

**THÈSE**

pour le

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2**

**Mention : Sciences, Technologies, Santé**

**Option : Génétique**

**Présentée et soutenue publiquement**

*Le 15 décembre 2011*

*Par Daniel DA SILVA*

*Né le 21 janvier 1985 à Angoulême*

**Caractérisation des deux isoformes  
de l'ARN Polymérase III humaine**

**Membres du Jury**

M. Christophe CULLIN, Professeur, Université Victor Segalen Bordeaux 2.... .Président  
M. Giorgio DIECI, Professeur, Université de Parme..... .Rapporteur  
M. Olivier LEFEBVRE, Directeur de recherche au CEA..... .Rapporteur  
M. Martin TEICHMANN, Professeur, Université Victor Segalen Bordeaux 2... .Directeur de thèse

## RESUME

Chez les cellules eucaryotes, la transcription est réalisée par les ARN polymérases I, II et III. L'ARN polymérase III (Pol III) transcrit des petits ARNs non codants tels que les ARNt, l'ARN U6, l'ARNr 5S et certains microARN. Il a été montré précédemment que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de la Pol III était associée à la transformation tumorale. Au sein du laboratoire, nous avons décrit une nouvelle sous-unité de la Pol III, RPC32 $\alpha$ , qui met en évidence l'existence de deux isoformes de la Pol III humaine : la Pol III $\alpha$  et la Pol III $\beta$ . La sous-unité RPC32 $\beta$ , présente dans la Pol III $\beta$ , est exprimée de façon ubiquitaire et paraît comme essentielle pour la croissance cellulaire. La sous-unité RPC32 $\alpha$  n'est pas essentielle pour la survie cellulaire et son expression est limitée aux cellules souches non différenciées et aux cellules tumorales. De plus, l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  induit la transformation tumorale des cellules fibroblastes IMR90 et change totalement l'expression de nombreux transcrits Pol III mais aussi d'autres ARNm impliqués dans la tumorigenèse (Haurie *et al.*, 2010).

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont eu pour but de mieux caractériser et comprendre les deux isoformes de la Pol III humaine. Nous avons purifié les Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$  afin d'identifier tous les composants protéiques des deux isoformes du complexe. Au cours de cette étude nous avons observé que des modifications post-traductionnelles de RPC32 $\alpha$  semblaient jouer un rôle déterminant dans la capacité oncogénique de la Pol III $\alpha$ . Pour comprendre par quel mécanisme moléculaire les Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$  pouvaient influencer l'expression de transcrits Pol II, notamment lors de la transformation cellulaire induite par l'expression de RPC32 $\alpha$ , nous avons étudié cette régulation lors de la surexpression des deux sous unités paralogues. Ainsi, nous avons mené des analyses ciblées révélant la régulation de certains gènes impliqués dans le développement, la différenciation et la tumorigenèse. Nous avons également essayé de décrire les changements d'expression des gènes au niveau globale en utilisant la technologie des puces à ADN. Cette approche innovante et puissante nous a permis d'obtenir une vision d'ensemble des transcrits Pol II différenciellement régulés lors de la surexpression de RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ . Nous avons pu apprécier l'impact de la Pol III pour le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la survie de la cellule, la prolifération tumorale ou encore à la réponse immunitaire innée. Les résultats de cette étude qui demandent à être confirmés ouvrent des voies de recherches particulièrement intéressantes qui mériteront d'être approfondies dans le futur.

## ABSTRACT

Transcription in eukaryotic nuclei is carried out by DNA-dependent RNA polymerases I, II, and III. Human RNA polymerase III (Pol III) transcribes small untranslated RNAs that include tRNAs, 5S RNA, U6 RNA, and some microRNAs. Increased Pol III transcription has been reported to accompany or cause cell transformation. In the laboratory, we described a Pol III subunit (RPC32 $\beta$ ) that led to the demonstration of two human Pol III isoforms (Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$ ). RPC32 $\beta$ -containing Pol III $\beta$  is ubiquitously expressed and essential for growth of human cells. RPC32 $\alpha$ -containing Pol III $\alpha$  is dispensable for cell survival, with expression being restricted to undifferentiated ES cells and to tumor cells. In this regard, and most importantly, ectopic expression of RPC32 $\alpha$  in fibroblast IMR90 enhances cell transformation and dramatically changes the expression of several tumor-related mRNAs and that of a subset of Pol III RNAs. These results identify a human Pol III isoform and isoform-specific functions in the regulation of cell growth, the differentiation and transformation. (Haurie *et al.*, 2010).

