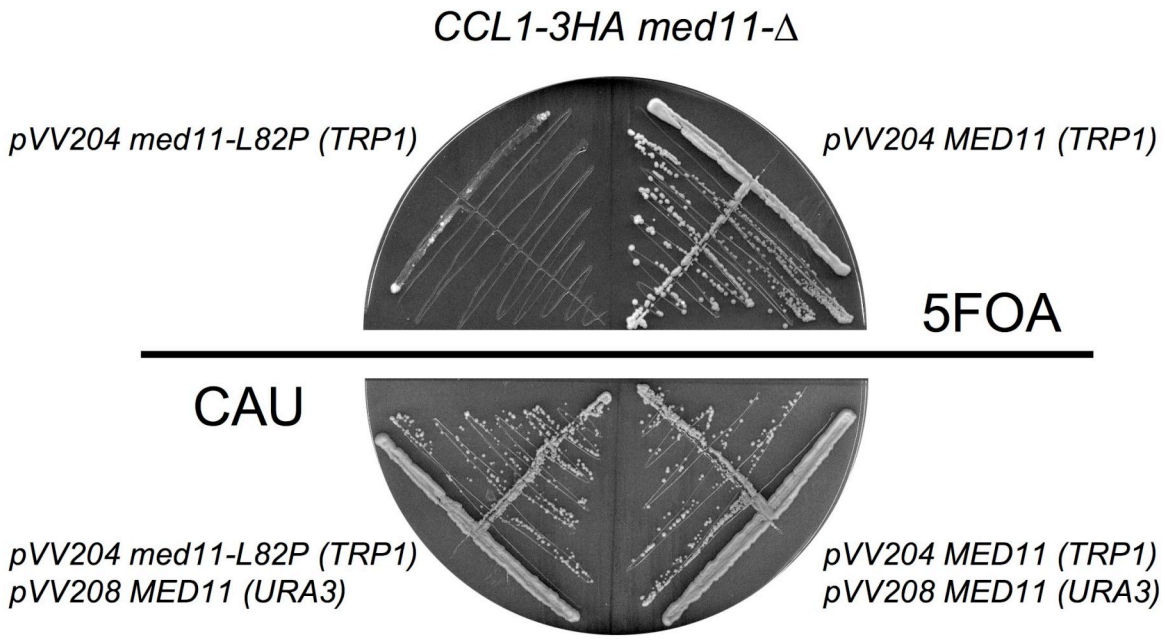


Figure S5. *med11-L82P* and *ccl1-3HA* are colethal.
Yeast strain yCE007 with the indicated genotype carrying plasmids expressing *MED11* or *med11-L82P* were grown on selective medium CAU or on medium containing 5-FOA to select against the wild-type *MED11* plasmid (pVV208; *CEN*, *URA3*). The plates were incubated at 30° for three days.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Rôle de la sous-unité du Médiateur Med31 au cours de l'initiation de la transcription

Un mutant thermosensible de *MED17* a permis de montrer que le Médiateur est requis pour la transcription de l'ensemble des gènes de *S. cerevisiae* (Holstege et al., 1998). La délétion de *MED31* (*med31-Δ*) qui induit un défaut de croissance sur milieu riche (YPD) à 30°C et à 37°C, ne modifie que partiellement l'expression des gènes de *S. cerevisiae* (van de Peppel et al., 2005). Néanmoins, les données acquises au cours de ma thèse suggèrent que TFIIS *via* son interaction avec Rpb1(Pol II) joue un rôle conjoint avec Med31 au cours de l'initiation de la transcription. Il est donc possible que le rôle de Med31 soit de lier directement Pol II afin de promouvoir son recrutement. D'ailleurs, l'occupation de Pol II est très diminuée dans une souche *med31-Δ* (article 1). Afin d'étayer cette hypothèse, une étude réalisée au laboratoire vise à identifier les interactions entre le Médiateur et Pol II grâce à des acides aminés modifiés chimiquement qui permettent un pontage *in vivo* par les rayonnements UV entre les protéines en interactions.

Enfin, une technique de biochimie sur des promoteurs isolés, mise au point dans le laboratoire de Steeve Hahn, permet d'étudier in vitro, l'initiation et la réinitiation de la transcription (Yudkovsky et al., 2000a). Afin de déterminer lequel de ces processus met en jeu Med31, nous pourrions analyser le mutant *med31-Δ* dans ce système.

Une activité de TFIIS au cours de l'initiation de la transcription

Le rôle du facteur TFIIS en élongation de la transcription est bien caractérisé. Au cours de ma thèse, nous avons déterminé un nouveau rôle de TFIIS au cours de l'étape d'initiation.

La délétion de *DST1* est colétale avec celle de *MED31* (*dst1-Δ med31-Δ*) (Malagon et al., 2004). Afin de déterminer quel processus est impliqué dans cette interaction génétique, nous avons analysé cette colétalité. Nous avons remarqué que le domaine II associé au linker est suffisant pour complémenter la double délétion *dst1-Δ med31-Δ*. Le domaine III et le motif RSADE essentiels à l'activité de stimulation de clivage hydrolytique de Pol II au cours de l'élongation, ne sont donc pas mis en jeu. Cette interaction génétique semble donc être liée à un autre mécanisme faisant intervenir le domaine II de TFIIS au cours de l'initiation de la transcription.

In vitro, la mutation ponctuelle du domaine II *dst1-R200A*, affecte l'interaction entre TFIIS et Rpb1(Pol II) (Awrey et al., 1998; Kettenberger et al., 2004). Néanmoins, *in vivo*, ce mutant ne semble pas affecter le rôle de TFIIS au cours de l'élongation, puisque la mutation n'entraine pas de défaut sur MPA. Ce contact semble surtout être important pour l'initiation de la transcription. L'analyse du transcriptome du mutant *dst1-R200A med31-Δ* révèle que la double mutation affecte la transcription de 80 à 90 gènes de *S. cerevisiae*. Surtout, la mutation *dst1-R200A* réduit l'occupation de Pol II aux promoteurs des gènes *ADH1*, *MET17* et *VTC3*, témoignant ainsi du rôle du domaine II de TFIIS dans le recrutement de Pol II. Ceci est renforcé par une étude réalisée sur des promoteurs isolés *in vitro* (Kim et al., 2007). Cette étude montre que TFIIS stimule la mise en place et l'activité du PIC indépendament de son domaine III (Kim et al., 2007).

Au cours de nos expériences, nous avons analysé le recrutement de TFIIS. Nous avons remarqué, en accord avec les rôles du facteur en initiation et en élongation, que TFIIS est présent sur les promoteurs et sur les ORF (phase ouverte de lecture) des gènes étudiés. Les expériences réalisées *in vitro*, révèlent également la présence de TFIIS dans le PIC (Kim et al., 2007). De plus, nous avons constaté que le défaut d'occupation de Pol II n'affecte pas celle de TFIIS. Ceci suggère un recrutement indépendant du facteur. Afin de déterminer à l'échelle du génome le niveau d'occupation de TFIIS et afin d'en analyser les liens avec Pol II, des études de ChIP on chip à haute résolution sont actuellement en cours au laboratoire. Elles permettront d'identifier les gènes cibles du facteur, et de discriminer ses rôles dans les différentes étapes de la transcription.

Le mécanisme de recrutement de TFIIS au promoteur n'est cependant toujours pas déterminé. Un crible double-hybride a révélé des interactions de TFIIS avec Spt8 (SAGA) et Med13 (Médiateur) (Wery et al., 2004). De plus, les études réalisées *in vitro*, montrent un recrutement de TFIIS dépendant de SAGA et du Médiateur (Kim et al., 2007). Afin de préciser le rôle de ces deux coactivateurs dans la fixation de TFIIS au promoteur, nous pourrions utiliser le système d'induction du gène *GAL1*. En effet, TFIIS lie le promoteur de *GAL1* et est requis pour une activation efficace de la transcription (Prather et al., 2005). L'interdépendance et l'ordre d'arrivé des complexes SAGA et Médiateur, sur le promoteur du gène *GAL1* sont connus : SAGA se fixe en premier et favorise le recrutement du Médiateur qui est nécessaire à la mise en place du reste du complexe de préinitiation (Bhaumik et al., 2004; Bryant and Ptashne, 2003). La délétion du gène *SPT20* qui code une sous-unité de SAGA, affecte à la fois le recrutement de SAGA et du Médiateur (Bhaumik et al., 2004). *In vitro*, l'utilisation de ce mutant a permis de déterminer la dépendance de la fixation de TFIIS

à celles du Médiateur et de SAGA. Une étude par ChiP a confirmé cette dépendance *in vivo* (Prather et al., 2005). De même, des mutants des gènes *MED20* et *MED15* qui codent des sous-unités du Médiateur, réduisent le recrutement de TFIIS (Kim et al., 2007; Prather et al., 2005). L'utilisation d'un mutant thermosensible de *MED17* qui réduit spécifiquement le recrutement du Médiateur et pas celui de SAGA (Bhaumik et al., 2004; Takagi and Kornberg, 2006), ou de *MED13* dont la sous-unité codée interagit directement avec le facteur TFIIS, permettrait alors d'étudier specifiquement le rôle du Médiateur dans le recrutement du facteur. Enfin, une analyse cinétique permettrait de préciser l'ordre d'arrivée de TFIIS au cours de la mise en place du PIC.

Enfin, nous avons déterminé que l'association entre TFIIS et Rpb1 est importante pour le recrutement de Pol II au promoteur de certains gènes. Mais TFIIS pourrait occuper d'autres fonctions au cours de l'initiation. Par exemple, au cours de la transition entre l'initiation et l'élongation lorsque Pol II doit se libérer du promoteur et du PIC. Récemment, une étude de biophysique a montré que TFIIS pouvait augmenter la force de l'enzyme afin de favoriser le passage des nucléosomes (Galburt et al., 2007). Cette fonction pourrait également favoriser la libération de Pol II du promoteur. Des expériences semblables de biophysique ou des analyses biochimiques de la progression de la bulle de transcription ou de transcription abortive, semblables à celle qui ont permis de déterminer les rôles de TFIIE et de TFIIH dans ce processus (Holstege et al., 1997), permettraient de tester cette hypothèse.

Rôle du Médiateur dans la mise en place du PIC

In vitro, le Médiateur stimule la transcription basale et activée, et stimule l'activité kinase de TFIIH (Kim et al., 1994). L'analyse de l'activation de la transcription du gène *GAL1* révèle que le Médiateur est essentiel à la mise en place du complexe de préinitiation (PIC) *in vivo* (Bhaumik et al., 2004). Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le contrôle de l'expression génétique par le Médiateur restent mal connu. Au cours de ma thèse, nous avons découvert par double-hybride, une interaction directe entre deux protéines essentielles, Med11 appartenant au Médiateur, et Rad3 appartenant à TFIIH. En parallèle, une étude globale d'interaction génétique suggérait un lien entre la tête du Médiateur et TFIIH (Collins et al., 2007). Par conséquent, afin d'étudier *in vivo*, le rôle du Médiateur dans la mise en place du PIC et dans la phosphorylation du CTD par TFIIH, nous avons réalisé une mutagénèse aléatoire de Med11. Elle nous a permis d'obtenir huit mutants thermosensibles, dont trois sont particulièrement intéressants : le mutant Med11-T47A qui est spécifiquement

affecté dans l'interaction avec TFIIH, le mutant Med11-G108S qui est spécifiquement impliqué dans une interaction avec la protéine du module de Tête du Médiateur Med17, et le mutant Med11-L82P qui est affecté pour toutes les interactions testées (Rad3, Med17 et Med22).

L'analyse par ChIP de l'effet de ces trois mutations sur la mise en place du PIC, a révélé de nouveaux rôles pour le Médiateur. Le mutant Med11-G108S dont l'interaction avec Med17 est altérée, est spécifiquement affecté dans l'occupation de Pol II. Ceci suggère un rôle direct du Médiateur, *via* Med11 ou son interaction avec Med17, sur le recrutement de l'ARN polymérase II. De plus, malgré la diminution de la quantité de Pol II sur le promoteur, les occupations de TFIIE et TFIIH restent inchangées dans ce mutant. Ceci est contraire aux résultats obtenus à partir de travaux de biochimie qui ont permis de définir *in vitro*, une séquence d'arrivée des facteurs généraux. Ces expériences définissaient TFIIE et TFIIH comme les derniers intervenants du PIC (Ranish and Hahn, 1996). Cependant, ces analyses étaient réalisées en absence de coactivateurs sur des matrices d'ADN nues. *In vivo*, nos résultats indiquent que TFIIE et TFIIH peuvent être recrutés ou stabilisés indépendamment de Pol II par le Médiateur. De plus, le mutant Med11-T47A dont l'interaction avec la sous-unité Rad3 de TFIIH est affectée, réduit spécifiquement l'occupation du module TFIIK et le mutant Med11-L82P dont toutes les interactions connues de Med11 sont affectées, réduit à la fois les occupations de TFIIE, TFIIH et de Pol II. L'ensemble de ces données démontre *in vivo*, le rôle du Médiateur dans les recrutements indépendants de TFIIE, TFIIH et Pol II au promoteur.

Au cours de cette analyse, nous avons mis à jour différents intermédiaires de l'initiation de la transcription où le PIC est affecté soit dans l'occupation de Pol II, soit dans celle de TFIIK ou soit dans celles de TFIIE, TFIIH et Pol II. Ceci nous permet de proposer un modèle où le Médiateur stimule la transcription en intervenant sur la mise en place du PIC. Il favorise l'association de TFIIE, des sous-modules de TFIIH et de Pol II au promoteur (Figure 17). Dans ce modèle, le Médiateur lie directement le promoteur des gènes en interagissant avec les activateurs spécifiques. Puis, comme nous le suggèrent les résultats obtenus avec les mutants Med11-G108S et Med11-L82P, il favorise indépendamment les occupations de Pol II, du corps de TFIIH et de TFIIE. Comme nous l'indique le mutant Med11-T47A, le Médiateur favorise également l'association de TFIIK sur le corps de TFIIH. Le Médiateur stimule donc la transcripion en influençant la mise en place du PIC.

L'analyse de la phosphorylation du CTD *in vivo*, révèle que la diminution de TFIIK au promoteur du gène *ADH1* entraine un défaut de phosphorylation du CTD par TFIIH. Nous

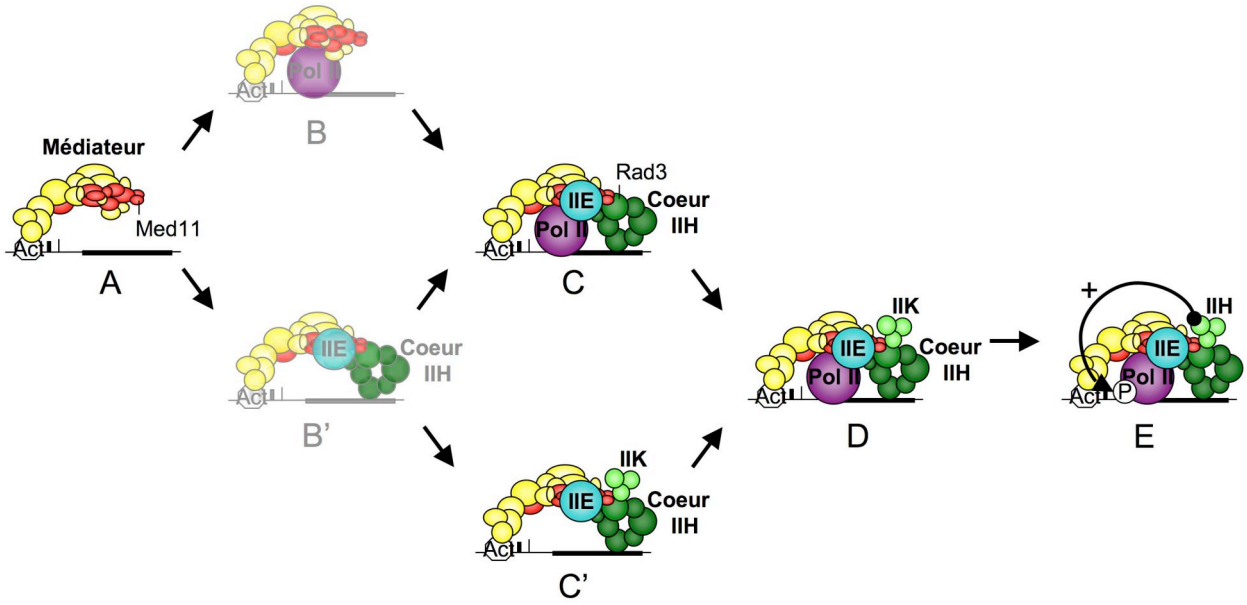


Figure 17: Influence du Médiateur sur l'assemblage du PIC et sur la phosphorylation du CTD. Les différentes étapes qui mènent à la formation du PIC sont présentées dans la figure. Les flèches connectent les différents intermédiaires de la mise en place du PIC et de la phosphorylation du CTD. Les intermédiaires qui ont été observés au cours de l'étude de l'influence des mutations de *MED11* sur l'organisation du PIC sont représentés par des couleurs pleines. Ceux qui sont déduits des intermédiaires observés et d'expériences rapportées dans la littérature, sont indiqués par des couleurs translucides. Les couleurs utilisées sont : le rouge pour les sous-unités essentielles du Médiateur, le jaune pour les sous-unités non-essentielles du Médiateur, le violet pour Pol II, le bleu pour TFIIE, le vert foncé pour le cœur de TFIIH et vert clair pour le module TFIIK.

avons montré que cet effet est dû au recrutement de TFIIK et pas à un défaut de stimulation de l'activité kinase de TFIIH par le Médiateur. Par conséquent, le Médiateur stimule la phosphorylation du CTD en favorisant le recrutement du corps de TFIIH au promoteur, en stabilisant l'association de TFIIK et en stimulant l'activité kinase de TFIIH (Figure 17).

Enfin, des analyses à grande échelle de transcriptome et de ChIP on chip sur TFIIH, sur TFIIE et sur les différentes formes phosphorylées de Pol II, permettraient de déterminer si les mécanismes que nous avons mis en évidence sont spécifiques aux gènes que nous avons étudié, ou s'il s'agit de mécanismes généraux.

Rôle de l'interaction entre le Médiateur et TFIIH

Au cours de ma thèse, nous avons découvert une interaction entre le Médiateur et TFIIH *via* les sous-unités Med11 et Rad3. Cette interaction met en jeu le domaine conservé DEAD_2 de Rad3 (Banque de données PFAM). Le mutant Med11-T47A qui est spécifiquement affecté dans cette interaction, entraine une diminution de l'occupation du module TFIIK sur le promoteur des gènes *ADH1* et *PYK1*, mais pas du cœur de TFIIH. Ceci suggère donc que le Médiateur stabilise l'association des sous-complexes de TFIIH en interagissant directement avec Rad3. Par ailleurs, il a été montré que la sous-unité XPD/Rad3 sert de pont entre les deux modules de TFIIH, et que XPD/Rad3 stimule la transcription en ancrant le module CAK/TFIIK (Drapkin et al., 1996; Reardon et al., 1996; Tirode et al., 1999). Le Médiateur favoriserait donc l'association de CAK/TFIIK au cœur de TFIIH *via* XPD/Rad3 et stimulerait la phosphorylation du CTD et la transcription.

Quatre des mutations de la sous-unité XPD qui sont impliquées dans les maladies : XP et TTD et qui ont été caractérisées biochimiquement, entrainent un défaut de la transcription basale et activée (Dubaele et al., 2003; Egly, 2001). Deux d'entre elles déstabilisent le complexe et l'association du module CAK/TFIIK. Le phénotype des deux autres, XPD-G47R et XPD-G112H, n'a pas été expliqué (Dubaele et al., 2003) (Figure 18). Elles témoignent d'une fonction de XPD/Rad3 au cours de la transcription, autre que celui de l'ancrage de CAK/TFIIK. L'effet de la mutation XPD-G47R pourrait s'expliquer par une perte de l'activité ATPase de XPD, puisque la Glycine 47 interagit avec l'ATP dans le modèle structural de la protéine (Bienstock et al., 2003). Néanmoins, la glycine 112 qui se situe au niveau d'une boucle située en périphérie de la protéine, pourrait être impliquée dans une interaction protéine-protéine. Puisque cette mutation se situe au niveau de la région

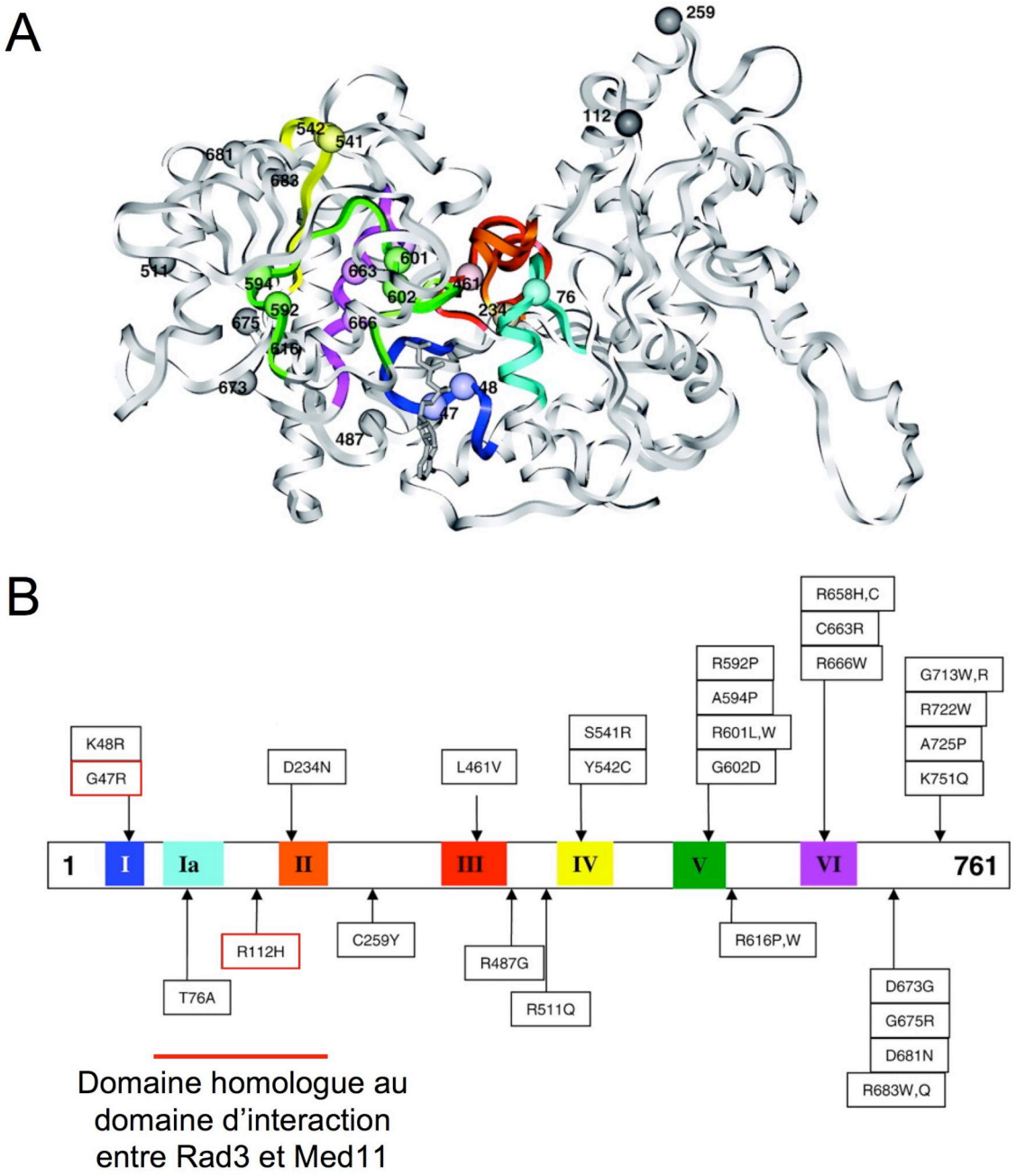


Figure 18: Modèle structural de XPD et localisation des mutations impliquées dans XP, CS et TTD.

A. Modèle structural de XPD obtenu *in silico* par homologie avec la protéine UvrB de *Bacillus caldotenax*. Des boules indiquent la position des mutations impliquées dans les maladies XP, CS et TTD. La structure de XPD apparaît en gris, les six domaines hélicases sont représentés par des couleurs. D'après (Bienstock et al., 2003).

B. Schéma de l'organisation de XPD. Les six domaines hélicases sont numérotés de I à VI et sont représentés par des couleurs différentes. Le long du schéma sont indiqué les mutations impliquées dans XP, TTD et CS. Les mutations G47R et R112H sont encadrées en rouge et un large trait rouge permet de localiser le domaine de XPD homologue au domaine d'interaction de Rad3 avec Med11 défini par double hybride. D'après Dubaele et al., (2003).

homologue au domaine d'interaction entre Med11 et Rad3 qui a été définie par double hybride chez la levure, les diminutions des niveaux de la transcription basale et activée, pourraient être liées à une perte ou une diminution de l'interaction de TFIIH avec le Médiateur.

Afin de tester cette hypothèse, il faudrait vérifier la conservation de l'interaction entre le Médiateur et TFIIH chez l'Homme. Il faudrait donc la tester par des approches complémentaires : double-hybride, co-immunoprécipitation de protéines et co-purification de complexe. Si cette interaction est conservée, il serait alors possible d'analyser l'effet de la mutation G112R. En cas de défaut d'interaction, il faudrait expérimenter la capacité du Médiateur à complémenter les défauts de transcription basale et activée observés *in vitro* dans le mutant XPD-G112R.

D'autre part, TFIIH joue un rôle important dans la transactivation de la transcription en phosphorylant directement certains récepteurs nucléaires (le récepteur de rétinoïdes RARα, de la vitamine D VDR, de l'estrogène ERα et de l'androgène AR) (Drane et al., 2004; Keriel et al., 2002; Rochette-Egly et al., 1997). Par conséquent, à l'instar du rôle du Médiateur sur la phosphorylation du CTD par TFIIH chez la levure, il pourrait également favoriser la phosphorylation des récepteurs nucléaires par TFIIH, chez l'Homme. En effet, le Médiateur interagit fortement avec les récepteurs nucléaires, et a déjà été purifié avec certains d'entre eux (VDR, ER, AR) (Kang et al., 2002; Rachez et al., 1998; Wang et al., 2002). De plus, le Médiateur est recruté au cours de l'activation de la transcription par certains récepteurs nucléaires (RAR, AR) (Pavri et al., 2005; Wang et al., 2002) et participe à la transactivation du récepteur VDR au cours de la différenciation des keratinocytes (Oda et al., 2004). Enfin, la surexpression des sous-unités du Médiateur Med1, Med14 et Med24, stimule l'activation de la transcription par le récepteur AR (Wang et al., 2002). Par conséquent, le Médiateur pourrait jouer un rôle dans la transactivation de récepteurs nucléaire *via* TFIIH. Puisque de nombreux récepteurs sont liés par le Médiateur, ce mécanisme pourrait être transposé sur la transactivation d'un certain nombre d'entre eux. L'analyse d'un mutant de Med1 dans le motif de liaison au récepteur LxxLL qui réduit le recrutement du Médiateur, permettrait de tester son effet sur la transactivation et sur la phosphorylation des récepteurs par TFIIH.

Le mutant *med11-T47A*, un nouvel outil pour étudier le rôle du CTD?

Les changements d'états du CTD de Pol II sont finement régulés au cours du cycle de transcription (Phatnani and Greenleaf, 2006). La phosphorylation de la sérine 5 catalysée par

TFIIH est importante pour la transition entre l'initiation et l'élongation et pour désolidariser le Médiateur et la Pol II (Chambers et al., 1995; Sogaard and Svejstrup, 2007). Elle joue également un rôle dans les interactions de Pol II avec les protéines de maturation des ARN messagers et avec les protéines de remodelage de la chromatine (Cho et al., 1997; Hampsey and Reinberg, 2003; Rodriguez et al., 2000; Yue et al., 1997).

Le mutant du Med11-T47A, qui réduit spécifiquement l'interaction entre Med11 et Rad3, affecte l'occupation du module TFIIK de TFIIH et réduit le niveau de phosphorylation du CTD. Par conséquent, il pourrait permettre d'étudier le rôle du CTD, *in vivo*. Il pourrait affecter la maturation des ARN messagers ou les modifications des histones situés sur la partie 5' des gènes, au cours du cycle de transcription. De plus, ce mutant pourrait être utilisé *in vitro*, pour étudier le rôle des modifications du CTD sur les propriétés physico-chimique de Pol II et sur son activité enzymatique.

Vers un modèle structural du dimère Med11-Med22

Les modèles du Médiateur à faible résolution ont permis de déterminer l'organisation générale du complexe, d'identifier les modules qui interagissent avec Pol II et de proposer un modèle d'activation du Médiateur par des changements de conformation où le module de Queue peut se replier sur celui du Milieu (Chadick and Asturias, 2005). Cependant, les modèles actuels ne permettent pas d'identifier les sous-unités du Médiateur en interaction avec Pol II, et ne présentent que grossièrement l'architecture du complexe. La détermination de la structure à l'échelle atomique permettrait de préciser le mode de fonctionnement du Médiateur, d'identifier les protéines en interaction avec Pol II et préciserait les cartes d'interactions proposées à partir d'études double-hybride ou biochimiques (Guglielmi et al., 2004; Kang et al., 2001). Une structure précise permettrait également d'identifier les domaines protéiques important au maintient de l'intégrité du complexe qui sont enfouis dans la structure et les domaines présentés vers l'extérieur favorables aux interactions avec d'autres coactivateurs ou GTF.

Les techniques actuelles ne semblent pas permettre l'obtention d'un cristal de l'ensemble du Médiateur. Néanmoins, il est possible de résoudre à l'échelle atomique, la structure de sous-complexes du Médiateur impliquant deux ou trois protéines. Deux modèles ont ainsi été obtenus à partir des cristaux de l'hétérodimère Med7-Med21 (Baumli et al., 2005), et des sous-unités Med8-Med18-Med20 associées à TBP (Lariviere et al., 2006). A

terme, l'association des modèles pourrait permettre la reconstitution d'une structure du complexe en entier.

Afin d'étudier la conservation de la protéine Med11, nous avons réalisés des alignements multiples de séquences par PSI-Blast (Altschul et al., 1997). Ceci nous a permis de déterminer les protéines homologues de Med11 au sein du domaine eucaryote. Med11 apparaît comme une protéine conservée possédant 20% d'identité entre la levure et l'Homme. En collaboration avec l'équipe de Raphael Guerois, , nous avons ensuite confronté un profil de Med11 aux banques de données PFAM, SMART, CDD, COGs et KOGs à l'aide du serveur HHpred (Soding et al., 2005), afin de rechercher de nouvelles protéines homologues. De façon surprenante, cette étude a révélé que Med11 est orthologue à Med21. En effet, Med11 et Med21 possèdent 15% d'identité et une structure secondaire prédite composée de trois hélices α, correspondant aux trois domaines conservés préalablement déterminés.

Par analogie à l'hétérodimère associant Med21 et Med7 dont la structure à été résolue (Baumli et al., 2005), nous avons étudié la séquence de Med22 qui possède une taille similaire à Med7 et qui est le partenaire de Med11 au sein du Médiateur (Guglielmi et al., 2004) (article 2). Cette étude a révélé que Med22 est l'orthologue de Med7. En effet, Med22 possède 16% d'identité avec Med7 et présente une structure secondaire prédite également composée de trois hélices α.

L'hétérodimère Med21-Med7, associe les deux protéines qui forment les deux chaines d'un domaine « coiled-coil » connecté par une charnière flexible (Baumli et al., 2005). Les orthologies découvertes entre Med11 et Med21 et entre Med22 et Med7 suggèrent que l'hétérodimère Med11-Med22 puisse adopter une structure comparable. A partir de ces observations, en collaboration avec l'équipe de Raphael Guerois, nous construisons un modèle structural de Med11 et Med22. Dans lequel, Med11 interagira avec Med22 par l'intermédiaire des deux hélices α situées dans la région N-terminale de la protéine pour former le domaine « coiled-coil ».

Dans le but de tester ce modèle, les différents fragments de *MED11* codant les hélices α de la protéine ont été clonés dans le vecteur pGBT9, qui permet de coupler les polypeptides au domaine de liaison à l'ADN de Gal4. Nous avons alors testé par double-hybride, la capacité de nos constructions à interagir avec Med22 (Figure 19). Le 3-aminotriazole (3AT) est un inhibiteur compétitif du produit du gène rapporteur *HIS3*. Il permet de révéler les interactions faibles et d'éliminer les faux positifs de la technique du double-hybride. Une coloration bleue sur un milieu contenant du X-Gal révèle les interactions entre les protéines.

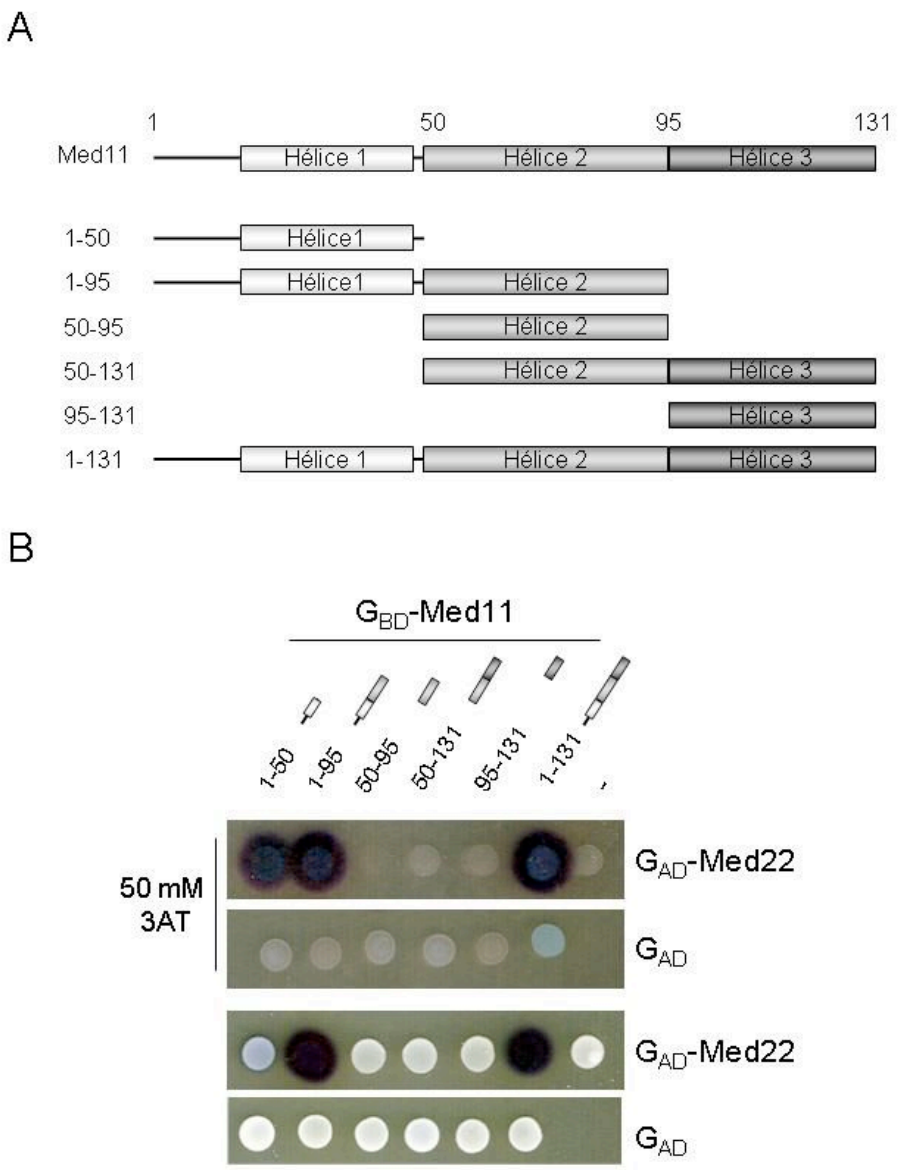


Figure 19**:** Analyse par double-hybride des interactions entre Med11 et Med22

(A) Représentation schématique des troncatures de Med11. Les boîtes grises indiquent les trois hélices α de la protéine.

(B) Interactions des troncatures de Med11 avec Med22. Expérience de double-hybride entre les mutants de troncatures affectant une ou plusieurs hélices α de Med11 et Med22. Les expériences ont été réalisées dans la souche de levure Y190 transformée par les plasmides pGBT9 exprimant les différentes troncatures de Med11 couplées au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (G_{BD}) et par pACTII exprimant Med22 couplée au domaine d'activation de Gal4 (G_{AD}) ou le domaine seul. En haut du panneau, les cellules ont été déposées sur un milieu contenant du X-Gal, afin de révéler l'expression du gène raporteur *lacZ* par une coloration bleue, et 50mM de 3AT. En bas du panneau, les cellules ont été déposées sur un milieu contenant du X-Gal.

Nos expériences montrent que les fragments contenant la première hélice α de Med11 interagissent avec Med22 (Figure 19A). Ceci suggère que la première hélice α est suffisante pour l'interaction entre Med11 et Med22. Cependant, sur un milieu dépourvu de 3AT, l'intensité de la coloration qui est révélatrice de la force de l'interaction entre les protéines, est beaucoup plus vive en présence des deux premières hélices α (Figure 19B). Ces résultats indiquent que Med11 interagit avec Med22 *via* la première hélice α et que la deuxième hélice vient stabiliser cette interaction. Les analyses par double-hybride de l'interaction entre Med11 et Med22 sont donc en accord avec le modèle structural que nous sommes en train de réaliser. Néanmoins, nous désirons produire dans le système baculovirus ou dans *E. coli*, le dimère afin de le purifier. Ceci nous permettra de confirmer par étude RMN la véracité de notre modèle.

Une méthodologie pour découvrir les mécanismes d'action du Médiateur

Au cours de ma thèse, nous avons étudié les rôles des sous-unités Med31 et Med11 du Médiateur. Nous avons ciblé ces protéines puisque nous avions détecté des interactions génétiques et/ou physiques avec des protéines impliquées dans la transcription. Au cours du crible double-hybride qui a permis au laboratoire d'établir une carte à haute résolution du Médiateur (Guglielmi et al., 2004), des interactions entre des sous-unités essentielles du complexe et des protéines impliquées dans des processus divers ont été détectées (Figure 20). Il s'agit de protéines impliquées dans la transduction signal, la réparation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes, le remodelage de la chromatine, la maturation des ARN ou de fonction inconnue. Ceci suggère que le Médiateur puisse jouer un rôle dans ces processus ou leurs régulations.

Au cours de notre étude sur Med11, nous avons mis au point une méthodologie qui pourrait être appliquée aux autres protéines essentielles du Médiateur. Elle consiste à mutagéniser aléatoirement la protéine essentielle afin d'obtenir des mutants thermosensibles, et de rechercher ensuite les causes de ce phénotype. La caractérisation des mutants débute par la recherche de perte d'interaction de la protéine mutagénisée avec ses partenaires. La découverte d'un défaut d'interaction spécifique avec un seul de ses partenaires devient alors un atout pour la compréhension du rôle du Médiateur dans un nouveau processus.

La sous-unité Med21 du module du Milieu semble être un très bon candidat. En effet, elle interagit directement avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, la transduction de signal, la ségrégation des chromosomes et la transcription. Elle occupe

également une place charnière au sein du Médiateur en liant les modules du Milieu et de Tête et en interagissant directement avec Med3, une sous-unité de la Queue. Ceci suggère que Med21 puisse jouer un rôle dans le repliement du Module de Queue et pourrait ainsi intervenir dans la régulation de l'activité du complexe. La mutagénèse et la sélection de mutants d'interaction spécifiques permettraient d'investiguer le rôle du Médiateur dans des processus cellulaires clef et d'étudier le rôle de Med21 dans le maintient de l'intégrité du complexe et dans ses changements de conformation observés par microscopie électronique (Chadick and Asturias, 2005).

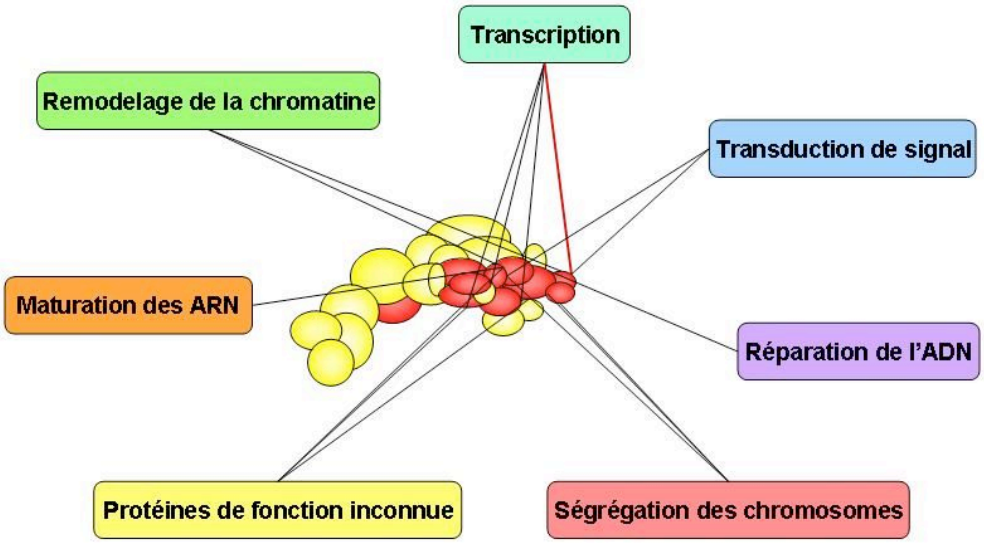


Figure 20: Schéma des interactions entre les protéines essentielles du Médiateur et des protéines impliquées dans les processus nucléaires.
Le Médiateur est au centre de la figure, ses différentes sous-unités sont représentées par des boules colorées en rouge pour les protéines essentielles chez *S. cerevisiae* et en jaune pour les protéines non-essentielles. Des connecteurs noirs indiquent les interactions mettant en jeu des protéines essentielles du Médiateur et des protéines impliqués dans les processus cellulaires représentés par des cadres colorés. Un connecteur rouge indique l'interaction entre Med11 et Rad3 (TFIIH).

BIBLIOGRAPHIE

A

Aalfs, J. D., and Kingston, R. E. (2000). What does 'chromatin remodeling' mean? Trends Biochem Sci *25*, 548-555.

Adams, C. C., and Workman, J. L. (1995). Binding of disparate transcriptional activators to nucleosomal DNA is inherently cooperative. Mol Cell Biol *15*, 1405-1421.

Akoulitchev, S., Chuikov, S., and Reinberg, D. (2000). TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. Nature *407*, 102-106.

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.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res *25*, 3389-3402.

Andersen, G., Poterszman, A., Egly, J. M., Moras, D., and Thierry, J. C. (1996). The crystal structure of human cyclin H. FEBS Lett *397*, 65-69.

Andrau, J. C., van de Pasch, L., Lijnzaad, P., Bijma, T., Koerkamp, M. G., van de Peppel, J., Werner, M., and Holstege, F. C. (2006). Genome-wide location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. Mol Cell *22*, 179-192.

Andressoo, J. O., Mitchell, J. R., de Wit, J., Hoogstraten, D., Volker, M., Toussaint, W., Speksnijder, E., Beems, R. B., van Steeg, H., Jans, J.*, et al.* (2006). An Xpd mouse model for the combined xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome exhibiting both cancer predisposition and segmental progeria. Cancer Cell *10*, 121-132.

Araujo, S. J., Nigg, E. A., and Wood, R. D. (2001). Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. Mol Cell Biol *21*, 2281-2291.

Araujo, S. J., Tirode, F., Coin, F., Pospiech, H., Syvaoja, J. E., Stucki, M., Hubscher, 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., Lacroute, F., Ruet, A., and Friesen, J. D. (1992). Genetic interaction between transcription elongation factor TFIIS and RNA polymerase II. Mol Cell Biol *12*, 4142-4152.

Arellano, M., and Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. Int J Biochem Cell Biol *29*, 559-573.

Armache, K. J., Kettenberger, H., and Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 6964-6968.

Armache, K. J., Mitterweger, S., Meinhart, A., and Cramer, P. (2005). Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. J Biol Chem *280*, 7131-7134.

Armstrong, J. A., Bieker, J. J., and Emerson, B. M. (1998). A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. Cell *95*, 93-104.

Asada, S., Choi, Y., Yamada, M., Wang, S. C., Hung, M. C., Qin, J., and Uesugi, M. (2002). External control of Her2 expression and cancer cell growth by targeting a Ras-linked coactivator. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 12747-12752.

Aso, T., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (1994). Role of the core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex: a common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters. J Biol Chem *269*, 26575-26583.

Asturias, F. J. (2004). Another piece in the transcription initiation puzzle. Nat Struct Mol Biol *11*, 1031-1033.

Asturias, F. J., Jiang, Y. W., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., and Kornberg, R. D. (1999). Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. Science *283*, 985-987.

Auble, D. T., Hansen, K. E., Mueller, C. G. F., Lane, W. S., Thorner, J., and Hahn, S. (1994). Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. Genes and Development *8*, 1920-1934.

Awrey, D. E., Shimasaki, N., Koth, C., Weilbaecher, R., Olmsted, V., Kazanis, S., Shan, X., Arellano, J., Arrowsmith, C. H., Kane, C. M., and Edwards, A. M. (1998). Yeast transcript elongation factor (TFIIS), structure and function. II: RNA polymerase binding, transcript cleavage, and read-through. J Biol Chem *273*, 22595-22605.

B

Baek, H. J., Kang, Y. K., and Roeder, R. G. (2006). Human Mediator enhances basal transcription by facilitating recruitment of transcription factor IIB during preinitiation complex assembly. J Biol Chem *281*, 15172-15181.

Baek, H. J., Malik, S., Qin, J., and Roeder, R. G. (2002). Requirement of TRAP/Mediator for Both Activator-Independent and Activator-Dependent Transcription in Conjunction with TFIID-Associated TAF(II)s. Mol Cell Biol *22*, 2842-2852.

Baidoobonso, S. M., Guidi, B. W., and Myers, L. C. (2007). Med19(Rox3) regulates Intermodule interactions in the Saccharomyces cerevisiae mediator complex. J Biol Chem *282*, 5551-5559.

Basehoar, A. D., Zanton, S. J., and Pugh, B. F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. Cell *116*, 699-709.

Baumli, S., Hoeppner, S., and Cramer, P. (2005). A conserved mediator hinge revealed in the structure of the MED7.MED21 (Med7.Srb7) heterodimer. J Biol Chem *280*, 18171-18178.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. Science *301*, 1090-1093.

Bengal, E., Flores, O., Krauskopf, A., Reinberg, D., and Aloni, Y. (1991). Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II. Mol Cell Biol *11*, 1195-1206.

Bernstein, B. E., Liu, C. L., Humphrey, E. L., Perlstein, E. O., and Schreiber, S. L. (2004). Global nucleosome occupancy in yeast. Genome Biol *5*, R62.

Berroteran, R. W., Ware, D. E., and Hampsey, M. (1994). The *sua8* suppressors of *Saccharomyces cerevisiae* encode replacements of conserved residues within the largest subunit of RNA polymerase II and affects transcription start site selection similarly to *sua7* (TFIIB) mutations. Mol Cell Biol *14*, 226-237.

Bhaumik, S. R., and Green, M. R. (2001). SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. Genes Dev *15*, 1935-1945.

Bhaumik, S. R., Raha, T., Aiello, D. P., and Green, M. R. (2004). In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. Genes Dev *18*, 333-343.

Bhoite, L. T., Yu, Y., and Stillman, D. J. (2001). The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. Genes Dev *15*, 2457-2469.

Bienstock, R. J., Skorvaga, M., Mandavilli, B. S., and Van Houten, B. (2003). Structural and functional characterization of the human DNA repair helicase XPD by comparative molecular modeling and site-directed mutagenesis of the bacterial repair protein UvrB. J Biol Chem *278*, 5309-5316.

Birse, C. E., Minvielle-Sebastia, L., Lee, B. A., Keller, W., and Proudfoot, N. J. (1998). Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeasy. Science *280*, 298-301.

Bjorklund, S., and Gustafsson, C. M. (2004). The mediator complex. Adv Protein Chem *67*, 43-65.

Bjorklund, S., and Gustafsson, C. M. (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. Trends Biochem Sci *30*, 240-244.

Bjorklund, S., and Kim, Y. J. (1996). Mediator of transcriptional regulation. Trends Biochem Sci *21*, 335-337.

Booth, V., Koth, C. M., Edwards, A. M., and Arrowsmith, C. H. (2000). Structure of a conserved domain common to the transcription factors TFIIS, elongin A, and CRSP70. J Biol Chem *275*, 31266-31268.

Borggrefe, T., Davis, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R. D. (2002). A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. J Biol Chem *277*, 44202-44207.

Bortvin, A., and Winston, F. (1996). Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. Science *272*, 1473-1476.

Boube, M., Faucher, C., Joulia, L., Cribbs, D. L., and Bourbon, H. M. (2000). Drosophila homologs of transcriptional mediator complex subunits are required for adult cell and segment identity specification. Genes Dev *14*, 2906-2917.

Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D. L., and Bourbon, H. M. (2002). Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. Cell *110*, 143-151.

Bourbon, H. M., Aguilera, A., Ansari, A. Z., Asturias, F. J., Berk, A. J., Bjorklund, S., Blackwell, T. K., Borggrefe, T., Carey, M., Carlson, M.*, et al.* (2004). A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. Mol Cell *14*, 553-557.

Boyer, T. G., Martin, M. E., Lees, E., Ricciardi, R. P., and Berk, A. J. (1999a). Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. Nature *399*, 276-279.

Boyer, T. G., Martin, M. E., Lees, E., Ricciardi, R. P., and Berk, A. J. (1999b). Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. Nature *399*, 276-279.

Brower, C. S., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Kamura, T., Pause, A., Stearman, R., Klausner, R. D., Malik, S., Lane, W. S., Sorokina, I.*, et al.* (2002). Mammalian mediator subunit mMED8 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cul2 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 10353-10358.

Bryant, G. O., and Ptashne, M. (2003). Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. Mol Cell *11*, 1301-1309.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. Cell *56*, 549-561.

Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P. A., and Guarente, L. (1988). Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. Nature *334*, 37-42.

Burke, T. W., and Kadonaga, J. T. (1996). Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. Genes Dev *10*, 711-724.

Bushnell, D. A., Bamdad, C., and Kornberg, R. D. (1996). A minimal set of RNA polymerase II transcription protein interactions. J Biol Chem *271*, 20170-20174.

Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-A resolution: implications for the initiation of transcription. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 6969-6973.

Bushnell, D. A., Westover, K. D., Davis, R. E., and Kornberg, R. D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Angstroms. Science *303*, 983-988.

C

Carcamo, J., Buckbinder, L., and Reinberg, D. (1991). The initiator directs the assembly of a transcription factor IID-dependent transcription complex. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 8052-8056.

Chadick, J. Z., and Asturias, F. J. (2005). Structure of eukaryotic Mediator complexes. Trends Biochem Sci *30*, 264-271.

Chambers, R. S., Wang, B. Q., Burton, Z. F., and Dahmus, M. E. (1995). The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription IIF and IIB. J Biol Chem *270*, 14962-14969.

Chang, W. H., and Kornberg, R. D. (2000). Electron crystal structure of the transcription factor and DNA repair complex, core TFIIH. Cell *102*, 609-613.

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*, 82-85.

Chavez, S., Beilharz, T., Rondon, A. G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J. Q., Lithgow, T., and Aguilera, A. (2000). A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. Embo J *19*, 5824-5834.