The work described in this manuscript enables identification and understanding the function of the two human Pol III isoforms. Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  are purified in order to describe all the protein components of the two Pol III complex. During this study, we observed that post-translated modifications of RPC32 $\alpha$  seem to have a crucial function in oncogenic capacity of Pol III $\alpha$ . To understand how Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  can affect Pol II RNA expression, in particular during cell transformation induced by RPC32 $\alpha$ , we studied this regulation during the overexpression of the two paralogue subunits. We performed focused analysis, this study revealed the regulation of certain genes involved in the development, the differentiation and the tumorigenesis. We also tried to describe global gene expression modification using microarray technology. This new and powerful approach enables to obtain a global view on mRNA regulation by overexpression of RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$ . We observed the effect of Pol III on embryo development, cell differentiation, cell survival, tumor proliferation and on innate immune response. The results of this study need further confirmation pave the way for interesting projects which are worth going into detail for the future.

## Remerciements

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sous la direction du Professeur Martin Teichmann à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie au sein de l'équipe « Transcriptions, Mécanismes et Structures » de l'unité U869.

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail de thèse. Merci au Professeur Giorgio Dieci et au Docteur Olivier Lefebvre pour avoir accepté le lourd travail de rapporteur. Merci aussi au Professeur Christophe Cullin qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse et qui m'a apporté le goût de la recherche et aiguisé ma curiosité au cours de ses enseignements.

Je les remercie ainsi tous les trois pour le temps consacré à ce mémoire.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Martin Teichmann pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir fait confiance dès le début. Je le remercie pour son encadrement scientifique et ses nombreux conseils tout au long de ces trois années de thèse. Je tiens également à le remercier pour son enthousiasme et sa passion communicante pour la recherche, je ne pourrai oublier ces longs échanges qui m'ont permis de me remettre toujours en question scientifiquement, d'élargir ma réflexion sur mon sujet et de m'ouvrir sur de nombreux horizons scientifiques.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe TMS. Merci Hélène pour ton expérience et tous tes conseils qui m'ont aidé et rassuré dans les moments de doute scientifique. Stéphanie, je te remercie pour les trucs et astuces expérimentaux que tu m'as appris dès mon arrivé au laboratoire, mais aussi pour tous les moments partagés et pour toutes nos discussions scientifiques ou non. Ce fut un réel plaisir que de travailler avec toi. Chiara, merci pour ces trois années de fous rires linguistiques et pour nos échanges scientifiques. Je me souviendrais longtemps des particularités grammaticales italiennes peu compatibles avec la langue française. Leyla merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse, je sais qu'elle s'annonce brillante. Merci à vous tous pour votre disponibilité et pour votre esprit critique qui m'a permis de m'améliorer et de réaliser ce travail.

Je voudrai également remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse, pour leur gentillesse et leur aide tout au long de ces trois ans. Je pense notamment à Thierry Leste-Lasserre, Guillaume Drutel, Alexandre Borchard, Stéphane Chaignepain ou encore Stéphane Claverole. Je n'oublierai pas Elodie Bacle que j'ai encadré lors de son stage M1 et qui a directement participé aux travaux de ce rapport. Merci à vous pour avoir tenté de résoudre les difficultés rencontrées lors de ce projet.

Je souhaiterai particulièrement remercier mes parents et ma sœur, qui m'ont soutenu pendant toutes mes études et qui m'ont permis de les réaliser dans les meilleures conditions. Vous avez toujours cru en moi et vous avez toujours été là. Pour cela et pour tant d'autres choses, merci à vous trois !

Merci à mes amis Yan, Julie, Juliette et Aude qui ont su me soutenir et me reconforter et qui ont su resté proche malgré les divers chemins empruntés par chacun et chacune. Je terminerai par remercier mon amie Aurélie, qui a su se montrer patiente, disponible et attentionnée tout au long de ses trois années. Merci à toi pour avoir supporté mon absence de la semaine, mes retards fréquents ou mes départs anticipés du week-end.