Chen, B. S., and Hampsey, M. (2004). Functional interaction between TFIIB and the Rpb2 subunit of RNA polymerase II: implications for the mechanism of transcription initiation. Mol Cell Biol *24*, 3983-3991.

Chen, H. T., and Hahn, S. (2004). Mapping the location of TFIIB within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex: a model for the structure of the PIC. Cell *119*, 169-180.

Cho, E.-J., Takagi, T., Moore, C. R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phsophorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. Genes and Development *11*, 3319-3326.

Cho, E. J., Kobor, M. S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. Genes Dev *15*, 3319-3329.

Chung, W. H., Craighead, J. L., Chang, W. H., Ezeokonkwo, C., Bareket-Samish, A., Kornberg, R. D., and Asturias, F. J. (2003). RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex. Mol Cell *12*, 1003-1013.

Cismowski, M. J., Laff, G. M., Solomon, M. J., and Reed, S. I. (1995). KIN28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in Saccharomyces cerevisiae but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. Mol Cell Biol *15*, 2983-2992.

Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R. E., Hoeijmakers, J. H., and Vermeulen, W. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling by the

Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. Mol Cell Biol *20*, 7643-7653.

Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M., and Barton, G. J. (2004). The Jalview Java alignment editor. Bioinformatics *20*, 426-427.

Coin, F., Bergmann, E., Tremeau-Bravard, A., and Egly, J. M. (1999). Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. Embo J *18*, 1357-1366.

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*, 184-188.

Coin, F., Oksenych, V., and Egly, J. M. (2007). Distinct Roles for the XPB/p52 and XPD/p44 Subcomplexes of TFIIH in Damaged DNA Opening during Nucleotide Excision Repair. Mol Cell *26*, 245-256.

Coin, F., Proietti De Santis, L., Nardo, T., Zlobinskaya, O., Stefanini, M., and Egly, J. M. (2006). p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit. Mol Cell *21*, 215-226.

Collart, M. A. (2003). Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. Gene *313*, 1-16.

Collart, M. A., and Struhl, K. (1994). *NOT1* (*CDC39*), *NOT2*(*CDC36*), *NOT3*, and *NOT4* encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. Genes and Development *8*, 525-537.

Collins, S. R., Miller, K. M., Maas, N. L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C. S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., *et al.* (2007). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. Nature *446*, 806-810.

Conaway, J. W., Florens, L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Yao, T., Swanson, S. K., Banks, C. A., Washburn, M. P., and Conaway, R. C. (2005a). The mammalian Mediator complex. FEBS Lett *579*, 904-908.

Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. Annual Reviews of Biochemistry *62*, 161-190.

Conaway, R. C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., and Conaway, J. W. (2005b). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. Trends Biochem Sci *30*, 250-255.

Corey, L. L., Weirich, C. S., Benjamin, I. J., and Kingston, R. E. (2003). Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. Genes Dev *17*, 1392-1401.

Cosma, M. P., Panizza, S., and Nasmyth, K. (2001). Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. Mol Cell *7*, 1213-1220.

Cosma, M. P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. Cell *97*, 299-311.

Costa, R. M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H., and Menck, C. F. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. Biochimie *85*, 1083-1099.

Coulombe, B., Li, J., and Greenblatt, J. (1994). Topological localization of the human transcription factor IIA, IIB, TATA box-binding protein and RNA polymerase II-associated protein 30 on a class II promoter. J Biol Chem *269*, 19962-19967.

Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R., and Kornberg, R. D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. Science *288*, 640-649.

Cramer, P., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2001). Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 A Resolution. Science *19*, 19.

D

Dahmus, M. E. (1994). The role of multisite phosphorylation in the regulation of RNA polymerase II activity. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol *48*, 143-179.

Dahmus, M. E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. J Biol Chem *271*, 19009-19012.

Darst, R. P., Wang, D., and Auble, D. T. (2001). MOT1-catalyzed TBP-DNA disruption: uncoupling DNA conformational change and role of upstream DNA. Embo J *20*, 2028-2040.

Davis, J., Takagi, Y., Kornberg, R., and Asturias, F. (2002). Structure of the Yeast RNA Polymerase II Holoenzyme. Mediator Conformation and Polymerase Interaction. Mol Cell *10*, 409.

DeJong, J., Bernstein, R., and Roeder, R. G. (1995). Human general transcription factor TFIIA: characterization of a cDNA encoding the small subunit and requirement for basal and activated transcription. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 3313-3317.

Dickstein, R., Ruppert, S., and Tjian, R. (1996). $TAF_{II}250$ is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. Cell *84*, 781-790.

Dotson, M. R., Yuan, C. X., Roeder, R. G., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Jiang, Y. W., Li, Y., Kornberg, R. D., and Asturias, F. J. (2000). Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. Proc Natl Acad Sci USA *97*, 14307-14310.

Doyen, C. M., An, W., Angelov, D., Bondarenko, V., Mietton, F., Studitsky, V. M., Hamiche, A., Roeder, R. G., Bouvet, P., and Dimitrov, S. (2006a). Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. Mol Cell Biol *26*, 1156-1164.

Doyen, C. M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., *et al.* (2006b). Dissection of

the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. Embo J *25*, 4234-4244.

Drane, P., Compe, E., Catez, P., Chymkowitch, P., and Egly, J. M. (2004). Selective regulation of vitamin D receptor-responsive genes by TFIIH. Mol Cell *16*, 187-197.

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 U S A *93*, 6488-6493.

Dubaele, S., Proietti De Santis, L., Bienstock, R. J., Keriel, A., Stefanini, M., Van Houten, B., and Egly, J. M. (2003). Basal transcription defect discriminates between xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy in XPD patients. Mol Cell *11*, 1635-1646.

E

Edwards, A. M., Kane, C. M., Young, R. A., and Kornberg, R. D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. J Biol Chem *266*, 71-75.

Eggermont, J., and Proudfoot, N. J. (1993). Poly(A) signals and transcriptional pause sites combine to prevent interference between RNA polymerase II promoters. Embo J *12*, 2539-2548.

Egly, J. M. (2001). The 14th Datta Lecture. TFIIH: from transcription to clinic. FEBS Lett *498*, 124-128.

Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelsen, C. O., Koeck, P. J., Holmberg, S., Hebert, H., and Gustafsson, C. M. (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 15788-15793.

Emami, K. H., Jain, A., and Smale, S. T. (1997). Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization. Genes Dev *11*, 3007-3019.

Evans, E., Moggs, J. G., Hwang, J. R., Egly, J. M., and Wood, R. D. (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. Embo J *16*, 6559-6573.

F

Fan, H.-Y., Cheng, K. K., and Klein, H. L. (1996). Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant *hpr1Δ* of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics *142*, 749-759.

Feaver, W. J., Huang, W., and Friedberg, E. C. (1999). The TFB4 subunit of yeast TFIIH is required for both nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription. J Biol Chem *274*, 29564-29567.

Feaver, W. J., Huang, W., Gileadi, O., Myers, L., Gustafsson, C. M., Kornberg, R. D., and Friedberg, E. C. (2000). Subunit interactions in yeast transcription/repair factor TFIIH. Requirement for Tfb3 subunit in nucleotide excision repair. J Biol Chem *275*, 5941-5946.

Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Henry, N. L., and Kornberg, R. D. (1994). Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK. Cell *79*, 1103-1109.

Fish, R. N., and Kane, C. M. (2002). Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. Biochim Biophys Acta *1577*, 287-307.

Fishburn, J., Mohibullah, N., and Hahn, S. (2005). Function of a eukaryotic transcription activator during the transcription cycle. Mol Cell *18*, 369-378.

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.

Flanagan, P. M., Kelleher III, R. J., Sayre, M. H., Tschoshner, H., and Kornberg, R. D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. Nature *350*, 436-438.

Flores, O., Maldonado, E., and Reinberg, D. (1989). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Factors IIE and IIF independently interact with RNA polymerase II. J Biol Chem *264*, 8913-8921.

Fondell, J. D., Ge, H., and Roeder, R. G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 8329-8333.

Fondell, J. D., Guermah, M., Malik, S., and Roeder, R. G. (1999). Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 1959-1964.

Forget, D., Robert, F., Grondin, G., Burton, Z. F., Greenblatt, J., and Coulombe, B. (1997). RAP74 induces promoter contacts by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *94*, 7150-7155.

G

Galburt, E. A., Grill, S. W., Wiedmann, A., Lubkowska, L., Choy, J., Nogales, E., Kashlev, M., and Bustamante, C. (2007). Backtracking determines the force sensitivity of RNAP II in a factor-dependent manner. Nature *446*, 820-823.

Gangloff, Y. G., Werten, S., Romier, C., Carre, L., Poch, O., Moras, D., and Davidson, I. (2000). The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histone-like pairs. Mol Cell Biol *20*, 340-351.

Geisberg, J. V., Holstege, F. C., Young, R. A., and Struhl, K. (2001). Yeast NC2 associates with the RNA polymerase II preinitiation complex and selectively affects transcription in vivo. Mol Cell Biol *21*, 2736-2742.

Gerber, M., and Shilatifard, A. (2003). Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation. J Biol Chem *278*, 26303-26306.

Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J. A., Hoogstraten, D., Theil, A., Wijgers, N., Jaspers, N. G., Raams, A., Argentini, M., van der Spek, P. J.*, et al.* (2004). A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. Nat Genet *36*, 714-719.

Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2001). Structural Basis of Transcription: An RNA Polymerase II Elongation Complex at 3.3 A Resolution. Science *19*, 19.

Goppelt, A., Stelzer, G., Lottspeich, F., and Meisterernst, M. (1996). A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. Embo J *15*, 3105-3116.

Govind, C. K., Yoon, S., Qiu, H., Govind, S., and Hinnebusch, A. G. (2005). Simultaneous recruitment of coactivators by Gcn4p stimulates multiple steps of transcription in vivo. Mol Cell Biol *25*, 5626-5638.

Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F.*, et al.* (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. Genes Dev *11*, 1640-1650.

Greger, I. H., and Proudfoot, N. J. (1998). Poly(A) signals control both transcriptional termination and initiation between the tandem GAL10 and GAL7 genes of Saccharomyces cerevisiae. Embo J *17*, 4771-4779.

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. Mol Cell *3*, 97-108.

Gu, W., Powell, W., Mote, J., Jr., and Reines, D. (1993). Nascent RNA cleavage by arrested RNA polymerase II does not require upstream translocation of the elongation complex on DNA. J Biol Chem *268*, 25604-25616.

Guglielmi, B., van Berkum, N. L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H. M., Holstege, F. C., and Werner, M. (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. Nucleic Acids Res *32*, 5379-5391.

Guidi, B. W., Bjornsdottir, G., Hopkins, D. C., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Myers, L. C. (2004). Mutual targeting of mediator and the TFIIH kinase Kin28. J Biol Chem *279*, 29114-29120.

Guiguen, A., Soutourina, J., Dewez, M., Tafforeau, L., Dieu, M., Raes, M., Vandenhaute, J., Werner, M., and Hermand, D. (2007). Recruitment of P-TEFb (Cdk9-Pch1) to chromatin by the cap-methyl transferase Pcm1 in fission yeast. Embo J *26*, 1552-1559.

Guschin, D., and Wolffe, A. P. (1999). SWItched-on mobility. Curr Biol *9*, R742-746.

Guzder, S. N., Sung, P., Bailly, V., Prakash, L., and Prakash, S. (1994). RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription. Nature *369*, 578-581.

H

Ha, I., Roberts, S., Maldonado, E., Sun, X., Kim, L.-U., Green, M., and Reinberg, D. (1993). Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. Genes and Development *7*, 1021-1032.

Hallberg, M., Polozkov, G. V., Hu, G. Z., Beve, J., Gustafsson, C. M., Ronne, H., and Bjorklund, S. (2004). Site-specific Srb10-dependent phosphorylation of the yeast Mediator subunit Med2 regulates gene expression from the 2-microm plasmid. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 3370-3375.

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*, 833-842.

Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. Microbiol Mol Biol Rev *62*, 465-503.

Hampsey, M., and Reinberg, D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. Cell *113*, 429-432.

Hausmann, S., and Shuman, S. (2002). Characterization of the CTD phosphatase Fcp1 from fission yeast. Preferential dephosphorylation of serine 2 versus serine 5. J Biol Chem *277*, 21213-21220.

Hawker, N. P., Pennypacker, S. D., Chang, S. M., and Bikle, D. D. (2007). Regulation of human epidermal keratinocyte differentiation by the vitamin D receptor and its coactivators DRIP205, SRC2, and SRC3. J Invest Dermatol *127*, 874-880.

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*, 3047-3052.

Hekmatpanah, D. S., and Young, R. (1991). Mutations in a conserved region of RNA polymerase II influence the accuracy of mRNA start site selection. Mol Cell Biol *11*, 5781-5791.

Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S.-M., Wilson, C. J., Koh, S. S., and Young, R. A. (1998a). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. Molecular Cell *2*, 43-53.

Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., and Young, R. A. (1998b). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. Mol Cell *2*, 43-53.

Hengartner, C. J., Thompson, C. M., Zhang, J., Chao, D. M., Liao, S.-M., Koleske, A. J., Okamura, S., and Young, R. A. (1995). Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. Genes and Development *9*, 897-910.

Henikoff, S., and Ahmad, K. (2005). Assembly of variant histones into chromatin. Annu Rev Cell Dev Biol *21*, 133-153.

Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature *411*, 366-374.

Hoffmann, A., Chiang, C. M., Oelgeschlager, T., Xie, X., Burley, S. K., Nakatani, Y., and Roeder, R. G. (1996). A histone octamer-like structure within TFIID. Nature *380*, 356-359.

Holstege, F. C., van der Vliet, P. C., and Timmers, H. T. M. (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*, 1666-1677.

Holstege, F. C. P., Fiedler, U., and Timmers, H. T. M. (1997). Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. EMBO J *16*, 7468-7480.

Holstege, F. C. P., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. Cell *95*, 717-728.

Hubert, J.-C., Guyonvarch, A., Kammerer, B., Exinger, F., Liljelund, P., and Lacroute, F. (1983). Complete sequence of a eukaryotic regulatory gene. EMBO J *2*, 2071-2073.

Huisinga, K. L., and Pugh, B. F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell *13*, 573-585.

Humbert, S., van Vuuren, H., Lutz, Y., Hoeijmakers, J. H., Egly, J. M., and Moncollin, V. (1994). p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair. Embo J *13*, 2393-2398.

I

Imbalzano, A. N., Kwon, H., Green, M. R., and Kingston, R. E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. Nature *370*, 481-485.

Ito, M., Okano, H. J., Darnell, R. B., and Roeder, R. G. (2002). The TRAP100 component of the TRAP/Mediator complex is essential in broad transcriptional events and development. Embo J *21*, 3464-3475.

Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J., and Roeder, R. G. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. Mol Cell *3*, 361-370.

Ito, M., Yuan, C. X., Okano, H. J., Darnell, R. B., and Roeder, R. G. (2000). Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. Mol Cell *5*, 683-693.

Ito, S., Kuraoka, I., Chymkowitch, P., Compe, E., Takedachi, A., Ishigami, C., Coin, F., Egly, J. M., and Tanaka, K. (2007). XPG Stabilizes TFIIH, Allowing Transactivation of Nuclear Receptors: Implications for Cockayne Syndrome in XP-G/CS Patients. Mol Cell *26*, 231-243.

Izban, M. G., and Luse, D. S. (1992). The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'-> 5' direction in the presence of elongation factor SII. Genes Dev *6*, 1342-1356.

J

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 the estrogen receptor. Cell *79*, 107-117.

Jawhari, A., Laine, J. P., Dubaele, S., Lamour, V., Poterszman, A., Coin, F., Moras, D., and Egly, J. M. (2002). p52 Mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIIH. J Biol Chem *277*, 31761-31767.

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.

Jiang, Y. W., Veschambre, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., and Kornberg, R. D. (1998). Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways. Proc Natl Acad Sci USA *95*, 8538-8543.

Johnson, A. D. (1995). The price of repression. Cell *81*, 655-658.

Johnson, K. M., and Carey, M. (2003). Assembly of a mediator/TFIID/TFIIA complex bypasses the need for an activator. Curr Biol *13*, 772-777.

Johnson, K. M., Wang, J., Smallwood, A., Arayata, C., and Carey, M. (2002). TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA. Genes Dev *16*, 1852-1863.

Jona, G., Livi, L. L., and Gileadi, O. (2002). Mutations in the RING domain of TFB3, a subunit of yeast transcription factor IIH, reveal a role in cell cycle progression. J Biol Chem *277*, 39409-39416.

Jones, J. C., Phatnani, H. P., Haystead, T. A., MacDonald, J. A., Alam, S. M., and Greenleaf, A. L. (2004). C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. J Biol Chem *279*, 24957-24964.

K

Kamada, K., Roeder, R. G., and Burley, S. K. (2003). Molecular mechanism of recruitment of TFIIF- associating RNA polymerase C-terminal domain phosphatase (FCP1) by transcription factor IIF. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 2296-2299.

Kang, J. S., Kim, S. H., Hwang, M. S., Han, S. J., Lee, Y. C., and Kim, Y. J. (2001). The structural and functional organization of the yeast mediator complex. J Biol Chem *276*, 42003-42010.

Kang, Y. K., Guermah, M., Yuan, C. X., and Roeder, R. G. (2002). The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 2642-2647.

Kanin, E. I., Kipp, R. T., Kung, C., Slattery, M., Viale, A., Hahn, S., Shokat, K. M., and Ansari, A. Z. (2007). Chemical inhibition of the TFIIH-associated kinase Cdk7/Kin28 does not impair global mRNA synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 5812-5817.

Kaplan, C. D., Laprade, L., and Winston, F. (2003). Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. Science *301*, 1096-1099.

Kelleher, R. J., 3rd, Flanagan, P. M., and Kornberg, R. D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. Cell *61*, 1209-1215.

Kellenberger, E., Dominguez, C., Fribourg, S., Wasielewski, E., Moras, D., Poterszman, A., Boelens, R., and Kieffer, B. (2005). Solution structure of the C-terminal domain of TFIIH P44 subunit reveals a novel type of C4C4 ring domain involved in protein-protein interactions. J Biol Chem *280*, 20785-20792.

Keogh, M. C., Cho, E. J., Podolny, V., and Buratowski, S. (2002). Kin28 is found within TFIIH and a Kin28-Ccl1-Tfb3 trimer complex with differential sensitivities to T-loop phosphorylation. Mol Cell Biol *22*, 1288-1297.

Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Rochette-Egly, C., and Egly, J. M. (2002). XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. Cell *109*, 125-135.

Kettenberger, H., Armache, K. J., and Cramer, P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. Cell *114*, 347-357.

Kettenberger, H., Armache, K. J., and Cramer, P. (2004). Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. Mol Cell *16*, 955-965.

Kim, B., Nesvizhskii, A. I., Rani, P. G., Hahn, S., Aebersold,R. and Ranish, J. A. (2007). The transcription elongation factor TFIIS is a component of RNA polymerase II preinitiation complexes. Soumis

Kim, J. B., and Sharp, P. A. (2001). Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. J Biol Chem *276*, 12317-12323.

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*, 1241-1246.

Kim, T.-K., Lagrange, T., Wang, Y.-H., Griffith, J. D., Reinberg, D., and Ebright, R. H. (1997). Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *94*, 12268-12273.

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, Y. J., and Lis, J. T. (2005). Interactions between subunits of Drosophila Mediator and activator proteins. Trends Biochem Sci *30*, 245-249.

Klein, C., and Struhl, K. (1994). Increased recruitment of TATA-binding protein to the promoter by transcriptional activation domains *in vivo*. Science *266*, 280-282.

Koh, S. S., Ansari, A. Z., Ptashne, M., and Young, R. A. (1998). An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. Molecular Cell *1*, 895-904.

Kokubo, T., Gong, D. W., Wootton, J. C., Horikoshi, M., Roeder, R. G., and Nakatani, Y. (1994). Molecular cloning of Drosophila TFIID subunits. Nature *367*, 484-487.

Kolodziej, P. A., and Young, R. A. (1991). Mutations in the three largest subunits of yeast RNA polymerase that affect enzyme assembly. Mol Cell Biol *11*, 4669-4678.

Kornberg, R. D. (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. Trends Biochem Sci *30*, 235-239.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. Cell *128*, 693-705.

Kowenz-Leutz, E., and Leutz, A. (1999). A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. Mol Cell *4*, 735-743.

Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., and Hampsey, M. (2004). Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. Mol Cell *14*, 387-394.

Krogan, N. J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D. P., Beattie, B. K., Emili, A., Boone, C., *et al.* (2003). Methylation of histone H3 by Set2 in Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. Mol Cell Biol *23*, 4207-4218.

Kuras, L. (2004). Characterization of protein-DNA association in vivo by chromatin immunoprecipitation. Methods Mol Biol *284*, 147-162.

Kuras, L., Borggrefe, T., and Kornberg, R. D. (2003). Association of the Mediator complex with enhancers of active genes. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 13887-13891.

Kuras, L., Kosa, P., Mencia, M., and Struhl, K. (2000). TAF-Containing and TAF-independent forms of transcriptionally active TBP in vivo. Science *288*, 1244-1248.

Kuras, L., and Struhl, K. (1999). Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. Nature *399*, 609-613.

L

Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D., and Ebright, R. H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. Genes Dev *12*, 34-44.

Laine, J. P., and Egly, J. M. (2006a). Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase IIO. Embo J *25*, 387-397.

Laine, J. P., and Egly, J. M. (2006b). When transcription and repair meet: a complex system. Trends Genet *22*, 430-436.

Langst, G., Bonte, E. J., Corona, D. F., and Becker, P. B. (1999). Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. Cell *97*, 843-852.

Lariviere, L., Geiger, S., Hoeppner, S., Rother, S., Strasser, K., and Cramer, P. (2006). Structure and TBP binding of the Mediator head subcomplex Med8-Med18-Med20. Nat Struct Mol Biol *13*, 895-901.

Larochelle, S., Merrick, K. A., Terret, M. E., Wohlbold, L., Barboza, N. M., Zhang, C., Shokat, K. M., Jallepalli, P. V., and Fisher, R. P. (2007). Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. Mol Cell *25*, 839-850.

Larschan, E., and Winston, F. (2001). The S. cerevisiae SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. Genes Dev *15*, 1946-1956.

Lee, C. K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B. D., and Lieb, J. D. (2004). Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. Nat Genet *36*, 900-905.

Lee, D., and Lis, J. T. (1998). Transcriptional activation independent of TFIIH kinase and the RNA polymerase II mediator in vivo. Nature *393*, 389-392.

Lee, J. M., and Greenleaf, A. L. (1989). A protein kinase that phosphorylates the C-terminal repeat domain of the largest subunit of RNA polymerase II. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 3624-3628.

Lee, T. I., Causton, H. C., Holstege, F. C., Shen, W. C., Hannett, N., Jennings, E. G., Winston, F., Green, M. R., and Young, R. A. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. Nature *405*, 701-704.

Lee, T. I., and Young, R. A. (1998). Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. Genes Dev *12*, 1398-1408.

Lee, Y. C., and Kim, Y. J. (1998). Requirement for a functional interaction between mediator components Med6 and Srb4 in RNA polymerase II transcription. Mol Cell Biol *18*, 5364-5370.

Lee, Y. C., Min, S., Gim, B. S., and Kim, Y. J. (1997). A transcriptional mediator protein that is required for activation of many RNA polymerase II promoters and is conserved from yeast to humans. Mol Cell Biol *17*, 4622-4632.

Lee, Y. C., Park, J. M., Min, S., Han, S. J., and Kim, Y. J. (1999). An activator binding module of yeast RNA polymerase II holoenzyme. Mol Cell Biol *19*, 2967-2976.

Lei, L., Ren, D., and Burton, Z. F. (1999). The RAP74 subunit of human transcription factor IIF has similar roles in initiation and elongation. Mol Cell Biol *19*, 8372-8382.

Lemieux, K., and Gaudreau, L. (2004). Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UAS G requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II. Embo J *23*, 4040-4050.

Leroy, C., Cormier, L., and Kuras, L. (2006). Independent recruitment of mediator and SAGA by the activator Met4. Mol Cell Biol *26*, 3149-3163.

Li, B., Carey, M., and Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. Cell *128*, 707-719.

Li, J., Moazed, D., and Gygi, S. P. (2002). Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation. J Biol Chem *277*, 49383-49388.

Li, J. M., Wang, X. F., Xi, Z. Q., Gong, Y., Liu, F. Y., Sun, J. J., Wu, Y., Luan, G. M., Wang, Y. P., Li, Y. L.*, et al.* (2006). Decreased expression of thyroid receptor-associated protein 220 in temporal lobe tissue of patients with refractory epilepsy. Biochem Biophys Res Commun *348*, 1389-1397.

Li, Y., Bjorklund, S., Jiang, Y. W., Kim, Y.-J., Lane, W. S., Stillman, D. J., and Kornberg, R. D. (1995). Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *92*, 10864-10686.

Linder, T., and Gustafsson, C. M. (2004). The Soh1/MED31 protein is an ancient component of Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae Mediator. J Biol Chem *279*, 49455-49459.

Liu, J., Akoulitchev, S., Weber, A., Ge, H., Chuikov, S., Libutti, D., Wang, X. W., Conaway, J. W., Harris, C. C., Conaway, R. C., *et al.* (2001). Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum. Cell *104*, 353-363.

Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A. Z., Shokat, K. M., and Hahn, S. (2004). Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. Mol Cell Biol *24*, 1721-1735.

Lohr, D., Venkov, P., and Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. Faseb J *9*, 777-787.

Loncle, N., Boube, M., Joulia, L., Boschiero, C., Werner, M., Cribbs, D. L., and Bourbon, H. M. (2007). Distinct roles for Mediator Cdk8 module subunits in Drosophila development. Embo J *26*, 1045-1054.

Lorch, Y., Beve, J., Gustafsson, C. M., Myers, L. C., and Kornberg, R. D. (2000). Mediator-nucleosome interaction. Mol Cell *6*, 197-201.

M

Makela, T. P., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Frutiger, S., Hughes, G. J., and Weinberg, R. A. (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. Nature *371*, 254-257.

Malagon, F., Tong, A. H., Shafer, B. K., and Strathern, J. N. (2004). Genetic interactions of DST1 in Saccharomyces cerevisiae suggest a role of TFIIS in the initiation-elongation transition. Genetics *166*, 1215-1227.

Malik, S., and Roeder, R. G. (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. Trends Biochem Sci *30*, 256-263.

Marcus, G. A., Silverman, N., Berger, S. L., Horiuchi, J., and Guarente, L. (1994). Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. Embo J *13*, 4807-4815.

Marshall, N. F., and Price, D. H. (1995). Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. J Biol Chem *270*, 12335-12338.

Maxon, M. E., Goodrich, J. A., and Tjian, R. (1994). Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promoter clearance. Genes and Development *8*, 515-524.

McCracken, S., and Greenblatt, J. (1991). Related RNA polymerase-binding regions in human RAP30/74 and Escherichia coli s70. Science *253*, 900-902.

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*, 689-6900.

Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., and Severinov, K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA

polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. Proc Natl Acad Sci USA *98*, 892-897.

Miyao, T., and Woychik, N. A. (1998). RNA polymerase subunit RPB5 plays a role in transcriptional activation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *95*, 15281-15286.

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*, 1261-1270.

Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Xu, H., and Leutz, A. (2004). Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. Mol Cell *13*, 241-250.

Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Bushnell, D. A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R. D. (1998). The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. Genes and Development *12*, 45-54.

Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Hayashibara, K. C., Brown, P. O., and Kornberg, R. D. (1999). Mediator protein mutations that selectively abolish activated transcription. Proc Natl Acad Sci USA *96*, 67-72.

N

Naar, A. M., Beaurang, P. A., Zhou, S., Abraham, S., Solomon, W., and Tjian, R. (1999). Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. Nature *398*, 828-832.

Naar, A. M., Lemon, B. D., and Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. Annu Rev Biochem *70*, 475-501.

Nair, D., Kim, Y., and Myers, L. C. (2005). Mediator and TFIIH govern carboxyl-terminal domain-dependent transcription in yeast extracts. J Biol Chem *280*, 33739-33748.

Nakanishi, T., Nakano, A., Nomura, K., Sekimizu, K., and Natori, S. (1992). Purification, gene cloning, and gene disruption of the transcription elongation factor S-II in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem *267*, 13200-13204.

Nakanishi, T., Shimoaraiso, M., Kubo, T., and Natori, S. (1995). Structure-function relationship of yeast S-II in terms of stimulation of RNA polymerase II, arrest relief, and suppression of 6-azauracil sensitivity. J Biol Chem *270*, 8991-8995.

Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. Cell *108*, 475-487.

Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. Mol Cell *11*, 709-719.

Nigg, E. A. (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? Curr Opin Cell Biol *8*, 312-317.

Nikolov, D. B., Chen, H., Halay, E. D., Hoffman, A., Roeder, R. G., and Burley, S. K. (1996). Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 4862-4867.

Nonet, M. L., and Young, R. A. (1989). Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapetide repeat domain of Saccharomyces cerevisiae RNA polymerase II. Genetics *123*, 715-724.

Näär, A. M., Beaurang, P. A., Zhou, S., Abraham, S., Solomon, W., and Tjian, R. (1999). Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. Nature *398*, 828-832.

O

O'Brien, T., Hardin, S., Greenleaf, A., and Lis, J. T. (1994). Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. Nature *370*, 75-77.

Oda, Y., Ishikawa, M. H., Hawker, N. P., Yun, Q. C., and Bikle, D. D. (2007). Differential role of two VDR coactivators, DRIP205 and SRC-3, in keratinocyte proliferation and differentiation. J Steroid Biochem Mol Biol *103*, 776-780.

Oda, Y., Sihlbom, C., Chalkley, R. J., Huang, L., Rachez, C., Chang, C. P., Burlingame, A. L., Freedman, L. P., and Bikle, D. D. (2004). Two distinct coactivators, DRIP/mediator and SRC/p160, are differentially involved in VDR transactivation during keratinocyte differentiation. J Steroid Biochem Mol Biol *89-90*, 273-276.

Oelgeschlager, T., Tao, Y., Kang, Y. K., and Roeder, R. G. (1998). Transcription activation via enhanced preinitiation complex assembly in a human cell-free system lacking TAFIIs. Mol Cell *1*, 925-931.

Ohkuma, Y., Hashimoto, S., Wang, C. K., Horikoshi, M., and Roeder, R. G. (1995). Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphrylation through structure-function studies of TFIIE-α. Mol Cell Biol *15*, 4856-4866.

Olmsted, V. K., Awrey, D. E., Koth, C., Shan, X., Morin, P. E., Kazanis, S., Edwards, A. M., and Arrowsmith, C. H. (1998). Yeast transcript elongation factor (TFIIS), structure and function. I: NMR structural analysis of the minimal transcriptionally active region. J Biol Chem *273*, 22589-22594.

Orlicky, S. M., Tran, P. T., Sayre, M. H., and Edwards, A. M. (2001). Dissociable Rpb4-Rpb7 subassembly of rna polymerase II binds to single-strand nucleic acid and mediates a post-recruitment step in transcription initiation. J Biol Chem *276*, 10097-10102.

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*, 105-116.

Orphanides, G., and Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. Cell *108*, 439-451.

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*, 284-288.

Osheim, Y. N., Proudfoot, N. J., and Beyer, A. L. (1999). EM visualization of transcription by RNA polymerase II: downstream termination requires a poly(A) signal but not transcript cleavage. Mol Cell *3*, 379-387.

P

Pan, G., Aso, T., and Greenblatt, J. (1997). Interaction of elongation factors TFIIS and elongin A with a human RNA polymerase II holoenzyme capable of promoter-specific initiation and responsive to transcriptional activators. J Biol Chem *272*, 24563-24571.

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.

Park, J. M., Werner, J., Kim, J. M., Lis, J. T., and Kim, Y. J. (2001). Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. Mol Cell *8*, 9-19.

Pavri, R., Lewis, B., Kim, T. K., Dilworth, F. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., de Murcia, G., Evans, R., Chambon, P., and Reinberg, D. (2005). PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. Mol Cell *18*, 83-96.

Phatnani, H. P., and Greenleaf, A. L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. Genes Dev *20*, 2922-2936.

Pinto, I., Wu, W.-H., Na, J. G., and Hampsey, M. (1994). Characterization of *sua7* mutations defines a domain of TFIIB involved in transcription start site selection in yeast. J Biol Chem *269*, 30569-30573.

Piruat, J. I., and Aguilera, A. (1998). A novel yeast gene, THO2, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination. Embo J *17*, 4859-4872.

Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolsheimer, E.*, et al.* (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. Cell *122*, 517-527.

Powell, W., and Reines, D. (1996). Mutations in the second largest subunit of RNA polymerase II cause 6-azauracil sensitivity in yeast and increased transcriptional arrest *in vitro*. J Biol Chem *271*, 6866-6873.

Prado, F., Piruat, J. I., and Aguilera, A. (1997). Recombination between DNA repeats in yeast hpr1delta cells is linked to transcription elongation. Embo J *16*, 2826-2835.

Prakash, S., and Prakash, L. (2000). Nucleotide excision repair in yeast. Mutat Res *451*, 13-24.

Prather, D. M., Larschan, E., and Winston, F. (2005). Evidence that the elongation factor TFIIS plays a role in transcription initiation at GAL1 in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *25*, 2650-2659.

Prigent, C., Satoh, M. S., Daly, G., Barnes, D. E., and Lindahl, T. (1994). Aberrant DNA repair and DNA replication due to an inherited enzymatic defect in human DNA ligase I. Mol Cell Biol *14*, 310-317.

Proudfoot, N. J., Furger, A., and Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. Cell *108*, 501-512.

Puigserver, P., and Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev *24*, 78-90.

Q

Qian, X., Jeon, C., Yoon, H., and Weiss, M. A. (1993). Structure of a new nucleic-acid-binding motif in eukaryotic transcriptional elongation factors TFIIS. Nature *365*, 277-279.

Qiu, H., Hu, C., Yoon, S., Natarajan, K., Swanson, M. J., and Hinnebusch, A. G. (2004). An array of coactivators is required for optimal recruitment of TATA binding protein and RNA polymerase II by promoter-bound Gcn4p. Mol Cell Biol *24*, 4104-4117.

Qiu, H., Hu, C., Zhang, F., Hwang, G. J., Swanson, M. J., Boonchird, C., and Hinnebusch, A. G. (2005). Interdependent recruitment of SAGA and Srb mediator by transcriptional activator Gcn4p. Mol Cell Biol *25*, 3461-3474.

R

Rachez, C., and Freedman, L. P. (2001). Mediator complexes and transcription. Curr Opin Cell Biol *13*, 274-280.

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*, 824-828.

Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C. P., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L. P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. Genes Dev *12*, 1787-1800.

Rani, P. G., Ranish, J. A., and Hahn, S. (2004). RNA polymerase II (Pol II)-TFIIF and Pol II-mediator complexes: the major stable Pol II complexes and their activity in transcription initiation and reinitiation. Mol Cell Biol *24*, 1709-1720.

Ranish, J. A., and Hahn, S. (1996). Transcription: basal factors and activation. Curr Opin Genet Dev *6*, 151-158.

Ranish, J. A., Hahn, S., Lu, Y., Yi, E. C., Li, X. J., Eng, J., and Aebersold, R. (2004). Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIH. Nat Genet *36*, 707-713.

Rappaport, J., Reinberg, D., Zandomeni, R., and Weinmann, R. (1987). Purification and functional characterization of transcription factor SII from calf thymus. Role in RNA polymerase II elongation. J Biol Chem *262*, 5227-5232.

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 U S A *93*, 6482-6487.

Reeves, W. M., and Hahn, S. (2003). Activator-independent functions of the yeast mediator sin4 complex in preinitiation complex formation and transcription reinitiation. Mol Cell Biol *23*, 349-358.

Reeves, W. M., and Hahn, S. (2005). Targets of the Gal4 transcription activator in functional transcription complexes. Mol Cell Biol *25*, 9092-9102.

Reinberg, D., Orphanides, G., Ebright, R., Akoulitchev, S., Carcamo, J., Cho, H., Cortes, P., Drapkin, R., Flores, O., Ha, I.*, et al.* (1998). The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. Cold Spring Harb Symp Quant Biol *63*, 83-103.

Reinberg, D., and Roeder, R. G. (1987). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Transcription factor IIS stimulates elongation of RNA chains. J Biol Chem *262*, 3331-3337.

Reines, D., Ghanouni, P., Li, Q. Q., and Mote, J., Jr. (1992). The RNA polymerase II elongation complex. Factor-dependent transcription elongation involves nascent RNA cleavage. J Biol Chem *267*, 15516-15522.

Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J. M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. Embo J *22*, 5293-5303.

Risheg, H., Graham, J. M., Jr., Clark, R. D., Rogers, R. C., Opitz, J. M., Moeschler, J. B., Peiffer, A. P., May, M., Joseph, S. M., Jones, J. R.*, et al.* (2007). A recurrent mutation in MED12 leading to R961W causes Opitz-Kaveggia syndrome. Nat Genet *39*, 451-453.

Robert, F., Forget, D., Lis, J., Greenblatt, J., and Coulombe, B. (1996). Localization of subunits of transcription factors IIE and IIF immediately upstream of the transcriptional initiation site of the adenovirus major late promoter. J Biol Chem *271*, 8517-8520.

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.

Rodriguez, C. R., Cho, E. J., Keogh, M. C., Moore, C. L., Greenleaf, A. L., and Buratowski, S. (2000). Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. Mol Cell Biol *20*, 104-112.

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*, 1628-1637.

Roy, R., Adamczewski, J. P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J.-P., 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.

Rudd, M. D., Izban, M. G., and Luse, D. S. (1994). The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *91*, 8057-8061.

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*, 446-450.

S

Sakurai, H., and Fukasawa, T. (1997). Yeast Gal11 and transcription factor IIE function through a common pathway in transcriptional regulation. J Biol Chem *272*, 32663-32669.

Sakurai, H., and Fukasawa, T. (1999). Activator-specific requirement for the general transcription factor IIE in yeast. Biochem Biophys Res Commun *261*, 734-739.

Sakurai, H., Kim, Y. J., Ohishi, T., Kornberg, R. D., and Fukasawa, T. (1996). The yeast GAL11 protein binds to the transcription factor IIE through GAL11 regions essential for its in vivo function. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 9488-9492.

Sanders, S. L., Jennings, J., Canutescu, A., Link, A. J., and Weil, P. A. (2002). Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. Mol Cell Biol *22*, 4723-4738.

Sanders, S. L., and Weil, P. A. (2000). Identification of two novel TAF subunits of the yeast Saccharomyces cerevisiae TFIID complex. J Biol Chem *275*, 13895-13900.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. Nature *419*, 407-411.

Sarasin, A., and Stary, A. (2007). New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. DNA Repair (Amst) *6*, 265-269.

Sarker, A. H., Tsutakawa, S. E., Kostek, S., Ng, C., Shin, D. S., Peris, M., Campeau, E., Tainer, J. A., Nogales, E., and Cooper, P. K. (2005). Recognition of RNA polymerase II and

transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. Mol Cell *20*, 187-198.

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Florens, L., Zybailov, B., Swanson, S. K., Banks, C. A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M. P.*, et al.* (2004). A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. Mol Cell *14*, 685-691.

Sauer, F., Fondell, J. D., Ohkuma, Y., Roeder, R. G., and Jackle, H. (1995). Control of transcription by Kruppel through interactions with TFIIB and TFIIE beta. Nature *375*, 162-164.

Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D., and Egly, J. M. (2000). Molecular structure of human TFIIH. Cell *102*, 599-607.

Schwartz, C. E., Tarpey, P. S., Lubs, H. A., Verloes, A., May, M. M., Risheg, H., Friez, M. J., Futreal, P. A., Edkins, S., Teague, J. W.*, et al.* (2007). The original Lujan Syndrome Family has a novel missense mutation (p.N1007S) in the MED12 gene. J Med Genet.

Sekimizu, K., Kobayashi, N., Mizuno, D., and Natori, S. (1976). Purification of a factor from Ehrlich ascites tumor cells specifically stimulating RNA polymerase II. Biochemistry *15*, 5064-5070.

Sekinger, E. A., Moqtaderi, Z., and Struhl, K. (2005). Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. Mol Cell *18*, 735-748.

Sermwittayawong, D., and Tan, S. (2006). SAGA binds TBP via its Spt8 subunit in competition with DNA: implications for TBP recruitment. Embo J *25*, 3791-3800.

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*, 33260-33266.

Shen, W. C., Bhaumik, S. R., Causton, H. C., Simon, I., Zhu, X., Jennings, E. G., Wang, T. H., Young, R. A., and Green, M. R. (2003). Systematic analysis of essential yeast TAFs in genome-wide transcription and preinitiation complex assembly. Embo J *22*, 3395-3402.

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., Podust, V. N., Hubscher, 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.

Shpakovski, G. V., Acker, J., Wintzerith, M., Lacroix, J.-F., Thuriaux, P., and Vigneron, M. (1995). Four subunits that are shared by the three classes of RNA polymerase are functionally interchangeable between *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol *15*, 4702-4710.

Shuttleworth, J., Godfrey, R., and Colman, A. (1990). p40MO15, a cdc2-related protein kinase involved in negative regulation of meiotic maturation of Xenopus oocytes. Embo J *9*, 3233-3240.

Sil, A. K., Alam, S., Xin, P., Ma, L., Morgan, M., Lebo, C. M., Woods, M. P., and Hopper, J. E. (1999). The Gal3p-Gal80p-Gal4p transcription switch of yeast: Gal3p destabilizes the Gal80p-Gal4p complex in response to galactose and ATP. Mol Cell Biol *19*, 7828-7840.

Singer, V. L., Wobbe, C. R., and Struhl, K. (1990). A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. Genes Dev *4*, 636-645.

Sluder, A. E., Greenleaf, A. L., and Price, D. H. (1989). Properties of a Drosophila RNA polymerase II elongation factor. J Biol Chem *264*, 8963-8969.

Smale, S. T., and Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. Annu Rev Biochem *72*, 449-479.

Smith, R. L., and Johnson, A. D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. Trends Biochem Sci *25*, 325-330.

Soding, J., Biegert, A., and Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. Nucleic Acids Res *33*, W244-248.

Sogaard, T. M., and Svejstrup, J. Q. (2007). Hyper-phosphorylation of the carboxyterminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. J Biol Chem.

Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and Hurt, E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. Nature *417*, 304-308.

Struhl, K. (1984). Genetic properties and chromatin structure of the yeast gal regulatory element: An enhancer-like sequence. Proc Natl Acad Sci USA *81*, 7865-7869.

Struhl, K. (1995). Yeast transcriptional mechanisms. Annual Reviews of Genetics *29*, 651-674.

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*, 213-222.

Sun, Z.-W., Tessmer, A., and Hampsey, M. (1996). Functional interaction between TFIIB and the Rpb9 (Ssu73) subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res *24*, 2560-2566.

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. (2002). Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 21-29.

Svejstrup, J. Q. (2004). The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. Biochim Biophys Acta *1677*, 64-73.

Svejstrup, J. Q., Wang, Z., Feaver, W. J., Wu, X., Bushnell, D. A., Donahue, T. F., Friedberg, E. C., 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.

T

Takagi, Y., Calero, G., Komori, H., Brown, J. A., Ehrensberger, A. H., Hudmon, A., Asturias, F., and Kornberg, R. D. (2006). Head module control of mediator interactions. Mol Cell *23*, 355-364.

Takagi, Y., Chadick, J. Z., Davis, J. A., and Asturias, F. J. (2005). Preponderance of free mediator in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem *280*, 31200-31207.

Takagi, Y., Komori, H., Chang, W. H., Hudmon, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R. D. (2003). Revised subunit structure of yeast transcription factor IIH (TFIIH) and reconciliation with human TFIIH. J Biol Chem *278*, 43897-43900.

Takagi, Y., and Kornberg, R. D. (2006). Mediator as a general transcription factor. J Biol Chem *281*, 80-89.

Taylor, I. C., Workman, J. L., Schuetz, T. J., and Kingston, R. E. (1991). Facilitated binding of GAL4 and heat shock factor to nucleosomal templates: differential function of DNA-binding domains. Genes Dev *5*, 1285-1298.

Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol Mol Biol Rev *61*, 503-532.

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.

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.

Timmers, H. T., and Tora, L. (2005). SAGA unveiled. Trends Biochem Sci *30*, 7-10.

Tirode, 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.

Topalidou, I., and Thireos, G. (2003). Gcn4 occupancy of open reading frame regions results in the recruitment of chromatin-modifying complexes but not the mediator complex. EMBO Rep *4*, 872-876.

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 transcription factor IIH. J Biol Chem *276*, 27693-27697.

Triezenberg, S. J. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. Curr Opin Genet Dev *5*, 190-196.

Tsai, F. T., and Sigler, P. B. (2000). Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. Embo J *19*, 25-36.

U

Uptain, S. M., Kane, C. M., and Chamberlin, M. J. (1997). Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. Annual Reviews of Biochemistry *66*, 117-172.

Urahama, N., Ito, M., Sada, A., Yakushijin, K., Yamamoto, K., Okamura, A., Minagawa, K., Hato, A., Chihara, K., Roeder, R. G., and Matsui, T. (2005). The role of transcriptional coactivator TRAP220 in myelomonocytic differentiation. Genes Cells *10*, 1127-1137.

Usheva, A., Maldonado, E., Goldring, A., Lu, H., Houbavi, C., Reinberg, D., and Aloni, Y. (1992). Specific interaction between the non-phosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein. Cell *69*, 871-881.

V

van de Peppel, J., Kettelarij, N., van Bakel, H., Kockelkorn, T. T., van Leenen, D., and Holstege, F. C. (2005). Mediator expression profiling epistasis reveals a signal transduction pathway with antagonistic submodules and highly specific downstream targets. Mol Cell *19*, 511-522.

Van Mullem, V., Wery, M., Werner, M., Vandenhaute, J., and Thuriaux, P. (2002). The Rpb9 Subunit of RNA Polymerase II Binds Transcription Factor TFIIE and Interferes with the SAGA and Elongator Histone Acetyltransferases. J Biol Chem *277*, 10220-10225.

Verrijzer, C. P., Chen, J. L., Yokomori, K., and Tjian, R. (1995). Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. Cell *81*, 1115-1125.

Vijayvargia, R., May, M. S., and Fondell, J. D. (2007). A coregulatory role for the mediator complex in prostate cancer cell proliferation and gene expression. Cancer Res *67*, 4034-4041.

W

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F.*, et al.* (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. Genes and Development *12*, 343-356.

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*, 2004-2013.

Wallberg, A. E., Yamamura, S., Malik, S., Spiegelman, B. M., and Roeder, R. G. (2003). Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha. Mol Cell *12*, 1137-1149.

Wang, D., and Hawley, D. K. (1993). Identification of a 3'-->5' exonuclease activity associated with human RNA polymerase II. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 843-847.

Wang, Q., Sharma, D., Ren, Y., and Fondell, J. D. (2002). A coregulatory role for the TRAP-mediator complex in androgen receptor-mediated gene expression. J Biol Chem *277*, 42852-42858.

Wang, S., Ge, K., Roeder, R. G., and Hankinson, O. (2004). Role of mediator in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. J Biol Chem *279*, 13593-13600.

Wang, X., Yang, N., Uno, E., Roeder, R. G., and Guo, S. (2006). A subunit of the mediator complex regulates vertebrate neuronal development. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 17284-17289.

Wang, Z., Buratowski, S., Svejstrup, J. Q., Feaver, W. J., Wu, X., Kornberg, R. D., Donahue, T. F., and Friedberg, E. C. (1995). The yeast TFB1 and SSL1 genes, which encode subunits of transcription factor IIH, are required for nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription. Mol Cell Biol *15*, 2288-2293.

Warfield, L., Ranish, J. A., and Hahn, S. (2004). Positive and negative functions of the SAGA complex mediated through interaction of Spt8 with TBP and the N-terminal domain of TFIIA. Genes Dev *18*, 1022-1034.

Wery, M., Shematorova, E., Van Driessche, B., Vandenhaute, J., Thuriaux, P., and Van Mullem, V. (2004). Members of the SAGA and Mediator complexes are partners of the transcription elongation factor TFIIS. Embo J *23*, 4232-4242.

West, M. L., and Corden, J. L. (1995). Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. Genetics *140*, 1223-1233.

Wind, M., and Reines, D. (2000). Transcription elongation factor SII. Bioessays *22*, 327-336.

Wittschieben, B. O., Otero, G., de Bizemont, T., Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Ohba, R., Li, Y., Allis, C. D., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. Mol Cell *4*, 123-128.

Wobbe, C. R., and Struhl, K. (1990). Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription in vitro. Mol Cell Biol *10*, 3859-3867.

Wood, R. D. (1997). Nucleotide excision repair in mammalian cells. J Biol Chem *272*, 23465-23468.

X

Xiao, T., Hall, H., Kizer, K. O., Shibata, Y., Hall, M. C., Borchers, C. H., and Strahl, B. D. (2003). Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. Genes Dev *17*, 654-663.

Y

Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. Cell *97*, 41-51.

Yan, M., and Gralla, J. D. (1997). Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation. EMBO J *16*, 7457-7467.

Yang, F., Vought, B. W., Satterlee, J. S., Walker, A. K., Jim Sun, Z. Y., Watts, J. L., DeBeaumont, R., Saito, R. M., Hyberts, S. G., Yang, S.*, et al.* (2006). An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. Nature *442*, 700-704.

Yankulov, K. Y., and Bentley, D. L. (1997). Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIH. Embo J *16*, 1638-1646.

Yoon, S., Qiu, H., Swanson, M. J., and Hinnebusch, A. G. (2003). Recruitment of SWI/SNF by Gcn4p does not require Snf2p or Gcn5p but depends strongly on SWI/SNF integrity, SRB mediator, and SAGA. Mol Cell Biol *23*, 8829-8845.

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*, 1598-1604.

Yuan, G. C., Liu, Y. J., Dion, M. F., Slack, M. D., Wu, L. F., Altschuler, S. J., and Rando, O. J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in S. cerevisiae. Science *309*, 626-630.

Yudkovsky, N., Ranish, J. A., and Hahn, S. (2000a). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. Nature *408*, 225-229.

Yudkovsky, N., Ranish, J. A., and Hahn, S. (2000b). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. Nature *408*, 225-229.

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 U S A *94*, 12898-12903.

Z

Zaman, Z., Ansari, A. Z., Koh, S. S., Young, R., and Ptashne, M. (2001). Interaction of a transcriptional repressor with the RNA polymerase II holoenzyme plays a crucial role in repression. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 2550-2554.

Zhu, A., and Kuziora, M. A. (1996). Homeodomain interaction with the beta subunit of the general transcription factor TFIIE. J Biol Chem *271*, 20993-20996.

Zhu, X., Wiren, M., Sinha, I., Rasmussen, N. N., Linder, T., Holmberg, S., Ekwall, K., and Gustafsson, C. M. (2006). Genome-wide occupancy profile of mediator and the Srb8-11 module reveals interactions with coding regions. Mol Cell *22*, 169-178.

Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F., and Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. Cell *94*, 471-480.

Zurita, M., and Merino, C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIIH complex. Trends Genet *19*, 578-584.

TFIIS elongation factor and Mediator act in conjunction during transcription initiation *in vivo*

Benjamin Guglielmi*, Julie Soutourina, Cyril Esnault, and Michel Werner†

Commissariat à l'Energie Atomique, Institut de Biologie et Technologies de Saclay, Bâtiment 144, Commissariat à l'Energie Atomique/Saclay, Gif-sur-Yvette Cedex F-91191, France

Edited by Richard M. Losick, Harvard University, Cambridge, MA, and approved August 21, 2007 (received for review May 17, 2007)

The transcription initiation and elongation steps of protein-coding genes usually rely on unrelated protein complexes. However, the TFIIS elongation factor is implicated in both processes. We found that, in the absence of the Med31 Mediator subunit, yeast cells required the TFIIS polymerase II (Pol II)-binding domain but not its RNA cleavage stimulatory activity that is associated with its elongation function. We also found that the TFIIS Pol II-interacting domain was needed for the full recruitment of Pol II to several promoters in the absence of Med31. This work demonstrated that, in addition to its thoroughly characterized role in transcription elongation, TFIIS is implicated through its Pol II-binding domain in the formation or stabilization of the transcription initiation complex *in vivo*.