# Table des matières

Table des matières .....	1
PREAMBULE : .....	4
INTRODUCTION.....	6
I. LA TRANSCRIPTION PAR L'ARN POLYMERASE III .....	7
1.1. Les gènes transcrits par l'ARN polymérase III.....	7
1.2. Les promoteurs des gènes de classe III .....	11
1.3. Les facteurs de transcription de l'ARN polymère III .....	13
1.4. Le processus de transcription par l'ARN Polymérase III .....	17
1.5. Les constituants de l'ARN Polymérase III.....	20
II. LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION POLYMERASE III .....	24
2.1. Régulation épigénétique et chromatinienne .....	24
2.2. Les régulateurs de la transcription Pol III .....	25
III. LA TRANSCRIPTION PAR LA POL III ET LE CANCER .....	30
3.1. Dérégulation de la transcription Pol III lors des cancers .....	30
3.2. L'existence de l'ARN Polymérase III Alpha et de l'ARN polymérase III Beta.....	32
TRANSITION : .....	36
RESULTATS .....	38
I. Identification des partenaires des sous-unités RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$ au sein de la machinerie de transcription Pol III.....	39
II. Influence de RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$ sur la machinerie Pol III.....	48
III. Influence de RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$ sur des transcrits Pol II .....	51
IV. Analyse globale de l'expression des gènes Pol II sous influence de l'expression de RPC32 $\alpha$ ou RPC32 $\beta$ .....	54
V. Implication de RPC32 $\alpha$ dans le développement et la différenciation cellulaire.....	58
VI. Modification post-traductionnelle de RPC32 $\alpha$ .....	60
VII. Régulation de RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$ dans des cellules hématopoïétiques .....	65

DISCUSSION .....	68
I. Purification des deux isoformes de l'ARN polymérase III humaine.....	69
II. La machinerie Pol III impliqué dans la régulation de la chromatine et la transcription Pol II.....	72
III. Régulation globale du transcriptome induite par la surexpression des paralogues RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$ .....	77
IV. Limites de l'analyse de l'expression ARN. ....	82
V. Implication de RPC32 $\alpha$ dans le développement et la différenciation.....	84
VI. Régulation de RPC32 $\alpha$ et modifications post-traductionnelles.....	86
VII. RPC32 $\alpha$ et cellules hématopoïétiques.....	87
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :.....	91
MATERIELS ET METHODES.....	96
1. Souche bactérienne.....	97
2. Les constructions plasmidiques.....	97
3. Mutagenèse dirigée du gène PolR3G .....	97
4. Extraction d'ADN plasmidique.....	98
5. Dosage d'acide nucléique.....	98
6. Lignées cellulaires.....	98
7. Conditions de culture .....	98
8. Transfections cellulaires.....	99
9. Infections cellulaires .....	99
10. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires .....	99
11. Dialyse des extraits.....	100
12. Dosage de protéines .....	100
13. Fractionnement sur colonne FPLC ÄKTA.....	100
14. Les anticorps .....	101
15. Couplage des anticorps à des billes de protéine A-sépharose.....	102
16. Immunoprécipitation .....	102
17. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). ....	103
a) Préparation de l'échantillon .....	103
b) Préparation du gel .....	103
c) Migration.....	103
18. Coloration au nitrate d'argent .....	104
19. Spectrométrie de masse.....	104
20. Immunodétection de protéines sur membrane (western-blot).....	105
a) Transfert des protéines .....	105
b) Détection immunologique.....	105
21. Extraction ARN et vérification de leur intégrité .....	106
22. Reverse transcription.....	106

23. PCR quantitative .....	107
a) Réalisation de la PCR quantitative.....	107
b) Amorces utilisées .....	107
24. Microarrays ou puces à ADN.....	108
25. Collecte et analyse des données des puces à ADN .....	108
 ANNEXES .....	 109
Annexe 1 : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Annexe 2 : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Annexe 2 bis : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Annexe 3 : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Annexe 4 : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Annexe 5 : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Annexe 6 .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
 Bibliographie.....	 110
 PUBLICATIONS .....	 131

## **PREAMBULE :**

Une des plus grandes avancées dans le domaine de la biologie est sans nul doute la caractérisation de la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) entre la fin du XIXème et le début du XXème siècle (pour revue Ralf 2005). L'ADN, en plus de porter l'hérédité, renferme la totalité des informations (ou patrimoine génétique), qui dicte l'ensemble des mécanismes cellulaires nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme vivant. Pour décoder l'information, la première étape du processus mis en jeu est la transcription de l'ADN. Il s'agit de la synthèse de molécules d'acide ribonucléique (ARN) grâce aux ARN polymérase ADN dépendantes. L'activité de ces enzymes a été mise en évidence à partir d'extrait de foie de rat (Weiss et Gladstone 1959). Trois formes d'enzymes nucléaires ont été révélées chez les eucaryotes, elles ont été caractérisées selon leur profil chromatographique (Roeder et Rutter 1969). Ces trois formes distinctes ont été appelées ARN polymérase I, II et III (Pol I, Pol II, Pol III). Par la suite, d'autres complexes protéiques permettant l'initiation de la transcription des gènes ont été isolés et désignés comme facteurs généraux. Spécifiques à chaque polymérase, ils sont nécessaires à la transcription de tous les gènes. Ils permettent la reconnaissance spécifique des promoteurs et le recrutement des enzymes. Enfin, des protéines permettant la régulation de la machinerie de transcription ont également été identifiées.