RNA polymerase II | *Saccharomyces cerevisiae* | transcription regulation | Med31 | Mediator subunit

The transcription of protein-coding eukaryotic genes by RNA polymerase II (Pol II) requires three successive steps: initiation, elongation, and termination. Transcription initiation of class II genes involves the binding of activators to regulatory sequences; the recruitment of RNA Pol II to the core promoter via interactions with activators, coactivators, and general transcription factors; and the initiation reaction *per se* with DNA strand opening and abortive initiation (1). A major coactivator target of transcriptional activators is the Mediator (2, 3). One of its activities is the recruitment and/or stabilization of Pol II at core promoters (4). After transcription initiation, Pol II enters elongation, during which it can be arrested because of the presence of specific DNA sequences that promote pausing, or because of obstacles such as DNA damage or bound proteins. To avoid or escape arrest, Pol II requires different elongation factors, including TFIIS (5). Evidence suggests that TFIIS could be implicated in both initiation and elongation.

In vitro, TFIIS can reactivate arrested elongation complexes by stimulating endonucleolytic cleavage by Pol II of the nascent RNA (5). TFIIS is composed of three domains that fold independently, as demonstrated by NMR analysis of its structure (6, 7). Cleavage-stimulating activity minimally requires the C-terminal two-thirds of the protein, that is, its domain II and III separated by a 15-aa linker (7, 8). Domain II forms a three-helix bundle followed by three short helices, with a basic patch on the third helix (α-3) that is essential for TFIIS binding to Pol II (7). Crystallographic analysis of a TFIIS–Pol II complex confirmed that this basic patch lies at the TFIIS–Pol II interface (7, 8). TFIIS binding to Pol II is required for domain III to reach the Pol II active site. Domain III forms a zinc ribbon that contains a conserved RSADE motif, responsible for the stimulation of RNA cleavage (7, 8).

TFIIS is also implicated in transcription initiation. First, the deletion of the *DST1* gene, encoding TFIIS in yeast, is colethal with the deletion of the gene encoding the Med31 subunit of the Mediator complex (9). Second, TFIIS is recruited to the promoter of *GAL1*, and the deletion of *DST1* reduces the recruitment of the transcription machinery on the promoter of *GAL1* (10). However, the reported experiments did not investigate the generality of the TFIIS requirement in transcription initiation or the TFIIS elements required for this function.

Here, we analyze more precisely which activity of TFIIS was responsible for the colethality of *dst1*-Δ with *med31*-Δ. Remarkably, mutants of TFIIS impaired in its cleavage stimulatory activity could grow in a *MED31* deleted strain. In line with these observations, domain II and the linker together, i.e., the Rpb1-interacting domain of TFIIS, were sufficient to rescue *dst1*-Δ *med31*-Δ colethality. We thus hypothesized that TFIIS could play a role in transcription initiation independent of its cleavage activity. We demonstrated that TFIIS is recruited at *ADH1*, *VTC3*, and *MET17* promoters, and that the Pol II-binding activity of TFIIS was required for efficient recruitment of Pol II to these promoters *in vivo* in the absence of *MED31*. These data fit nicely with those obtained by Ranish and coworkers (11), indicating that, *in vitro*, TFIIS contributes to the formation of the Pol II preinitiation complexes independently of its role in elongation. Thus, we propose that TFIIS is required for optimal occupancy of Pol II at promoters of a subset of *Saccharomyces cerevisiae* genes.

Results

TFIIS Domain II and Linker Are Sufficient to Complement *dst1*-Δ *med31*-Δ Colethality. Because TFIIS is composed of three domains that fold independently (6–8), we designed truncation mutants of TFIIS, using its structure as a guide (Fig. 1 *A* and *B Left*) to find which parts of the protein are required for complementation of the *dst1*-Δ *med31*-Δ colethality. These truncation mutants were transformed in a strain deleted for both *MED31* and *DST1*, complemented by the *MED31* gene on a *URA3* centromeric plasmid [supporting information (SI) Table 1]. The various mutant strains were then tested for sensitivity to mycophenolic acid (MPA) or for growth on 5-fluorooroatic acid (5FOA). MPA is an inhibitor of guanine nucleotide biosynthesis. Transcriptional elongation defects due to the loss of TFIIS cleavage activity prevent growth on MPA (12), whereas the absence of growth on 5FOA revealed colethality of the *dst1* truncation mutation with *med31*-Δ. The second line of Fig. 1*B* confirms that deletion of the entire *DST1* gene is lethal in the *med31*-Δ context. We found that TFIIS capacity to stimulate the hydrolytic activity of Pol II was dispensable in the *med31*-Δ context, because complete truncation of amino acids 266–309 of TFIIS domain III did not lead to lethality (Fig. 1*B*, line 3) but renders the

Author contributions: B.G. and J.S. contributed equally to this work; B.G., J.S., and M.W. designed research; B.G., J.S., and C.E. performed research; B.G., J.S., C.E., and M.W. analyzed data; and B.G. and M.W. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: Pol II, polymerase II; MPA, mycophenolic acid; 5FOA, 5-fluorooroatic acid; YPD, yeast extract/peptone/dextrose; CTD, C-terminal domain.

*Present address: Department of Molecular and Cell Biology, University of California, 16 Barker Hall, Berkeley, CA 94720-3204.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: michel.werner@cea.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0704534104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

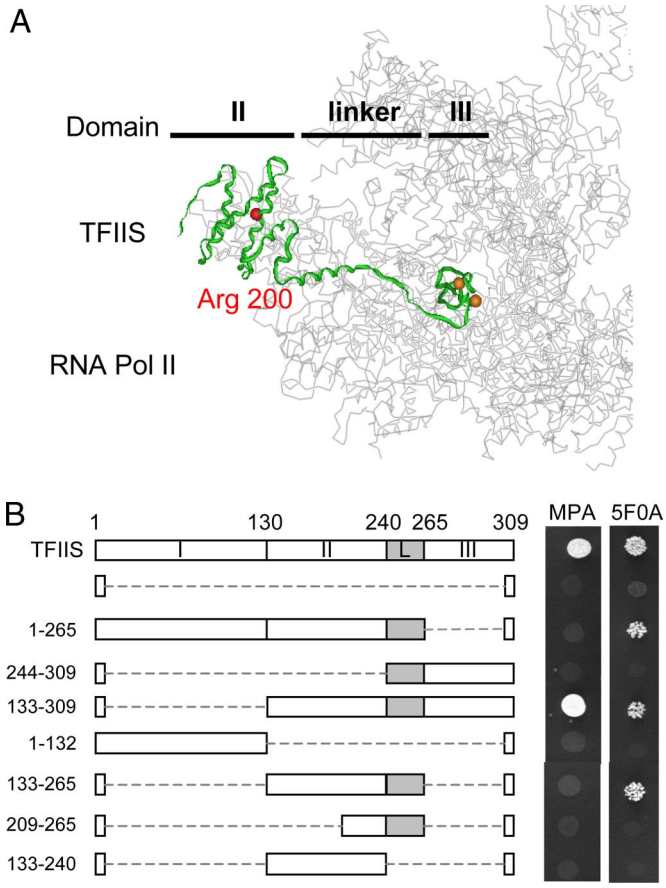


Fig. 1. The cleavage activity and N terminus of TFIIS are not necessary to complement the colethality of *dst1*-Δ with *med31*-Δ. (*A*) Molecular structure of the TFIIS–RNA Pol II complex (8). TFIIS is indicated in green and Pol II in gray. The position of the R200A mutated residue used in this study appears as a red ball. Orange balls outline residues essential for TFIIS cleavage activity. Black bars indicate TFIIS domains. Domain I is not represented because its structure was not solved in the complex with Pol II. (*B*) Test of *DST1* truncation mutant growth on MPA and 5FOA medium at 30°C. (*Left*) Schematic representation of TFIIS deletion mutants used relative to the wild-type protein. The amino acid positions bordering the fragments are indicated on the left.

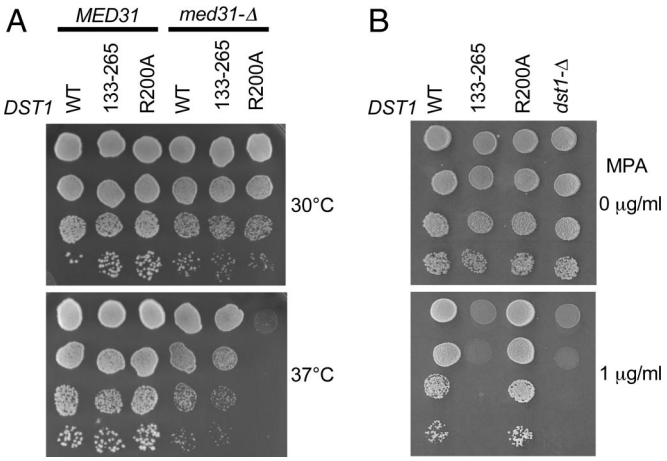


Fig. 2. The TFIIS-R200A mutation hampers complementation of *dst1* colethality with *med31*, but not sensitivity to MPA. (*A*) Growth of *dst1-(133–265)* and *dst1-R200A* mutated strains relative to wild-type *DST1* in *MED31* or *med31*-Δ context. Suspensions of the strains were serially diluted, spotted on glucose-rich medium (YPD), and grown at 30°C or 37°C for 2 days. (*B*) Sensitivity to MPA of *dst1-(133–265)* and *dst1-R200A* strains compared with wild-type strain. Suspensions of the strains were serially diluted, spotted on synthetic complete medium, and grown at 37°C in the presence or absence of mycophenolate for 6 days.

strain sensitive to MPA. Conversely, domain III alone was not sufficient to render the strain viable (Fig. 1*B*, line 4). This observation confirms that TFIIS cleavage activity is dispensable to complement *dst1*-Δ *med31*-Δ colethality.

We thus investigated the requirement for TFIIS domains I and II in this assay. The deletion of TFIIS domain I (amino acids 1–132) did not lead to MPA sensitivity or to colethality (Fig. 1*B*, line 5). Accordingly, domain I alone was unable to complement either phenotype (Fig. 1*B*, line 6). However, domain II and the following linker were sufficient to restore growth in the double-deleted strain (Fig. 1*B*, line 7) but were unable to restore resistance to MPA. This minimal domain, named TFIIS− (133–265), could not be shortened further (Fig. 1*B*, lines 8 and 9). In conclusion, the minimal sequence needed to complement *dst1*-Δ *med31*-Δ colethality consisted of domain II and the linker to domain III.

The TFIIS-R200A Domain II Mutant Could Not Complement *dst1*-Δ *med31*-Δ Colethality and Was Not Impaired in Elongation. We found the TFIIS domain II plus linker to be required for complementation of the *dst1*-Δ *med31*-Δ colethality. Because the only previously known function of TFIIS domain II is Pol II binding *in vitro* through an interaction with Rpb1, we investigated the role of this function for *dst1*-Δ *med31*-Δ complementation. Structural and biochemical data suggest that a basic patch of TFIIS domain II is essential for Pol II binding (7, 8). We mutated the arginine 200 residue of the TFIIS basic patch to an alanine (*dst1-R200A*) and investigated its effect on complementation of the *dst1*-Δ *med31*-Δ colethal phenotype. As shown Fig. 2*A Upper*, the *dst1-R200A med31*-Δ double mutant strain grew as well as the *DST1 med31*-Δ strain at 30°C. However, when grown at 37°C, the *dst1-R200A* mutant was colethal with *med31*-Δ, whereas wild-type *DST1* and *dst1-(133–265)* remained fully viable. This observation suggested that the Pol II-binding function of TFIIS is essential in the *med31*-Δ context.

Reciprocally, we tested whether *dst1-R200A* mutation decreased TFIIS transcription elongation activity. At 37°C, wild-type yeast strains are killed by lower MPA concentrations than those required to hamper growth at 30°C. We plated the *dst1-R200A* mutant strain on complete synthetic medium with 1 μg/ml MPA at 37°C (Fig. 2*B*). Contrary to the *dst1*-Δ strain, *dst1-R200A* grew as well as the *DST1* wild-type strain, indicating that *dst1-R200A* was not defective in TFIIS transcription elongation activity.

Requirement of R200 Residue of TFIIS and Med31 for Pol II Recruitment at a Subset of Yeast Promoters. To find genes affected in their transcription in the *dst1-R200A* context, we turned to global transcriptome analysis. *DST1 med31*-Δ and *dst1-R200A med31*-Δ cells were cultured at 30°C in yeast extract/peptone/dextrose (YPD) glucose-rich medium in exponential growth phase, then half of the culture was shifted to 37°C for 30 min. mRNAs were analyzed by using DNA microarrays as described (13). Ninety-two genes were expressed at least 2-fold less in the *dst1-R200A med31*-Δ strain compared with the *DST1 med31*-Δ strain when grown at 30°C, and 82 genes were less expressed in the *dst1-R200A med31*-Δ strain compared with the *DST1 med31*-Δ strain at 37°C (SI Tables 2 and 3). Shifting cells to 37°C increased only slightly the gene expression defect in the *dst1-R200A med31*-Δ strain. At 37°C, the transcription of 18 genes increased ≥2-fold in the mutant compared with the wild type. The maximum induction was only 3.3-fold for the *BIK1* gene (SI Tables 4 and 5). Because the number of genes that were induced and the

BIOCHEMISTRY

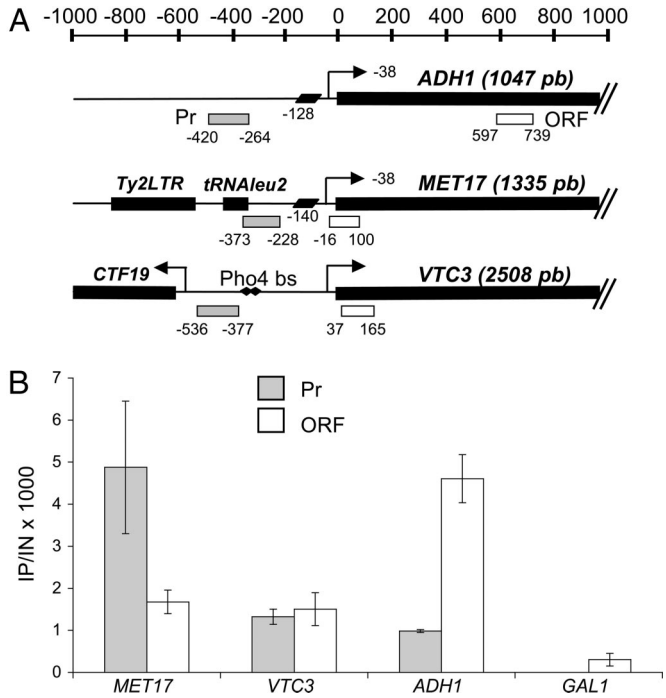


Fig. 3. TFIIS is recruited to the promoter and coding sequence of three different genes. (*A*) Schematic promoter and coding region organization of *ADH1*, *MET17*, and *VTC3* showing the location of primer pairs used in ChIP analysis. Scale is of 200 base pairs for one graduation. A promoter-specific primer pair (labeled Pr) and an ORF-specific primer pair (labeled ORF) are used for each gene. The location of the major transcription start site (TSS) relative to ATG of genes is indicated in base pairs. TSS are located at −61, −49, −43, −38, −33, −31, −20, and −12 for *ADH1*, at −52, −43, −40, and −38 for *MET17* (33). Their position is unknown for *VTC3*. Diamonds indicate activator-binding sequences (taken from *Saccharomyces* Genome Database). Small parallelograms indicate the position of the TATA box (34). The arrows indicate the position of the TSS. Only confirmed neighbor genes are represented (*Saccharomyces* Genome Database). (*B*) ChIP analysis of 3HA-TFIIS binding to promoter or ORF of *ADH1*, *MET17*, and *VTC3*. Analysis of nontranscribed *GAL1* ORF served as control for TFIIS background binding. Cells were grown to exponential phase in glucose-rich medium (YPD) at 30°C before cross-linking.

magnitude of the effect on mRNA levels were rather low, we did not investigate the significance of this observation further.

We analyzed more thoroughly three genes that were affected in the *dst1-R200A med31*-Δ strain: *ADH1*, *MET17*, and *VTC3*. We measured by RT-PCR the mRNA quantities in *dst1-R200A med31*-Δ at 30°C and 37°C. We found that mRNA levels decreased 1.5- and 2.5-fold for *ADH1* at the permissive and restrictive temperatures, respectively; 2.1- and 3.8-fold for *MET17*; and 2.4- and 2.3-fold for *VTC3*, in good agreement with the microarray data.

TFIIS Is Recruited to the Promoter of *ADH1*, *MET17*, and *VTC3*. We looked for TFIIS recruitment on these genes through ChIP. We used an N-terminal HA-tagged version of TFIIS, the fusion being expressed from the chromosome (a gift from M. Wery and P. Thuriaux, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France). Primer pairs were designed to amplify the promoters or the coding sequences of *ADH1*, *MET17*, and *VTC3* (Fig. 3*A*). Primers pairs amplifying *GAL1* sequences were used for background noise estimation, because *GAL1* is not transcribed in the YPD glucose medium. We saw enrichment of TFIIS above background on the promoters and ORFs of all three genes (Fig. 3*B*). Because the presence of the HA tag could alter the function of TFIIS, we also performed ChIP experiments with anti-TFIIS antibodies (SI Fig. 5). The results were essentially the same, even though the background level was higher. In the case of *MET17* and *VTC3*, the amount of TFIIS on the promoter was greater than or equal to the amount on the ORF, suggesting a role for TFIIS in transcription initiation in addition to that in transcription elongation on these genes.

TFIIS Domain II Is Required for the Recruitment of Pol II to the Promoter of *ADH1*, *MET17*, and *VTC3*. The growth defect observed in the *dst1-R200A* mutant could result from lower Pol II recruitment or stability on affected promoters. Thus Pol II occupancy on *ADH1*, *MET17*, and *VTC3* genes was studied by ChIP. Cells were grown in YPD glucose-rich medium at 30°C, and the culture was shifted to 37°C for 30 min before cross-linking. Pol II was immunoprecipitated with 8WG16 anti-C-terminal domain (CTD) antibody. Fig. 4*A* shows that, taking the error margin into account, Pol II recruitment to promoters or ORFs was not modified in any TFIIS mutant strains compared with wild-type strain in a *MED31* wild-type background. However, deletion of *MED31* decreased the levels of Pol II on the promoters and ORFs by a factor of 2–4 (compare black histogram values of Fig. 4 *A* and *B*), showing that the *ADH1*, *MET17*, and *VTC3* genes depend on Med31 for highest occupancy. Pol II recruitment to promoters or ORFs did not change significantly in *dst1- (1–265) med31*-Δ compared with the *DST1 med31*-Δ strain, confirming that the cleavage activity of TFIIS domain III does not influence Pol II occupancy of *ADH1*, *MET17*, and *VTC3*, even in the *med31*-Δ mutant context (Fig. 4*B*). On the contrary, recruitment of Pol II was diminished 2-fold on promoters and coding sequences in the *dst1-R200A med31*-Δ strain compared with the *DST1 med31*-Δ strain. At 30°C, similar results were obtained (SI Fig. 6), in agreement with mRNA levels. We concluded that the correct transcription of *ADH1*, *MET17*, and *VTC3* did not require TFIIS cleavage activity, but that Pol II recruitment or stabilization on promoters of these genes depends on TFIIS Pol II-binding activity in the absence of Med31.

Recruitment of TATA Box-Binding Protein (TBP) and TFIIS Independent of Pol II to *ADH1*, *MET17*, and *VTC3*. Because Pol II occupancy was diminished at *ADH1*, *MET17*, and *VTC3* promoters and ORFs in *dst1-R200A med31*-Δ cells, we wanted to know whether other components of the preinitiation complex followed the same pattern. TBP recruitment was analyzed by ChIP, using anti-TBP antibodies (a gift from A. Weil, Vanderbilt University, Nashville, TN), in *DST1 med31*-Δ and *dst1-R200A med31*-Δ cells after a shift of 30 min to 37°C. Fig. 4*C* showed that no defect in TBP recruitment could be seen.

TFIIS recruitment was analyzed by ChIP, by using anti-TFIIS antibodies (a gift from C. Kane, University of California, Berkeley, CA), in *DST1 med31*-Δ and *dst1-R200A med31*-Δ cells after a shift of 30 min to 37°C. We looked at TFIIS occupancy using the same chromatin preparations as for the Pol II ChIP experiments of Fig. 4*B*. Fig. 4*D* showed that no defect in TFIIS recruitment could be seen in the *dst1-R200A* mutant compared with wild-type. We concluded that TFIIS was recruited independently of Pol II on these genes.

TFIIS Cleavage Activity Is Not Required for Rescuing *dst1*-Δ Colethality with an Rpb1 CTD Deletion. TFIIS inactivation exerts a synthetic effect with mutations in numerous genes, a number of which are implicated in transcription. Thus, we wanted to know whether the domain II and linker were sufficient to rescue the colethality of *dst1*-Δ with mutants other than *med31*-Δ. We investigated the well established colethality of *DST1* deletion with the Rpb1 CTD truncation. In yeast, Rpb1 CTD is composed of 26 or 27 repeats of a heptapeptide. Reducing the number of these repeats to 10–12, as in the *rpb1*-Δ*104* strain, is colethal with *dst1*-Δ (14). We modified the *rpb1*-Δ*104* strain (15) by fully deleting *DST1* and complementing it with a wild-type copy on a *URA3* vector. This

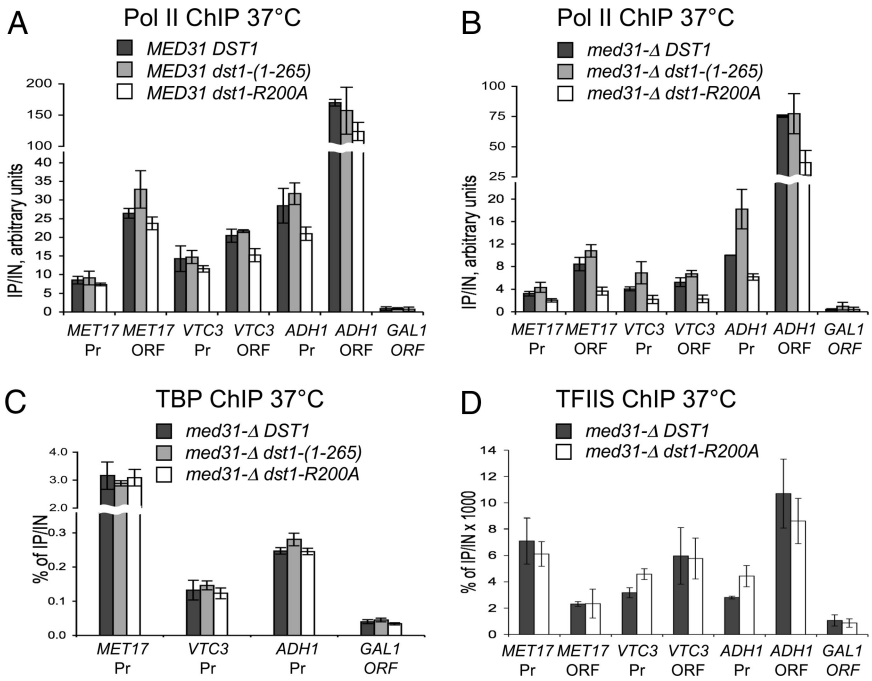


Fig. 4. ChIP analysis of the occupancy of promoter and ORF of *ADH1*, *MET17*, and *VTC3* in *DST1* and *MED31* mutant contexts. (*A*) ChIP analysis of Pol II in *DST1*, *dst1-(1–265)*, *dst1-R200A*, and *MED31* strains grown in rich glucose medium at 37°C. Immunoprecipitation signal over input signal is represented in arbitrary units. (*B*) ChIP analysis of Pol II in *DST1*, *dst1-(1–265)*, and *dst1-R200A* in *med31*-Δ background grown in rich glucose medium at 37°C. (*C*) ChIP analysis of TBP in *DST1*, *dst1-(1–265)*, *dst1-R200A*, and *med31*-Δ strains grown in rich glucose medium at 37°C. (*D*) ChIP analysis of TFIIS binding to promoter or ORF of *ADH1*, *MET17*, and *VTC3* in *med31*-Δ *DST1* and *med31*-Δ *dst1-R200A* strains. Cells were cultured to log phase in glucose-rich medium at 30°C and then shifted at 37°C for 30 min before cross-linking. Anti-TFIIS polyclonal antibodies were used for immunoprecipitation.

strain was transformed with vectors carrying the *DST1* truncations used above, and cells containing the *DST1* wild-type copy were counterselected on a 5FOA-containing medium. We confirmed the colethality of *rpb1*-Δ*104* mutation with *dst1*-Δ (SI Fig. 7, last row). However, the colethality was fully complemented by a TFIIS fragment composed of domain II and linker alone (SI Fig. 7, row 4).

Discussion

In this work, we show that the TFIIS elongation factor has a function required for the optimal transcription of selected genes. Importantly, this function of TFIIS is independent of its cleavage activity but requires its Pol II-binding domain. We show that TFIIS is required in conjunction with the Med31 Mediator subunit for full Pol II occupancy *in vivo* and thus has a dual and independent role in transcription initiation and elongation at a subset of genes. This conclusion is also supported by the independent finding by Ranish and coworkers (11) that TFIIS is important for preinitiation complex formation *in vitro*.

Domain II binds strongly to RNA Pol II *in vitro* through residues of a basic patch (7, 8). We mutated the R200A basic patch residue and found that the mutation was conditionally colethal with *med31*-Δ but did not affect MPA sensitivity, strongly suggesting a lack of effect on transcription elongation. Indeed, Struhl and coworkers showed that in a TFIIS mutant sensitivity to 6-azauracil, which, like MPA, is a nucleotide-depleting drug, correlated with decreased transcription processivity, and stimulated transcription through an arrest site *in vivo* (16, 17). The *dst1-R200A* mutation in the *med31*-Δ background affected the transcription of 80–90 genes and the recruitment of Pol II on the three genes (*ADH1*, *MET17*, and *VTC3*) that were selected among those that were transcription-impaired. However, eliminating RNA cleavage stimulatory activity had no effect on Pol II occupancy. TFIIS was recruited to the promoters of these genes, which is not the general situation (10). Contrary to Pol II, TFIIS itself was still recruited to the impaired genes, implicating an independent recruitment mechanism for TFIIS and Pol II. TBP association with promoters was also not altered, indicating that the *dst1-R200A* mutation did not affect the early steps of preinitiation complex formation *in vivo*.

We propose the following model. TFIIS would be recruited by activators or coactivators independently of Pol II to selected gene promoters. Then, TFIIS, in conjunction with coactivators such as the Mediator complex, would stimulate Pol II recruitment or stabilization on promoters via a direct interaction with the enzyme through its Pol II-binding site.

In vitro, the TFIIS basic patch is important for TFIIS binding to RNA Pol II (7, 8). Whereas the TFIIS-R200A mutation reduced Pol II occupancy at promoters of selected genes, it did not affect sensitivity to MPA or occupation of TFIIS on ORFs, suggesting that *in vivo*, this mutation renders TFIIS Pol II binding limiting for preinitiation complex formation but not for transcription elongation.

The TFIIS minimal domain required for full complementation of *dst1*-Δ *med31*-Δ colethality and full occupancy of Pol II on promoters contained the linker domain in addition to domain II. We were able to construct a viable but very slow-growing *dst1*-Δ *med31*-Δ strain complemented by the first three α-helices of TFIIS domain II alone (data not shown). The presence of the linker sequence could protect domain II from degradation in its free form *in vivo* or might stabilize domain II association with Pol II.

TFIIS domain II and linker were sufficient to complement the colethality of the Rpb1 CTD truncation with *dst1*-Δ. Rpb1 CTD is bound by the Mediator complex and may be required for Pol II recruitment to activated promoters (18). Colethality of *rpb1*-Δ*104* with *dst1*-Δ may also be due to a synergistic defect in Pol II recruitment to promoters. This possibility is reinforced by the

BIOCHEMISTRY

colethality of *rpb1-Δ104* with *med31-Δ* (19). Thus, TFIIS Pol II-binding activity may be required when the transcription machinery is defective in Pol II recruitment on activated promoters.

In our experiments with *ADH1*, *MET17*, and *VTC3*, we did not use mutants of the TFIIS domain I, because *dst1-(133–265)* lacking this domain was not colethal with *med31-Δ*. The Pol II ChIP results obtained using such a mutated strain were very variable, despite our best efforts (data not shown). This situation may be due to an unknown role of this domain. Indeed, it has been shown that domain I interacts with the Med13 (Srb9) Mediator and Spt8 SAGA subunits (20). Moreover, TFIIS domain I is required when the Rpb4 subunit of Pol II is absent. It is thus possible that TFIIS domain I, as the Pol II-binding domain, might have a role in transcription initiation at some promoters when subunits of the transcription machinery are lacking, as suggested by the data in the accompanying paper by Kim *et al.* (11), indicating that domain I contributes to PIC assembly *in vitro*.

Med31 is the most conserved subunit of Mediator in terms of protein sequence conservation and is present in most, if not all, eukaryotic organisms (21). It has been proposed previously that the most conserved subunits of Mediator form a core complex oriented toward Pol II (22). These subunits belong to the Mediator middle module known to contact Pol II (23), and they are essential in yeast. Med31 interacts with subunits of the middle module (24, 25), but is essential neither in *S. cerevisiae* nor in *Schizosaccharomyces pombe* (26) despite its strong conservation. This situation could be explained if the role of Med31 and TFIIS in conjunction during transcription initiation also holds in eukaryote species other than *S. cerevisiae*, a very likely possibility in view of the strong conservation of TFIIS throughout the eukaryotic kingdom.

In conclusion, we provide insights into the *in vivo* function of the TFIIS transcription factor independent of its well characterized stimulatory activity on Pol II RNA cleavage and requiring its Pol II-binding domain. TFIIS acts in transcription initiation in conjunction with the Med31 Mediator subunit and contributes to the optimal Pol II occupancy at a subset of gene promoters *in vivo*.

Experimental Procedures

Oligonucleotides. The sequence of the oligonucleotides used in this study can be found in *SI Text*.

Plasmid Construction and Cloning. All cloning was done by using the Gateway Invitrogen cloning method following the standard protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA). The *DST1* cloned sequences were transferred into pVV204 (*CEN TRP1 pTetO$_7$*) vector (27) by the LR reaction (Gateway Technology; Invitrogen, Carlsbad, CA). *R200A* point mutation in *DST1* was obtained by PCR overlap extension mutagenesis (28) and cloned by using the Gateway standard method and transferred into pVV204 as well.

MED31 was cloned the same way as *DST1* and transferred into pVV208 (*CEN URA3 pTetO$_7$*) vector (27).

Yeast Strains. *MED31* was deleted in YPH500 background (*MAT**a** ura3–52 his3–200 ade2–101 trp1–63 lys2–801 leu2–1*) and replaced by a *kan* marker using the standard one-step method (29).

The ESH1 (20) strain deleted for *DST1* was transformed with the *CEN URA3 pTetO$_7$:MED31* plasmid and then deleted for *MED31* with a *kan* marker. The collection of cloned *DST1* mutants was transformed into this strain. The rpb1-Δ104 strain (15) was transformed with a *CEN URA3 pTetO$_7$:DST1*, then the chromosomal copy of *DST1* was deleted by a *HIS3MX6* marker (29). The resulting strain was transformed with the collection of cloned *DST1* mutants.

5FOA and MPA Assays. The collection of strains bearing the truncation mutants of *DST1* was spotted on complete medium with 25 μg/ml MPA to test for elongation defect or streaked on synthetic dextrose (SD) medium supplemented with uracil and then spotted on 5FOA medium minus uracil to counterselect the wild-type *MED31*-bearing plasmid.

ChIP. ChIP were done essentially as described (30, 31). The HA-tagged proteins were immunoprecipitated with 12CA5 antibody bound to IgG magnetic beads (Dynabead; Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway). Pol II was immunoprecipitated with 8WG16 anti-CTD antibody (Covance). Rabbit antibody to recombinant yeast TFIIS was a gift from C. Kane. Anti-TBP antibody was a gift from A. Weil.

Immunoprecipitated DNA was analyzed by quantitative real-time PCR on an ABI Prism 7000 machine (Applied Biosystems, Foster City, CA). Relative quantification using a standard curve method was performed, and the occupancy level for a specific fragment was defined as the ratio of immunoprecipitated over total DNA. The respective locations of the amplified PCR products are indicated in Fig. 3.

When cells were shifted from 30°C to 37°C, one-half of an exponentially growing culture was collected by centrifugation, immediately mixed with medium heated at and incubated further at 37°C for 30 min under agitation. Three independent experiments were averaged. The corresponding standard deviations are indicated in Figs. 1–4. When cells were cultivated in YPD medium, the *GAL1* ORF region was used as a nontranscribed control.

Quantitative RT-PCR. mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR. RNA was extracted as described by Schmitt *et al.* (32). Reverse transcription of 5-μg RNA samples was performed in the presence of SuperScript II and random primers (Invitrogen) for 1–2 h at 42°C in the appropriate buffer. 25S rRNA was used as internal control for normalization.

Microarray Analysis. Gene expression was monitored with DNA microarrays manufactured by Service de Génomique Fonctionnelle (Commissariat à l'Energie Atomique/Evry, France), as described (13), except that an indirect cDNA-labeling protocol of the targets was used (35). The microarrays were scanned with a GENEPIX 4000B scanner. Spot intensities and fluorescence ratios were measured by using the GENEPIX 4.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Temperature shift of the culture was done as described for ChIP experiments. For each growth condition (30°C or 37°C), seven hybridizations were performed with three batches of RNA extracted from *med31-Δ DST1* and *med31-Δ dst1-(R200A)* strains, and labels were exchanged in one-half of the hybridizations. The data were analyzed with the GeneSpring software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

We thank L. Kuras for initiating us into the ChIP method; C. Kane for the anti-TFIIS antibody; A. Weil for the anti-TBP antibody; P. Thuriaux, M. Wery, and E. Shematorova (Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia) for discussion and yeast strains; J. Ranish for sharing results before publication; C. Mann for improving the manuscript; and F. Amiot and X. Gidrol (Commissariat à l'Energie Atomique, Evry, France) for providing DNA microarrays. B.G. was supported by grants from the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche and from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

1. Hampsey M (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* 62:465–503.
2. Koh SS, Ansari AZ, Ptashne M, Young RA (1998) *Mol Cell* 1:895–904.
3. Lee YC, Park JM, Min S, Han SJ, Kim YJ (1999) *Mol Cell Biol* 19:2967–2976.
4. Zaman Z, Ansari AZ, Gaudreau L, Nevado J, Ptashne M (1998) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 63:167–171.
5. Wind M, Reines D (2000) *BioEssays* 22:327–336.

6. Olmsted VK, Awrey DE, Koth C, Shan X, Morin PE, Kazanis S, Edwards AM, Arrowsmith CH (1998) *J Biol Chem* 273:22589–22594.
7. Awrey DE, Shimasaki N, Koth C, Weilbaecher R, Olmsted V, Kazanis S, Shan X, Arellano J, Arrowsmith CH, Kane CM, Edwards AM (1998) *J Biol Chem* 273:22595–22605.
8. Kettenberger H, Armache KJ, Cramer P (2003) *Cell* 114:347–357.
9. Malagon F, Tong AH, Shafer BK, Strathern JN (2004) *Genetics* 166:1215–1227.
10. Prather DM, Larschan E, Winston F (2005) *Mol Cell Biol* 25:2650–2659.
11. Kim B, Nesvizhskii AI, Geetha Rani P, Hahn S, Aebersold R, Ranish JA (2007) *Proc Natl Acad Sci USA*104:16068–16073.
12. Ubukata T, Shimizu T, Adachi N, Sekimizu K, Nakanishi T (2003) *J Biol Chem* 278:8580–8585.
13. Fauchon M, Lagniel G, Aude J-C, Lombardia LJ, Soularue P, Petat C, Marguerie G, Sentenac A, Werner M, Labarre J (2002) *Mol Cell* 9:713–723.
14. Lindstrom DL, Hartzog GA (2001) *Genetics* 159:487–497.
15. Nonet ML, Young RA (1989) *Genetics* 123:715–724.
16. Mason PB, Struhl K (2005) *Mol Cell* 17:831–840.
17. Kulish D, Struhl K (2001) *Mol Cell Biol* 21:4162–4168.
18. Thompson CM, Koleske AJ, Chao DM, Young RA (1993) *Cell* 73:1361–1375.
19. Fan HY, Cheng KK, Klein HL (1996) *Genetics* 142:749–759.
20. Wery M, Shematorova E, Van Driessche B, Vandenhaute J, Thuriaux P, Van Mullem V (2004) *EMBO J* 23:4232–4242.
21. Linder T, Gustafsson CM (2004) *J Biol Chem* 279:49455–49459.
22. Bjorklund S, Gustafsson CM (2004) *Adv Protein Chem* 67:43–65.
23. Davis JA, Takagi Y, Kornberg RD, Asturias FA (2002) *Mol Cell* 10:409–415.
24. Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4569–4574.
25. Guglielmi B, van Berkum NL, Klapholz B, Bijma T, Boube M, Boschiero C, Bourbon HM, Holstege FC, Werner M (2004) *Nucleic Acids Res* 32:5379–5391.
26. Grallert A, Grallert B, Zilahi E, Szilagyi Z, Sipiczki M (1999) *Yeast* 15:669–686.
27. Van Mullem V, Wery M, De Bolle X, Vandenhaute J (2003) *Yeast* 20:739–746.
28. Higuchi R, Krummel B, Saiki RK (1988) *Nucleic Acids Res* 16:7351–7367.
29. Longtine MS, McKenzie A, III, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philipsen P, Pringle JR (1998) *Yeast* 14:953–961.
30. Kuras L, Struhl K (1999) *Nature* 399:609–613.
31. Kuras L, Borggrefe T, Kornberg RD (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13887–13891.
32. Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL (1990) *Nucleic Acids Res* 18:3091–3092.
33. Zhang Z, Dietrich FS (2005) *Nucleic Acids Res* 33:2838–2851.
34. Basehoar AD, Zanton SJ, Pugh BF (2004) *Cell* 116:699–709.
35. Soutourina J, Bordas-Le Floch V, Gendrel G, Flores A, Ducrot C, Dumay-Odelot H, Soularue P, Navarro F, Cairns BR, Lefebvre O, Werner M (2006) *Mol Cell Biol* 26:4920–4933.

Molecular Cell
Article

Mediator-Dependent Recruitment of TFIIH Modules in Preinitiation Complex

Cyril Esnault,[1,4] Yad Ghavi-Helm,[1] Sylvain Brun,[1,3] Julie Soutourina,[1] Nynke Van Berkum,[2] Claire Boschiero,[1] Frank Holstege,[2] and Michel Werner[1,*]
[1]CEA, iBiTec-S, F-91191 Gif-sur-Yvette cedex, France
[2]Department of Physiological Chemistry, University Medical Center Utrecht, Universiteitsweg 100, 3584 CG Utrecht, The Netherlands
[3]Present address: Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, Université Paris Sud, F-91405 Orsay cedex, France
[4]Present address: Transcription Laboratory, Cancer Research UK London Research Institute, Lincoln's Inn Fields Laboratories, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, UK
*Correspondence: michel.werner@cea.fr
DOI 10.1016/j.molcel.2008.06.021

SUMMARY

In vitro, without Mediator, the association of general transcription factors (GTF) and RNA polymerase II (Pol II) in preinitiation complexes (PIC) occurs in an orderly fashion. In this work, we explore the in vivo function of Mediator in GTF recruitment to PIC. A direct interaction between Med11 Mediator head subunit and Rad3 TFIIH subunit was identified. We explored the significance of this interaction and those of Med11 with head module subunits Med17 and Med22 and found that impairing these interactions could differentially affect the recruitment of TFIIH, TFIIE, and Pol II in the PIC. A *med11* mutation that altered promoter occupancy by the TFIIK kinase module of TFIIH genome-wide also reduced Pol II CTD serine 5 phosphorylation. We conclude that the Mediator head module plays a critical role in TFIIH and TFIIE recruitment to the PIC. We identify steps in PIC formation that suggest a branched assembly pathway.

INTRODUCTION

In eukaryotes, RNA polymerase II (Pol II) is responsible for the transcription of coding genes and of a large number of noncoding RNAs. The first step in transcription activation is the recognition of DNA motifs by activators that trigger the recruitment of coactivators, GTFs, and Pol II to form a preinitiation complex (PIC).

The pathway to the formation of the PIC was initially investigated in vitro using a reconstituted system with template DNA, purified Pol II, and GTFs (Buratowski et al., 1989; Ranish and Hahn, 1996). It was shown that a system consisting of TFIIA, -B, -D, -E, -F and -H GTFs, in addition to Pol II and promoter DNA, was sufficient to drive transcription at a basal level. The order of assembly of GTFs was determined with TFIID-binding promoter DNA first, then followed by TFIIA, -B, and Pol II associated with TFIIF. Finally, TFIIE and -H completed the PIC, allowing the transition from transcription initiation to elongation after phosphorylation of the carboxy-terminal domain (CTD) of the Pol II largest subunit and by DNA strand separation by TFIIH (Akoulitchev et al., 1995; Holstege et al., 1996). In total, five subcomplexes assembled in a unique order were identified in the pathway leading to PIC formation.

In addition to its role in basal transcription, TFIIH is implicated in transactivation, the cell cycle, and nucleotide excision repair (NER) (Fisher, 2005; Zurita and Merino, 2003). It is composed of ten subunits highly conserved from yeast to mammals (Giglia-Mari et al., 2004; Ranish et al., 2004). Low resolution models of the TFIIH structure have been obtained for the yeast (Chang and Kornberg, 2000) and human complexes (Schultz et al., 2000). They show an overall conservation of shape with a ring topped by a protrusion. TFIIH can be separated into two subcomplexes, a core TFIIH (cTFIIH) and TFIIK/CAK (in yeast and human, respectively) containing the Kin28/Cdk7 kinase that is responsible for CTD phosphorylation (Feaver et al., 1994; Keogh et al., 2002). Core TFIIH contains two helicases of opposite polarities, Rad3/XPD and Ssl2/XPB, that are both implicated in human autosomal recessive disorders such as xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS), and trichothiodystrophy (TTD). These syndromes are due to defects in TFIIH, which might affect not only NER, but also transcription (Egly, 2001; Zurita and Merino, 2003). Ssl2/XPB and Rad3/XPD play crucial roles in NER and in transcription initiation (Egly, 2001; Guzder et al., 1994a; Guzder et al., 1994b). In addition, the XPD subunit bridges the core and CAK modules of TFIIH (Drapkin et al., 1996; Reardon et al., 1996) and stimulates transcription by anchoring the CAK module (Tirode et al., 1999).

Even though DNA, Pol II, and GTFs are sufficient to drive basal transcription in vitro, they are unable to respond to activators. This observation supports the notion that a coactivator is needed for the response to DNA-binding activators. This has prompted the purification of Mediator from yeast (Flanagan et al., 1991; Kelleher et al., 1990; Kim et al., 1994). Independent genetic evidence has led to the finding that Pol II can be found associated with Mediator, suggesting that it activates transcription by recruiting the enzyme to activated promoters (Koleske and Young, 1994). Importantly, a mutation in the Med17 head subunit of Mediator shuts down the expression of nearly all yeast genes transcribed by Pol II, indicating that it is generally required for class II transcription (Holstege et al., 1998). Subsequently, Mediator has

been isolated from different animal models based on its association with transcription activators (Conaway et al., 2005). In vitro studies of the Mediator function indicated that it stimulates basal transcription and TFIIH kinase activity on serine 5 of CTD. The latter is a key event for promoter clearance and for the disruption of Mediator and Pol II interaction (Kim et al., 1994; Max et al., 2007). In addition, Mediator and TFIID were found to stabilize each other in the PIC and stimulate TFIIB assembly (Baek et al., 2006; Johnson et al., 2002).

In *Saccharomyces cerevisiae*, Mediator is composed of 25 subunits (Bjorklund and Gustafsson, 2005; Guglielmi et al., 2004), most of which are conserved in fungi, plants, and animals (Boube et al., 2002). The overall structural organization of Mediator is conserved in *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and mammals with four modules termed the head, the middle, the tail, and the Cdk8 module (Dotson et al., 2000; Elmlund et al., 2006). Numerous transcription activators interact with the tail module possibly to recruit the complex to promoters (Bjorklund and Gustafsson, 2005). The Cdk8 module is thought to have a mostly repressive role (Bjorklund and Gustafsson, 2005). The middle and head modules surround Pol II and interact with some of its subunits (Davis et al., 2002). The head module is essential for its interaction with Pol II and for basal and activated transcription (Takagi et al., 2006; Takagi and Kornberg, 2006).

The order of recruitment of various components involved in PIC formation was investigated in vivo in *S. cerevisiae* (Bhoite et al., 2001; Bryant and Ptashne, 2003; Cosma et al., 1999). In this organism, Mediator is recruited before Pol II and the GTFs, suggesting that it is required for their binding. In addition, mutations that abolish the recruitment of Mediator or grossly affect its head module prevent the association of the GTFs (Bhaumik et al., 2004; Takagi et al., 2006). However, current studies do not distinguish whether the GTFs and Pol II are assembled in the PIC in vivo in a stepwise fashion as they are in vitro and how Mediator might stimulate this process. Biochemical experiments have indicated that the establishment of the PIC and the first round of transcription on templates differed from the subsequent ones. Namely, it was observed that Mediator and some GTFs, among which are TFIIH and TFIIE, remained bound to the promoter after transcription initiation by Pol II, thereby facilitating reinitiation (Yudkovsky et al., 2000).

In this work, we have found a direct interaction between a head Mediator subunit and a TFIIH core subunit. This interaction is important for the association of the TFIIK module of TFIIH to promoters. In vivo, recruitment of TFIIH and TFIIE to the PIC can occur independently of Pol II in a Mediator-dependent fashion. Based on our observations, we propose that several pathways for the assembly of GTFs leading to PIC formation coexist in vivo.

RESULTS

Med11 Mediator Subunit Interacts with Rad3 Subunit of TFIIH

To better understand Mediator organization and function, we screened its subunits for protein-protein interactions in the two-hybrid system with a yeast DNA fragments library (Fromont-Racine et al., 1997). Interactions between Mediator subunits have been previously reported (Guglielmi et al., 2004; Kang et al., 2001; Takagi et al., 2006). Additional interactions between Mediator subunits and proteins belonging to other nuclear complexes were found in this screen. In particular, Med11, a 131 amino acid subunit of Mediator head (Gustafsson et al., 1998), was found to interact with Rad3, one of the two helicases of TFIIH (Figure 1A), suggesting a role for Mediator in TFIIH recruitment. Med11 is essential for yeast survival and is a conserved protein in the eukaryotic kingdom (Backstrom et al., 2007; Boube et al., 2002; Sato et al., 2003). It is important for Mediator head module organization (Takagi et al., 2006). In addition to its interaction with Rad3, Med11 binds Med17 and Med22 in the two-hybrid system (Guglielmi et al., 2004). The 72–256 fragment of Rad3 that interacted with Med11 corresponded to its DEAD_2 domain (according to the PFAM database; Figure 1B), a conserved region present in a large number of DNA-binding

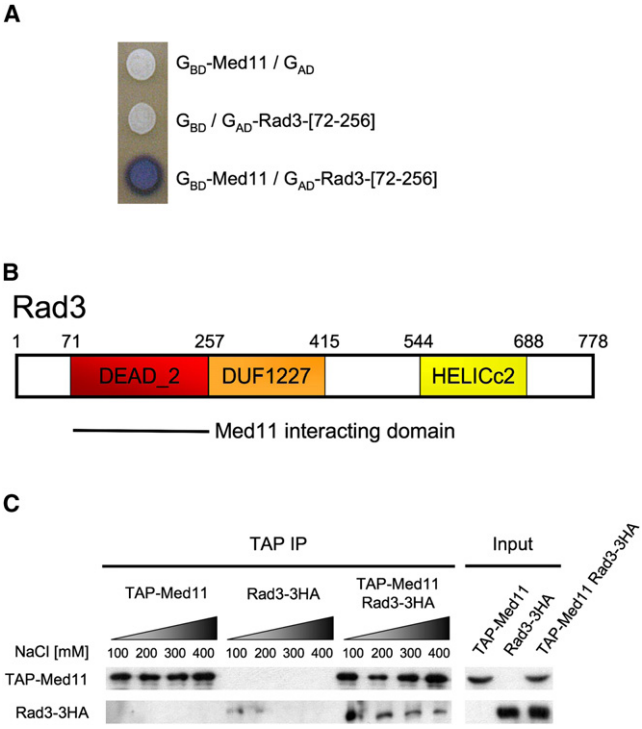


Figure 1. Med11 Mediator Subunit Interacts with Rad3 Helicase of TFIIH

(A) Two-hybrid interaction between Med11 and Rad3. Two-hybrid assays were performed in Y190 strains transformed by pGBT9, expressing Gal4 DNA-binding domain (G_{BD}) or pGBT9-Med11 (G_{BD}-Med11) and pACTII, expressing the Gal4 activating domain (G_{AD}) or pACTII-Rad3-[72–256] (G_{AD}-Rad3-[72–256]). Interaction activated a *lacZ* reporter gene that was revealed by a blue color in an X-gal overlay assay (Werner et al., 1993).

(B) Rad3 conserved domain organization according to PFAM database (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/). A line indicates the Rad3 interaction domain with Med11.

(C) Coimmunoprecipitation of Med11 and Rad3. Proteins from strains overexpressing TAP-Med11, Rad3-3HA, or both proteins were immunoprecipitated with magnetic beads coupled to IgG. The IPs were performed in buffers containing 100 to 400 mM NaCl. After immunoprecipitation, the proteins were revealed by western blotting using 12CA5 or PAP antibodies, binding to HA or TAP tag, respectively.

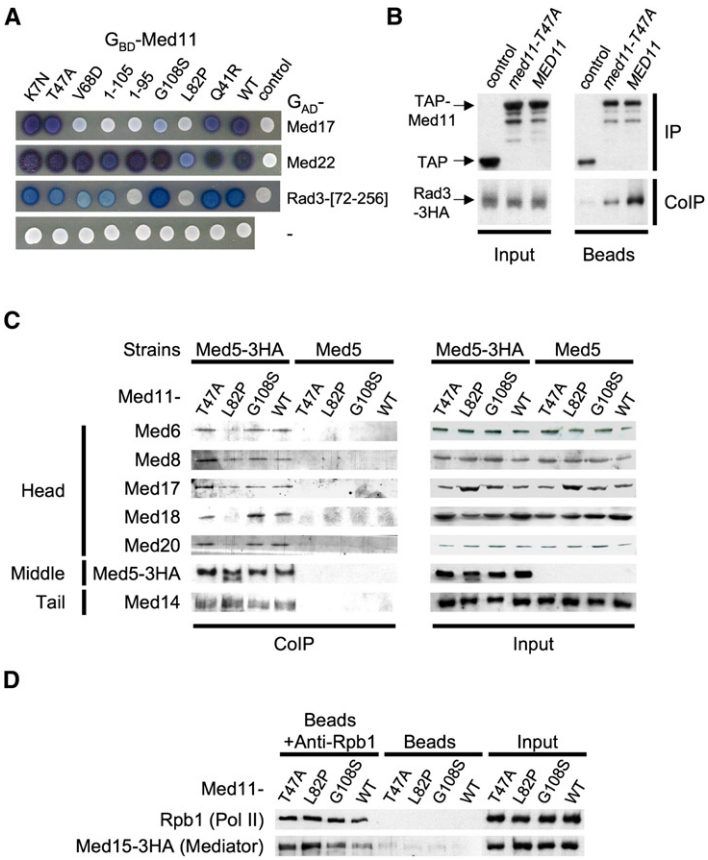


Figure 2. Med11 Mutations Affect the Interactions with Its Partners

(A) Effect of the mutations on two-hybrid interactions between Med11 and its partners. Two-hybrid assays were performed in Y190 strains transformed by pGBT9 or pGBT9-Med11 mutants (G_{BD} or G_{BD}-Med11), pACTII, pACTII-Med17, pACTII-Med22, or pACTII-Rad3-[72–256] (G_{AD}, G_{AD}-Med17, G_{AD}-Med22 or G_{AD}-Rad3-[72–256]). The X-gal agarose assay was performed as in Figure 1. An interaction between Med11 or its mutants and Med17, Med22, or Rad3-[72–256] is indicated by the blue color. A paler shade of blue compared to wild-type indicates a decrease in the strength of interaction between a Med11 mutant protein and its partner.

(B) Med11-T47A mutation decreases Rad3 coimmunoprecipitation with Mediator. Strains expressing TAP, TAP-Med11 or TAP-Med11-T47A, and Rad3-3HA were grown to exponential phase at 30°C. Protein extracts of these strains were immunoprecipitated in a buffer containing 400 mM NaCl with magnetic beads coupled to mouse IgG (Invitrogen). After immunoprecipitation, the proteins were revealed by western blotting using 12CA5 or PAP antibodies.

(C) Mediator integrity revealed by CoIP in mutant strains. Wild-type and mutant strains were grown 45 min at 37°C. Med5-3HA was immunoprecipitated from cell extracts using magnetic beads coupled to anti-HA antibodies. Coimmunoprecipitations of Mediator subunits were revealed by western blotting using anti-HA, -Med6, -Med8, -Med14, -Med17, -Med18, or -Med20 antibodies.

(D) Mediator and Pol II coimmunoprecipitated in Med11 mutant strains. Wild-type and mutant strains were grown 45 min at 37°C. Pol II was immunoprecipitated from cell extracts using magnetic beads coupled to an anti-Rpb1 antibody (8WG16). Negative controls were magnetic beads without antibody. After immunoprecipitation, the coimmunoprecipitated proteins were revealed by western blotting using anti-Rpb1 or anti-HA (12CA5) antibodies.

helicases. Members of this family include proteins of eukaryotic, bacterial, and archaeal origins. To confirm the interaction between the two proteins, TAP-Med11 and Rad3-3HA were overexpressed on a 2 μ plasmid under the control of the *PGK1* promoter and immunoprecipitated from crude extracts using magnetic beads coupled to IgG. Med11 fused to the TAP tag (Rigaut et al., 1999) coimmunoprecipitated (CoIP) with Rad3 fused to a 3HA tag (Figure 1C). The interaction was resistant to 400 mM NaCl.

Mutations of Med11 Alter Specific Interactions with Its Partners

To investigate the role of Med11 in PIC organization and to determine the importance of the interaction between Mediator and TFIIH during the initiation step of Pol II transcription, mutations affecting specifically one contact at a time between Med11 and its partners were selected. We mutagenized *MED11* by error-prone PCR and introduced the mutated fragments in pVV204 vector bearing the *TRP1* marker by gap repair in the yCE001 strain in which the *med11* deletion was complemented by wild-type *MED11* borne on a *URA3* vector. After chasing the wild-type *MED11* allele on 5-FOA, colonies growing at 30°C were replica plated at 37°C to identify thermosensitive colonies. As an alternative source of *med11* mutants, we separated the three mutations present in *med11-1* (Han et al., 1999). In total, we obtained eight independent thermosensitive mutations distributed along the protein, three in the N terminus of Med11, two in the middle of the protein, and one in its C terminus (Figure S1). In addition, two truncation mutants that eliminated part of the C terminus of Med11 were selected. The phenotype of these mutants indicated that this portion of Med11, although important for its function, was not required for cell survival. The growth of *med11-L82P* and the two truncation mutants were even affected at 30°C. These mutants had the strongest growth phenotype at 37°C. The growth of all other mutants, except *med11-Q41R* that was only marginally affected, was strongly reduced at 37°C.

We then tested the ability of Med11 mutant subunits to interact with Med17, Med22, and Rad3-[72–256] in two-hybrid assays (Figure 2A). Except for Med11-Q41R, each mutant showed a decreased interaction with at least one partner. The two truncation mutations and the three point mutations in the C-terminal half of Med11 (Med11-V68D, -L82P, and -G108S) affected the interaction with Med17. This observation suggested that the Med11 C-terminal half is required to bind Med17. Med11-L82P was the only mutant which impaired Med11 association with Med22. In addition, six mutants no longer interacted with Rad3 interaction. Med11-[1–95] and Med11-L82P were strongly affected, while four mutations (Med11-K7N, -T47A, -V68D, and -[1–105]) had a milder effect as quantified by a β-galactosidase assay for Med11-T47A (Figure S2). A coimmunoprecipitation (CoIP) assay was performed to confirm that Med11-T47A was affected in Rad3 interaction. We immunoprecipitated TAP-tagged wild-type Med11 and Med11-T47A in extracts from strains

expressing Rad3-3HA. In agreement with the two-hybrid assay, the *med11-T47A* mutation impaired Rad3 coimmunoprecipitation with Med11 (Figure 2B). The other mutants were unaffected in their interaction with Rad3 (data not shown). Moreover, we verified by β-galactosidase and coimmunoprecipitation assays that Med11-T47A mutation did not alter the interaction of Med11 with its two other partners, Med17 and Med22 (Figure S2).

Three mutants were selected for further study: *med11-G108S* and *med11-T47A*, since they are affected for only one interaction (with Med17 and Rad3, respectively), and *med11-L82P* that was affected in its interactions with all of Med11 partners.

Effect of *med11* Mutations on Mediator Stability, Mediator Interaction with Pol II, and mRNA Levels

Since Mediator is required for the transcription of nearly all yeast class II genes, we tested if the level of Pol II, GTFs, or Mediator itself could be affected in *med11* mutants at the restrictive temperature. The levels of subunits of complexes belonging to the Pol II transcription machinery were measured by western blotting using subunit-specific antibodies or a 3HA epitope in tagged strains. Protein levels of selected subunits of Mediator (Med6, Med8, TAP-Med11, Med17, Med18 [head]; Med5-3HA, Med7-3HA, Med21-3HA [middle]; Med14, Med15-3HA [tail]; and Cdk8-3HA [Cdk8]), TFIIH (Ssl1-3HA and Rad3-3HA [cTFIIH]; Ccl1-3HA and Kin28-3HA [TFIIK]), TFIIE (Tfa1-3HA), TBP, and Pol II (Rpb1) did not change, indicating that the *med11* mutations did not affect the level of the Pol II transcription machinery (Figure S3).

The effect of the mutations on Mediator integrity was verified by CoIP between subunits of the head, middle, and tail modules (Figure 2C). In *med11-T47A*, *med11-G108S*, and wild-type strains, we observed that Mediator head and tail module subunits coimmunoprecipitated with the Med5 middle module subunit. In contrast, the *med11-L82P* mutation destabilized the association of Med6, Med18, and Med20 with the head but did not affect the head binding of Med8 and Med17. Since Mediator is associated with Pol II in soluble cell extracts (Kim et al., 1994), we tested if the mutations could also alter this association. Pol II was immunoprecipitated with anti-CTD antibodies in extracts from wild-type or *med11* mutant strains expressing Med15-3HA. As shown in Figure 2D, the mutations did not significantly affect Mediator association with Pol II.

We investigated the effect of *med11* mutations after transfer to 37°C on the mRNA abundance of five genes (*ADH1*, *PYK1*, *GLT1*, *MET17*, and *VTC3*) that are expressed at different levels. All mutants affected the level of *ADH1*, *PYK1*, *VTC3*, and *MET17* mRNAs, but only marginally effected that of *GLT1*. As expected from its strong phenotype, *med11-L82P* had the most pronounced defect (Figure S4).

med11 Mutations Differentially Affected the Promoter Occupancy of Pol II, TFIIE and TFIIH Core, and Kinase Modules

The effect of *med11* mutations on the gene occupancy of Mediator and Pol II or the GTFs on promoters was examined. We immunoprecipitated the chromatin (ChIP) prepared from mutant strains grown in YPD-rich medium for 45 min at the restrictive temperature (37°C) to investigate PIC formation. Chromatin bound to Mediator was immunoprecipitated from Med5-3HA and Cdk8-3HA strains. The association of Mediator, as seen by ChIP of Med5 and Cdk8, with the promoters of *ADH1*, *PYK1*, *GLT1*, *VTC3*, and *MET17* remained unchanged (Figures S5A and S5B). TBP occupancy in *med11* mutants and the wild-type strains were similar (Figure S5C).

Rpb1-associated chromatin was immunoprecipitated with 8WG16 anti-CTD antibody (Figure 3A and Figure S5D). The *med11-T47A* mutation led to a slight decrease in Rpb1 occupancy (23%–49% depending on the promoter and ORF) while *med11-G108S* led to a larger defect (55%–73% decrease). The *med11-L82P* mutant had a more pronounced defect on Pol II occupancy (77%–83% decrease) consistent with its severe growth phenotype. In vitro and in the absence of Mediator, TFIIH, together with TFIIE, is the last GTF to enter the PIC (Buratowski et al., 1989). Since Mediator and TFIIH contact each other via the Med11-Rad3 interaction, we wondered if *med11* mutations could impair TFIIH occupancy on promoters in vivo. Two subunits of cTFIIH (Rad3 and Ssl1) and of its CTD kinase module TFIIK (Kin28 and Ccl1) were 3HA-tagged for ChIP experiments. Ccl1 could not be tagged in the *med11-L82P* strain since the addition of the tag was lethal in this genetic background (Figure S6). The *med11-L82P* mutant showed the most pronounced defect since the association of cTFIIH and TFIIK with promoters was impaired drastically (Figure 3B and Figure S5E). Unexpectedly, *med11-G108S* did not affect promoter occupancy by cTFIIH or TFIIK, indicating that Pol II association with promoters is not a prerequisite for TFIIH recruitment in vivo. The *med11-T47A* mutation did not lead to lower occupancy of cTFIIH but had an effect as large as that of *med11-L82P* on TFIIK binding to some promoters, indicating that the two TFIIH subcomplexes were recruited or stabilized independently of each other by Mediator. Since TFIIE and TFIIH enter the PIC together in vitro, we investigated TFIIE occupancy in *med11* mutants. Interestingly, neither the *med11-T47A* nor the *med11-G108S* mutation affected Tfa1-3HA binding (Figure 3C and Figure S5F). This indicated that Mediator is the prime determinant for the recruitment of TFIIE to the PIC in vivo.

Effect of the *med11-T47A* Mutation Genome-wide on TFIIK Binding

med11-T47A affected the association of Kin28 with *ADH1* and *PYK1*, but not *GLT1*, *VTC3*, or *MET17*. This led to the question of how many genes in the yeast genome had reduced binding for Kin28. We immunoprecipitated chromatin bound to Kin28 from the wild-type or a *med11-T47A* mutant followed by DNA hybridization on microarrays (ChIP-chip) that allowed us to resolve the position of Kin28 on chromatin to within 250 nt (see the Experimental Procedures). Comparing Kin28 occupancy in the two strains, we found 787 probes corresponding to 665 genes where the binding of Kin28 was reduced 2-fold or more in the mutant (Figure 4A). This criterion was rather conservative and probably leads to an underestimation of the number of genes where the binding of TFIIK was affected. Similar ChIP-chip experiments were used to investigate the effect of the *med11-T47A* mutation on the genome-wide distribution of Rad3 and Med5. Interestingly, most of the genes that were affected for Kin28 binding were not affected for Rad3 binding. As described

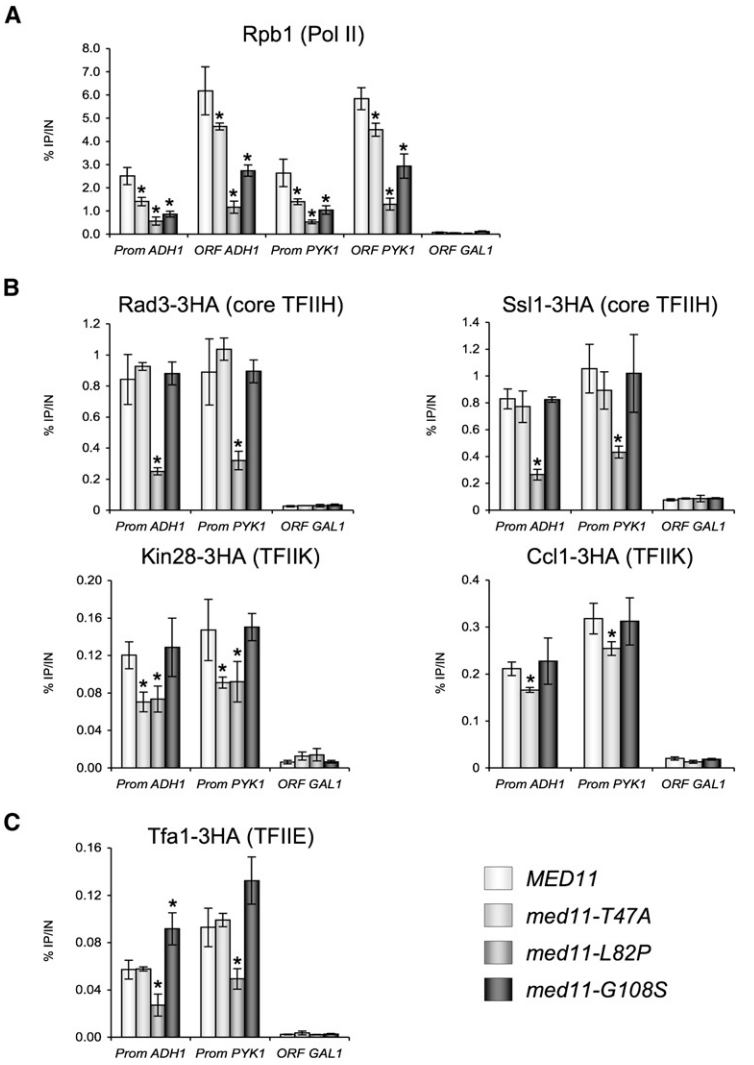


Figure 3. Effect of *med11* Mutations on Pol II, TFIIE, cTFIIH, and TFIIK Occupancy

Immunoprecipitated DNA from ChIP experiments was amplified with primers as indicated in the Supplemental Experimental Procedures. *GAL1* open reading frame (ORF) was used as a negative control since its transcription is repressed in YPD. Values represent the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviation and an asterisk indicates a significant difference between the wild-type and the mutant at p value <0.05 in a Student's t test.

(A) Pol II occupancy. Cells were grown on YPD to $OD_{0.6}$ at 600 nm, then transferred for 45 min to 37°C. Standard ChIP assays were performed on chromatin prepared from WT, *med11-T47A*, *med11-L82P*, and *med11G108S* strains using an antibody against Rpb1 CTD (8WG16).

(B) cTFIIH and TFIIK subunits occupancy. Strains expressing Rad3-3HA, Ssl1-3HA, Kin28-3HA, or Ccl1-3HA in wild-type or mutant backgrounds were grown for 45 min at 37°C. Standard ChIP assays were performed using anti-HA antibody (12CA5).

(C) TFIIE occupancy. Strains expressing Tfa1-3HA in wild-type or mutant backgrounds were grown for 45 min at 37°C. Standard ChIP assays were performed using anti-HA antibody (12CA5).

above, specific ChIP experiments showed that *med11-T47A* had no effect on Med5 association. This observation was confirmed genome-wide by a ChIP-chip experiment (Figure 4B). Examples of occupancy profiles of Kin28, Rad3, and Med5 proteins on specific genes are shown in Figure S7.

The Med11-Rad3 Interaction Stimulates CTD Phosphorylation In Vivo

Phosphorylation of Serine 5 of Pol II CTD by TFIIK is an important step for transcription initiation (Akoulitchev et al., 1995) and is activated by Mediator (Guidi et al., 2004; Nair et al., 2005). Since we found that *med11-T47A* had a defect in TFIIK occupancy on numerous promoters, it was expected that the mutation would lead to decreased CTD phosphorylation on such genes. An antibody (H14) directed against the CTD phosphorylated on serine 5 (S5P Pol II) was used to look at its genome-wide occupancy in a mutant and in a wild-type strain. A similar experiment was performed to analyze the genome-wide distribution of total Pol II population in the two strains (Figure 5A). As predicted from the ChIP experiments shown in Figure 3A, *med11-T47A* did not significantly affect total Pol II binding, the slope of the correlation line being equal to 1.03. Interestingly, the slope of the regression line between the enrichments of S5P Pol II in the wild-type and the mutant decreased to 0.79, indicating that S5 CTD phosphorylation levels were lower in the mutant.

To confirm the genome-wide phosphorylation defect, we performed ChIP experiments on three selected genes to look at the distribution of total or phosphorylated Pol II. *HST2* was chosen because the ChIP-chip analysis indicated that TFIIK occupancy was reduced. *ADH1* and *PYK1* occupancies were also analyzed since, even though genome-wide analysis did not point to a significant defect in S5P Pol II occupancy for these genes, our ChIP experiments indicated that the level of TFIIK was reduced. As seen on Figure 5B, *med11-T47A* had a more pronounced effect on the levels of S5P Pol II than on that of total Pol II population on all three genes as expected from the TFIIK occupancy defect.

We also measured total Pol II and S5P Pol II occupancies on *ADH1* and *PYK1* in *med11-L82P*- and *med11-G108S*-carrying strains. The levels of both forms of Pol II decreased in both mutant backgrounds, but the ratio of S5P Pol II to total Pol II remained unchanged (data not shown).

In addition to defective TFIIK association in PIC, *med11-T47A* might have also affected the CTD kinase stimulatory activity of Mediator. To test this possibility, we set up a CTD phosphorylation assay containing TFIIH, recombinant GST-CTD, labeled ATP, and wild-type or mutant Mediator. Cellular extracts in which Med5 was not tagged in wild-type or mutant backgrounds were subjected to the same immunopurification procedure and used as a negative control in the CTD phosphorylation assays (Figure S8). Phosphorimager quantification of labeled GST-CTD indicated that stimulation of TFIIH kinase activity was identical for the *med11-T47A* and the wild-type Mediator. Taken together,

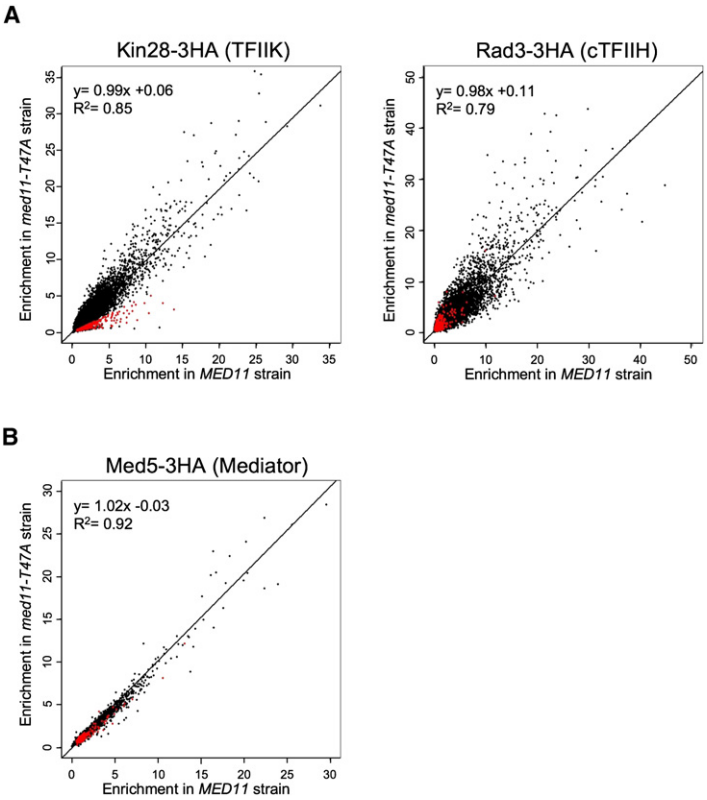


Figure 4. Genome-wide Analysis Reveals that the *med11-T47A* Mutation Specifically Affects TFIIK Occupancy

(A) Genome-wide analysis of TFIIH modules occupancy. ChIP-chip analysis was performed on Kin28-3HA (TFIIK) and Rad3-3HA (cTFIIH) in *med11-T47A* and wild-type strains with 12CA5 antibody. Wild-type or mutant cells were grown as in Figure 3. The graphic represents the correlation of Kin28-3HA and Rad3-3HA in *med11-T47A* and the wild-type strains. The red dots correspond to the yeast genome part that presents a decrease superior to 2-fold of TFIIK occupancy. A linear regression and its equation are indicated.

(B) Genome-wide analysis of Mediator occupancy. ChIP-chip analysis was performed on Med5-3HA in *med11-T47A* and wild-type strains with 12CA5 antibody. Wild-type or mutant cells were grown as in Figure 3. The graphic represents the correlation of Med5-3HA binding in *med11-T47A* and the wild-type strains. A linear regression and its equation are indicated.

these observations demonstrated that the decreased S5 phosphorylation of CTD in *med11-T47A* is due to the decreased occupancy of TFIIK on promoters as a result of a weaker interaction with Rad3.

Mediator and TFIIH Can Occupy Promoters and Centromeres in the Absence of Pol II

Since the *med11-G108S* mutant decreased Pol II occupancy on the five genes that were examined without affecting Mediator, TFIIH, or TFIIE binding, Mediator could have been an important determinant for TFIIH recruitment to promoters. If this was the case, one would expect to find genes that are bound by Mediator and TFIIH before transcription activation in the wild-type. Genome-wide location analyses of Rpb1 (Figure 5), Med5, Rad3, and Kin28 (Figure 4) in a wild-type strain allowed us to identify genes that were specifically enriched for Mediator and TFIIH, but not for Pol II. Examples of genes displaying this specific behavior are shown in Figure 6. Unexpectedly, we also found that all 16 centromeres were highly enriched for both Mediator and TFIIH, but not for Pol II. Centromeres are not thought to be transcribed in *S. cerevisiae*. Nevertheless, one could argue that the presence of Mediator and TFIIH is due to the proximity of genes that are transcribed divergently from the centromere. This hypothesis cannot hold for chromosomes 3, 4, 9, 12, 13, and 14 where the genes located on either side of the centromere are transcribed convergently, as shown, for example, in Figure 6 for centromere 14. These observations demonstrate that TFIIH can be recruited independently of Pol II.

DISCUSSION

Mediator Stimulates TFIIH Association to Promoters In Vivo through Direct Interaction

The finding that Med11 interacted with Rad3, both in the two-hybrid system and in coimmunoprecipitation experiments, suggested that Mediator and TFIIH might functionally interact. A recent genetic interaction map between genes encoding subunits of complexes involved in transcription also suggested a connection between the Mediator head and TFIIH (Collins et al., 2007).

To investigate the nature of the link between Mediator and TFIIH, we selected conditional Med11 mutations and investigated their effects on the binding of Mediator itself, GTFs, and Pol II to promoters. The *med11-G108S* mutation impaired the association of Pol II with the promoters that were tested but did not impair association with TFIIE, TFIIH, Mediator itself, and TBP. Another mutation, *med11-L82P*, did lead to decreased occupancy of TFIIH, TFIIE, and Pol II, but not of Mediator or TBP. These observations point to a functional role for Mediator in TFIIH and TFIIE recruitment to promoters and can be interpreted in two ways that are not mutually exclusive. The first interpretation would be that Mediator is important for the recruitment of TFIIH and TFIIE in PIC formation independently of Pol II. A second possibility is that the *med11-G108S* mutation blocks the capture of Pol II by the scaffold and prevents reinitiation. To determine if complexes containing Mediator, TFIIH, and TFIIE in the *med11-G108S* mutant are representative of PIC intermediates, we identified promoters in the wild-type to which TFIIH and Mediator were bound but Pol II was absent. In addition, all 16 centromeres of *S. cerevisiae* were bound by Mediator and TFIIH, but not by Pol II. At present, we do not know the significance of this latter observation. Nevertheless, since the promoters were transcriptionally silent, as were the centromeres, Mediator-TFIIH complexes are more likely to represent PIC intermediates that have not been activated rather than reinitiation scaffolds. PIC intermediates containing TFIIH and TFIIE, but not Pol II, are unexpected in the light of previous results showing that Pol II association with promoters is required for the recruitment of TFIIE and TFIIH in vitro (Buratowski et al., 1989). In this previous work, the

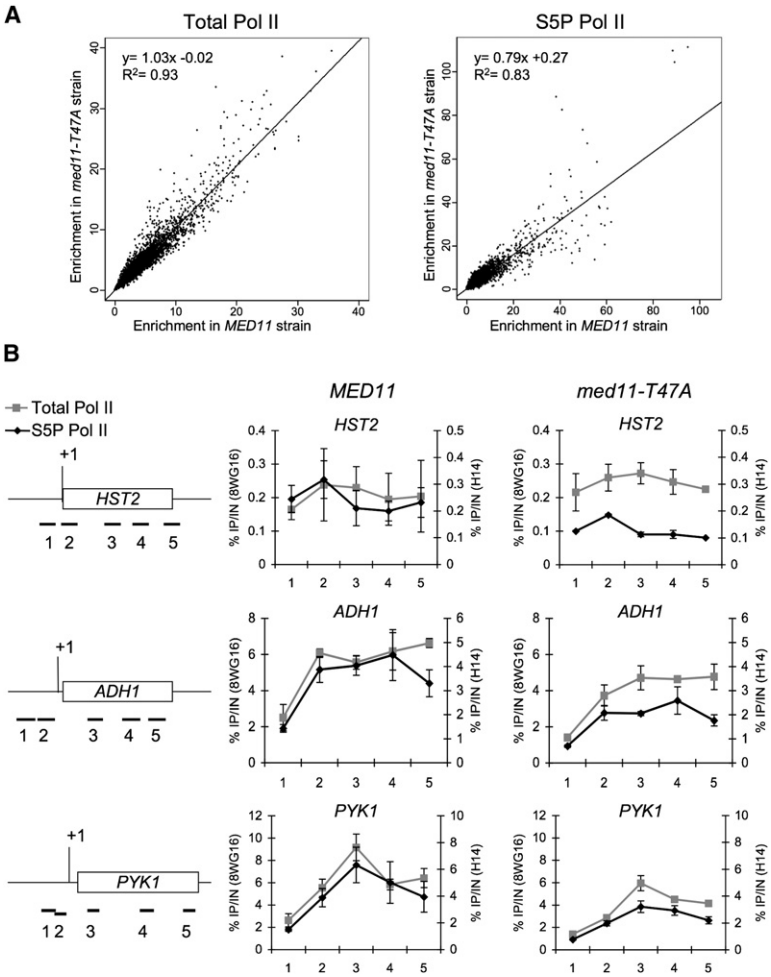


Figure 5. *med11-T47A* Mutation Affects Pol II Phosphorylation

(A) ChIP-chip analysis of total Pol II and S5P Pol II in *med11-T47A* and wild-type strains. Wild-type or mutant cells were grown as described in Figure 3. ChIP-chip assays were performed using an antibody against total CTD (8WG16) or against CTD phosphorylated on serine 5 (H14). The graphics represent the correlation between Pol II and S5P Pol II occupancy in *med11-T47A* and the wild-type strains. A linear regression was performed, and its equation is indicated.

(B) Profiles of total and S5P Pol II on *HST2*, *ADH1*, and *PYK1* in wild-type and *med11-T47A* strains. On the left, schematic promoter and coding region organization of *HST2*, *ADH1*, and *PYK1* are presented. The location of the PCR fragments amplified in ChIP analysis is indicated. The open reading frame (ORF) is indicated as an open box. The vertical line indicates the position of the transcription initiation site. Wild-type or mutant cells were grown as in Figure 3. Standard ChIP assays were performed using an antibody against total (8WG16) or S5P Pol II (H14). Values represent the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviation.

pathway leading to PIC formation was investigated biochemically using a system that, in fact, lacked Mediator, which had not been discovered at that time. This might explain the discrepancy between the two studies.

We do not exclude the possibility that Mediator in general, and Med11 in particular, plays a role in the stabilization of reinitiation scaffolds in vivo. However, to the best of our knowledge, the existence of scaffolds has never been demonstrated in vivo probably because experimental methods to address this question are particularly difficult to set up.

Evidence that Mediator Stimulates Serine 5 Phosphorylation of the CTD by Stabilizing TFIIK on Promoters

TFIIH controls promoter clearance by Pol II through its helicase activity that is required for DNA strand separation and through its CTD kinase activity that is stimulated by Mediator (Egly, 2001; Kim et al., 1994). Our experiments strongly suggested that the direct interaction between the Med11 subunit of Mediator and the Rad3 subunit of TFIIH via its DEAD_2 helicase domain plays an important role in the stimulation of TFIIH kinase activity. A mutation, *med11-T47A*, that selectively decreased the interaction between Rad3 and Med11 was identified. It did not decrease chromatin binding of cTFIIH, to which Rad3 belongs, but diminished binding of TFIIK to about 10% of the yeast genes. Since the *med11-T47A* mutation had only a mild effect on the interaction of Mediator with Rad3, the proportion of yeast genes that depend on Med11 for TFIIK association is probably underestimated. A role for Rad3 in stabilizing TFIIK is consistent with the bridging role of Rad3/XPD between the two modules of TFIIH (Drapkin et al., 1996; Reardon et al., 1996) and with the role of Rad3/XPD in facilitating optimal transcription by anchoring the CAK subcomplex to cTFIIH (Tirode et al., 1999).

By genome-wide location analysis and ChIP, we observed that the amount of phosphorylated Pol II bound to chromatin decreased in *med11-T47A* compared to wild-type, whereas total Pol II levels remained largely unaffected. This could result from either the decreased association of TFIIK with promoters or from lower kinase activity or both. In vitro assays indicated that the mutation did not impair the kinase stimulatory activity of Mediator, suggesting that in *med11-T47A*, the decrease in CTD phosphorylation is accounted for by the decreased recruitment of TFIIK.

In the two other *med11* mutants that were studied, the amount of total and phosphosphorylated Pol II decreased in the same proportion on *ADH1* and *PYK1* genes (data not shown). The *med11-G108S* mutation did not affect TFIIK binding to promoters, which meant that Pol II phosphorylation was normal. The *med11-L82P* mutation reduced TFIIK binding by about 2-fold, while Pol II binding diminished by at least 5-fold. Since the ratio of Pol II to S5P Pol II did not change, we suggest that TFIIK was not limiting for Pol II phosphorylation as a consequence of the increased TFIIK to Pol II ratio.

The DEAD_2 domain of TFIIH is highly conserved in eukaryotes. Some mutations in the DEAD_2 domain of XPD, the human homolog of Rad3, lead to the trichothiodystrophy disease

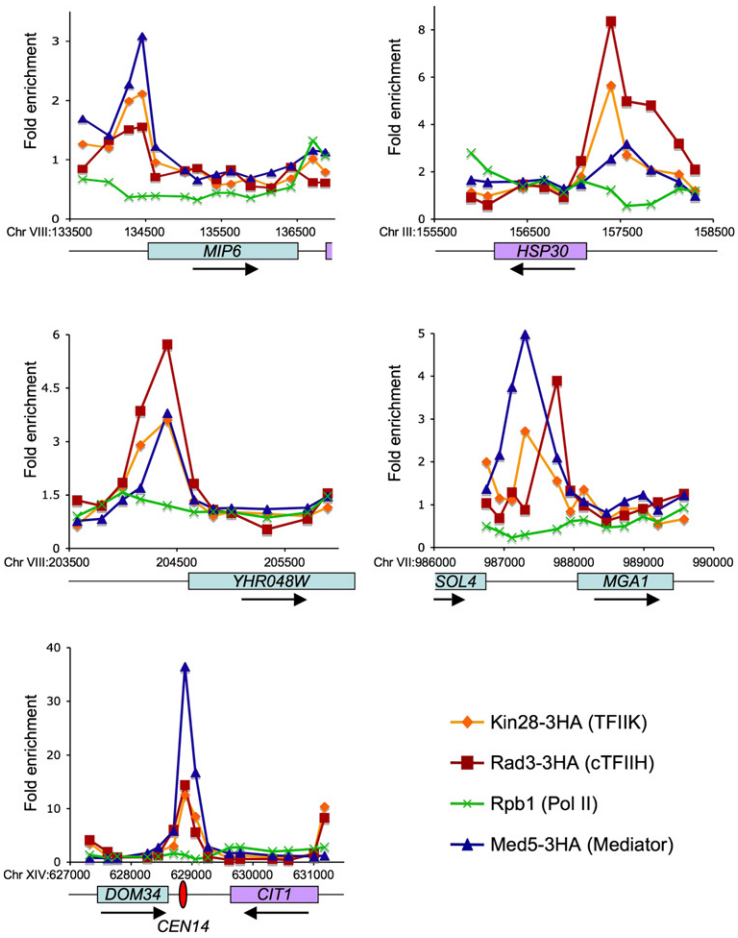


Figure 6. Mediator, TFIIH, and Pol II Enrichment over Selected Genes in Wild-Type Strain

Examples of genomic regions bound by TFIIH and Mediator but not Pol II. ChIP-chip assays were performed using antibodies against Rpb1 (8WG16) or against the HA tag (12CA5) in wild-type strain grown as in Figure 3. The graphics present binding ratios of Med5-3HA (Mediator), Kin28-3HA (TFIIK), Rad3-3HA (cTFIIH), and Rpb1 (Pol II).

characterized by defects in basal and activated transcription (Dubaele et al., 2003). In the light of our results, it is possible that these XPD mutations are defective in CTD serine 5 phosphorylation because of the poor interaction between TFIIH and Mediator.

TFIIH plays a critical role in NER, in general, and transcription coupled repair (TCR), in particular (Laine and Egly, 2006). Since Mediator is required for TFIIH association with promoters, it may be that Mediator could play a role in transcription-coupled repair by stimulating TFIIH recruitment following DNA damage. We found that none of the *med11* mutations increased the UV sensitivity of the mutant strains (data not shown), indicating that the loading of TFIIH at promoters stimulated by Mediator is not required for repair and suggesting that TFIIH can access damaged sites directly.

A Branched Model for Transcription Initiation

Based on our results, we propose a branched model of PIC formation shown on Figure 7. Med11-T47A diminished the association of TFIIK to promoters without affecting that of Pol II, TFIIE, or cTFIIH. Conversely, Med11-G108S affected Pol II association, but not that of TFIIE, cTFIIH, or TFIIK, suggesting the existence of two PIC intermediate complexes that would contain Mediator•Pol II•TFIIE•cTFIIH (Figure 7C) and Mediator•TFIIE•TFIIH (Figure 7C′). The ChIP-chip data demonstrated the existence of such complexes on inactive promoters and centromeres. Mediator•Pol II•TFIIE•cTFIIH and Mediator•TFIIE•TFIIH complexes could lead to a full PIC (Figure 7D) in a single step by the recruitment of a single factor: TFIIK in the first case, and Pol II in the second. Two hypothetical intermediates could lead to Mediator•Pol II•TFIIE•cTFIIH formation. The first one would entail a complex consisting of Mediator and Pol II (Figure 7B) that has not been observed in vivo but can be proposed on the basis of the association of Pol II and Mediator in cell extracts (Kim et al., 1994). The second one would consist of Mediator•TFIIE•cTFIIH as suggested by our observation that TFIIK is not always present simultaneously with cTFIIH

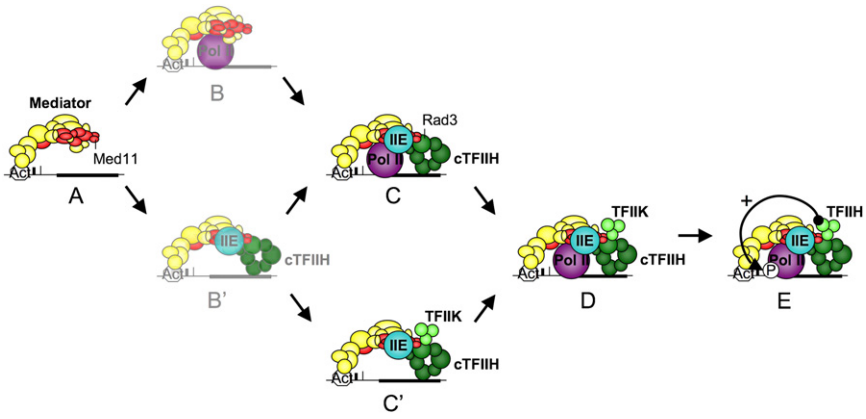


Figure 7. Branched Pathway Model of PIC Formation

(A–E) The steps leading to PIC formation are depicted in the cartoon. Arrows connect the preinitiation intermediates in a branched pathway leading to PIC formation and Pol II phosphorylation. The intermediates that have been observed are indicated by solid colors. The intermediates that were inferred are indicated by the translucent colors.

The color code used is as follows: red, essential Mediator subunits; yellow, dispensable Mediator subunits; dark green, cTFIIH; light green, TFIIK; blue, TFIIE; violet, Pol II.

(Figure 7B′). Interestingly, this intermediate could also lead to the formation of the Mediator•TFIIE•TFIIH complex by the recruitment of TFIIK.

In conclusion, Mediator appears to play a critical role in PIC assembly at the level of TFIIH and TFIIE recruitment. Several pathways leading to PIC formation may coexist with several intermediates that might be more or less abundant depending on specific promoters. The various pathways leading to PIC formation could be differentially regulated, expanding the repertoire of mechanisms for regulating gene transcription.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Oligonucleotides

The sequence of the oligonucleotides used in this study can be found in Table S1.

Chromatin Immunoprecipitation and Genome-wide Location Analysis

Crosslinked chromatin was prepared essentially as described previously (Kuras et al., 2003). More details can be found in the Supplemental Data.

For the ChIP-chip experiments, ligation-mediated PCR was done as described previously (Ren et al., 2000), except that amino-allyl conjugated dUTP (150 μM final) was used, and only 30 cycles of PCR were performed. The PCR products were purified using a Microcon YM-30 filter. Amino-allyl modified DNA was recovered with 20 μl of H_2O and the DNA was lyophilized. DNA was labeled as previously described (Harismendy et al., 2003), except that unincorporated dyes were removed using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Labeled DNA was recovered with 100 μl of buffer EB, and ethanol was precipitated. Hybridization and washing conditions were as described previously (Lee et al., 2006). Microarrays were obtained from Agilent Technologies (G4493A) and feature 41,776 60-mer oligonucleotide probe spots with an average density of one probe each 266 bp of the yeast genome. Images of Cy5 and Cy3 fluorescence intensities were generated using the Genepix 4000B scanner (Molecular Devices) and extracted using GenePix Pro 6 software (Molecular Devices). Experiments were carried out at least in triplicate.

Data Analysis

The computational data analysis was performed in R using the *limma* package (Smyth et al., 2005) from the bioconductor project (www.bioconductor.org). After subtraction of the local background, the data from the two channels were median normalized, and log ratios of signal intensities were generated for each feature. The log ratios were processed by fitting a linear model for each feature, and p values were calculated by performing an empirical Bayes moderated t statistic test. p values were then adjusted for multiple testing by Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) method.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad (Graphpad Software Inc.). Differences between mutants and wild-type were compared by the Student's t test and considered statistically significant at the $p < 0.05$ level of confidence. Data are expressed as the mean ± standard deviation.

ACCESSION NUMBERS

The complete raw data set is available at Array Express (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number E-MEXP-1502.

SUPPLEMENTAL DATA

The Supplemental Data include Supplemental Experimental Procedures, eight figures, two tables, and Supplemental References and can be found with this article online at http://www.molecule.org/cgi/content/full/31/3/337/DC1/.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Björklund, S. Hahn, R. Kornberg, and A. Weil for antibodies; D. Hermand for strains; and J. Ranish for attempting to analyze the role of the Med11 in vitro. We also thank, B. Guglielmi and J.-M. Egly for discussions and A. Sentenac, S. Un, P. Thuriaux, and C. Mann for critical reading of the manuscript. C.E. was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

Received: July 13, 2007
Revised: February 10, 2008
Accepted: June 1, 2008
Published: August 7, 2008

REFERENCES

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.

Backstrom, S., Elfving, N., Nilsson, R., Wingsle, G., and Bjorklund, S. (2007). Purification of a plant mediator from Arabidopsis thaliana identifies PFT1 as the Med25 subunit. Mol. Cell *26*, 717–729.

Baek, H.J., Kang, Y.K., and Roeder, R.G. (2006). Human Mediator enhances basal transcription by facilitating recruitment of transcription factor IIB during preinitiation complex assembly. J. Biol. Chem. *281*, 15172–15181.

Bhaumik, S.R., Raha, T., Aiello, D.P., and Green, M.R. (2004). In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. Genes Dev. *18*, 333–343.

Bhoite, L.T., Yu, Y., and Stillman, D.J. (2001). The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. Genes Dev. *15*, 2457–2469.

Bjorklund, S., and Gustafsson, C.M. (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. Trends Biochem. Sci. *30*, 240–244.

Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D.L., and Bourbon, H.M. (2002). Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. Cell *110*, 143–151.

Bryant, G.O., and Ptashne, M. (2003). Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. Mol. Cell *11*, 1301–1309.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. Cell *56*, 549–561.

Chang, W.-H., and Kornberg, R.D. (2000). Electron crystal structure of the transcription and DNA repair complex, core TFIIH. Cell *102*, 609–613.

Collins, S.R., Miller, K.M., Maas, N.L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C.S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., et al. (2007). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. Nature *446*, 806–810.

Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., and Conaway, J.W. (2005). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. Trends Biochem. Sci. *30*, 250–255.

Cosma, M.P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. Cell *97*, 299–311.

Davis, J.A., Takagi, Y., Kornberg, R.D., and Asturias, F.A. (2002). Structure of the Yeast RNA Polymerase II Holoenzyme. Mediator Conformation and Polymerase Interaction. Mol. Cell *10*, 409–415.

Dotson, M.R., Yuan, C.X., Roeder, R.G., Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Jiang, Y.W., Li, Y., Kornberg, R.D., and Asturias, F.J. (2000). Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *97*, 14307–14310.

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. USA *93*, 6488–6493.

Dubaele, S., Proietti De Santis, L., Bienstock, R.J., Keriel, A., Stefanini, M., Van Houten, B., and Egly, J.M. (2003). Basal transcription defect discriminates between xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy in XPD patients. Mol. Cell *11*, 1635–1646.

Egly, J.M. (2001). The 14th Datta Lecture. TFIIH: from transcription to clinic. FEBS Lett. *498*, 124–128.

Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelsen, C.O., Koeck, P.J., Holmberg, S., Hebert, H., and Gustafsson, C.M. (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *103*, 15788–15793.

Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Henry, N.L., and Kornberg, R.D. (1994). Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK. Cell *79*, 1103–1109.

Fisher, R.P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. J. Cell Sci. *118*, 5171–5180.

Flanagan, P.M., Kelleher, R.J., III, Sayre, M.H., Tschoshner, H., and Kornberg, R.D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. Nature *350*, 436–438.

Fromont-Racine, M., Rain, J.-C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. Nat. Genet. *16*, 277–282.

Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J.A., Hoogstraten, D., Theil, A., Wijgers, N., Jaspers, N.G., Raams, A., Argentini, M., van der Spek, P.J., et al. (2004). A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. Nat. Genet. *36*, 714–719.

Guglielmi, B., van Berkum, N.L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H.M., Holstege, F.C., and Werner, M. (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. Nucleic Acids Res. *32*, 5379–5391.

Guidi, B.W., Bjornsdottir, G., Hopkins, D.C., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Myers, L.C. (2004). Mutual targeting of mediator and the TFIIH kinase Kin28. J. Biol. Chem. *279*, 29114–29120.

Gustafsson, C.M., Myers, L.C., Beve, J., Spåhr, H., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R.D. (1998). Identification of new mediator subunits in the RNA polymerase II holoenzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. *273*, 30851–30854.

Guzder, S.N., Qiu, H., Sommers, C.H., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S. (1994a). DNA repair gene RAD3 of S. cerevisiae is essential for transcription by RNA polymerase II. Nature *367*, 91–94.

Guzder, S.N., Sung, P., Bailly, V., Prakash, L., and Prakash, S. (1994b). RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription. Nature *369*, 578–581.

Han, S.J., Lee, Y.C., Gim, B.S., Ryu, G.H., Park, S.J., Lane, W.S., and Kim, Y.J. (1999). Activator-specific requirement of yeast mediator proteins for RNA polymerase II transcriptional activation. Mol. Cell. Biol. *19*, 979–988.

Harismendy, O., Gendrel, C.G., Soularue, P., Gidrol, X., Sentenac, A., Werner, M., and Lefebvre, O. (2003). Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. EMBO J. *22*, 4738–4747.

Holstege, F.C., van der Vliet, P.C., and Timmers, H.T.M. (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*, 1666–1677.

Holstege, F.C.P., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., and Young, R.A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. Cell *95*, 717–728.

Johnson, K.M., Wang, J., Smallwood, A., Arayata, C., and Carey, M. (2002). TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA. Genes Dev. *16*, 1852–1863.

Kang, J.S., Kim, S.H., Hwang, M.S., Han, S.J., Lee, Y.C., and Kim, Y.J. (2001). The structural and functional organization of the yeast mediator complex. J. Biol. Chem. *276*, 42003–42010.

Kelleher, R.J., III, Flanagan, P.M., and Kornberg, R.D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. Cell *61*, 1209–1215.

Keogh, M.C., Cho, E.J., Podolny, V., and Buratowski, S. (2002). Kin28 is found within TFIIH and a Kin28-Ccl1-Tfb3 trimer complex with differential sensitivities to T-loop phosphorylation. Mol. Cell. Biol. *22*, 1288–1297.

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.

Koleske, A.J., and Young, R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. Nature *368*, 466–469.

Kuras, L., Borggrefe, T., and Kornberg, R.D. (2003). Association of the Mediator complex with enhancers of active genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 13887–13891.

Laine, J.P., and Egly, J.M. (2006). When transcription and repair meet: a complex system. Trends Genet. *22*, 430–436.

Lee, T.I., Johnstone, S.E., and Young, R.A. (2006). Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location. Nat. Protocols *1*, 729–748.

Max, T., Søgaard, T.M., and Svejstrup, J.Q. (2007). Hyperphosphorylation of the carboxyterminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. J. Biol. Chem. *282*, 14113–14120.

Nair, D., Kim, Y., and Myers, L.C. (2005). Mediator and TFIIH govern carboxyl-terminal domain-dependent transcription in yeast extracts. J. Biol. Chem. *280*, 33739–33748.

Ranish, J.A., and Hahn, S. (1996). Transcription: basal factors and activation. Curr. Opin. Genet. Dev. *6*, 151–158.

Ranish, J.A., Hahn, S., Lu, Y., Yi, E.C., Li, X.J., Eng, J., and Aebersold, R. (2004). Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIH. Nat. Genet. *36*, 707–713.

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.

Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., et al. (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. Science *290*, 2306–2309.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat. Biotechnol. *17*, 1030–1032.

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Banks, C.A., Sorokina, I., Parmely, T.J., Kong, S.E., Jin, J., Cai, Y., Lane, W.S., Brower, C.S., et al. (2003). Identification of mammalian Mediator subunits with similarities to yeast Mediator subunits Srb5, Srb6, Med11, and Rox3. J. Biol. Chem. *278*, 15123–15127.

Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D., and Egly, J.M. (2000). Molecular structure of human TFIIH. Cell *102*, 599–607.

Smyth, G.K., Michaud, J., and Scott, H.S. (2005). Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. Bioinformatics *21*, 2067–2075.

Takagi, Y., and Kornberg, R.D. (2006). Mediator as a general transcription factor. J. Biol. Chem. *281*, 80–89.

Takagi, Y., Calero, G., Komori, H., Brown, J.A., Ehrensberger, A.H., Hudmon, A., Asturias, F., and Kornberg, R.D. (2006). Head module control of mediator interactions. Mol. Cell *23*, 355–364.

Tirode, 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.

Werner, M., Chaussivert, N., Willis, I.M., and Sentenac, A. (1993). Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70 kDa component of TFIIIB. J. Biol. Chem. *268*, 20721–20724.

Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. Nature *408*, 225–229.

Zurita, M., and Merino, C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIIH complex. Trends Genet. *19*, 578–584.

Résumé.

L'ARN polymérase II sert à la transcription de petits ARN non codants et à la transcription des ARN messagers. La première étape de l'activation de la transcription est la reconnaissance de régions de l'ADN par les activateurs spécifiques. Ceci permet le recrutement de coactivateurs, des facteurs généraux (GTF) et de Pol II pour former le complexe de préinitiation (PIC). Au cours de ma thèse, nous nous sommes concentré sur le rôle du Médiateur, un complexe multiprotéique qui joue un rôle essentiel dans ce processus. Nous avons découvert une interaction génétique entre *MED31* qui code pour la sous-unité la mieux conservée du Médiateur et *DST1* qui code le facteur d'élongation TFIIS. De façon surprenante, notre étude a révélé un nouveau rôle pour TFIIS qui intervient au cours de l'initiation de la transcription en conjonction avec le Médiateur pour recruter Pol II sur la région promotrice des gènes. Ensuite, nous avons identifié une interaction directe entre Med11 et Rad3, des sous-unités de la tête du Médiateur et de TFIIH. Nous avons alors poursuivi notre étude sur cette interaction et sur celles entre Med11 et ses partenaires au sein du complexe: Med17 et Med22. Des mutants qui affectent ces interactions présentent des défauts de recrutement de TFIIH, de TFIIE et de Pol II ou déstabilisent l'association des modules de TFIIH. Nous avons également mis à jour le rôle du Médiateur sur la phosphorylation du CTD de Pol II *via* la stabilisation de TFIIK sur la région promotrice. L'ensemble de nos résultats révèle un rôle essentiel du Médiateur dans les recrutements des facteurs généraux au cours de l'initiation et suggère un assemblage branché pendant la formation du PIC.

Abstract.

In eukaryotes, RNA polymerase II (Pol II) is responsible for the transcription of coding genes and a large number of non-coding RNAs. The first step in transcription activation is the recognition of DNA motifs by activators that trigger the recruitment of co-activators, general transcription factors (GTFs) and ultimately Pol II to form a preinitiation complex (PIC). During my thesis we focused our study on the Mediator, a multiprotein complexe that plays a critical role in this process. We found different interactions between the Mediator and transcription factors that inform how it could influence the transcription initiation. First, we discovered a genetic interaction between *MED31* that encodes the most conserved Mediator subunit and *DST1* that encode the elongation factor TFIIS. Surprisingly, we revealed a new role for TFIIS which acts in conjunction with Mediator during transcription initiation to recruit PolII on promoter. Then, we identified a direct interaction between Med11 head Mediator subunit and Rad3 TFIIH subunit. We explored the significance of this interaction and those of Med11 with Med17 and Med22 head module subunits and found that impairing these interactions could differentially affect the recruitment of TFIIH, TFIIE and Pol II in PIC or destabilize the association of TFIIH modules. We also found that a *med11* mutation that altered promoter occupancy by TFIIK kinase module of TFIIH reduced Pol II CTD serine 5 phosphorylation. We conclude that the Mediator head module plays a critical role in TFIIH, TFIIE and PolII recruitment in PIC. Altogether, these results suggest a branched assembly pathway in PIC formation.