Chez tous les eucaryotes, de la levure à l'homme, chaque ARN polymérase transcrit un ensemble de gènes qui leur est propre. La Pol I transcrit exclusivement le gène répété codant pour l'ARN précurseur 45S qui sera clivé pour former les ARN ribosomiaux (ARNr) 28S, 18S et 5,8S. Cette activité transcriptionnelle est exclusivement nucléolaire. La Pol II, qui est nucléoplasmique, polymérise l'ensemble des ARN messagers (ARNm) ainsi que des petits ARN stables et non codants (ARNnc) impliqués dans la machinerie d'épissage (snARN), dans la modification des ARNr (snoARN) ou la régulation d'autres transcrits grâce aux micros ARN (miARN). La Pol III produit uniquement des ARNnc participant à différentes fonctions, structurelles, catalytiques ou régulatrices. Ainsi cette polymérase, à la fois nucléoplasmique et nucléolaire, synthétise les ARN de transfert (ARNt), l'ARNr 5S nécessaires à l'appareil de traduction, et d'autres petits ARN stables et non-traduits impliqués dans différents mécanismes cellulaires (Dieci *et al.*, 2007). Plus récemment, les ARN polymérase IV et V (Pol IV et V), spécifiques des plantes, ont été décrites. Elles sont

nécessaires pour la biogenèse de petits ARN interférents (siRNA) impliqués dans la régulation de la méthylation de l'ADN.

La deuxième étape du processus pour décoder l'information génétique, est la traduction des ARNm. La traduction est la synthèse de polypeptides grâce aux séquences ARN, ce qui transforme donc l'information génétique en effecteurs protéiques. Les trois ARN polymérase sont impliquées dans la synthèse des constituants du complexe permettant la traduction : le ribosome. La qualité et le nombre des ribosomes et des ARN de transfert conditionnent la vitesse de croissance et la prolifération des cellules (Rudra et Warner 2004 ). Ainsi la biosynthèse de machinerie de traduction est l'activité la plus consommatrice en énergie de la cellule et ce processus requiert plus de 80% de l'activité transcriptionnelle totale et environ 75% par les seules activités des Pol I et III (Paule et White 2000 ; Dumay-Odelot *et al.*, 2010), la Pol II ne participant qu'à la transcription des gènes codant pour les protéines composant les ribosomes. Dans de nombreuses cellules cancéreuses, une hyperactivité de la transcription réalisée par la Pol III a été constatée (Schwartz *et al.*, 1974 ; Chen *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2005; Marshall et White 2008). La détermination des mécanismes de régulation de la transcription effectuée par la Pol III serait une avancée dans la compréhension du contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire.

Au cours de cette introduction, il sera présenté ce qui est connu des gènes transcrits par la Pol III ainsi que de la machinerie moléculaire, composée du complexe catalytique et des différents facteurs de transcription essentiels à l'activité enzymatique. Les différentes interactions et l'agencement des différents partenaires permettant la transcription seront également exposés. Ensuite, les causes et les mécanismes connus régulant l'activité Pol III seront décrits. Enfin, il sera abordé la régulation de la Pol III impliquée dans les processus de croissance et de prolifération cellulaires lors de cancer, en particulier avec la découverte des deux isoformes de l'ARN Pol III humaine.



## INTRODUCTION

Les connaissances les plus détaillées sur le système Pol III et la mécanistique de la transcription, sont disponibles pour *S. cerevisiae* et l'homme. Mais le mécanisme de transcription est universel et présent des procaryotes aux eucaryotes supérieurs. Les microorganismes les plus archaïques possèdent un système de base sur lequel diverses modifications et ajouts ont été acquis chez d'autres organismes. L'analyse de la transcription Pol III humaine fournit des renseignements importants sur les grandes évolutions de l'appareil de transcription Pol III chez les métazoaires apparues autour du système existant chez la levure.

## **I. LA TRANSCRIPTION PAR L'ARN POLYMERASE III**

### **1.1. Les gènes transcrits par l'ARN polymérase III**

La Pol III transcrit les gènes, dit de classe III, qui codent pour des ARN de petites tailles (de 70 à 341 nucléotides), stables et non traduits, impliqués dans des mécanismes cellulaires variés (Dieci *et al.*, 2007) : la traduction avec l'expression de l'ARNr 5S et des ARNt ; la maturation des ARN messagers, des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert avec l'intervention respective des transcrits U6, MRP et H1 ; la régulation de l'expression génique avec l'ARN 7SK et les séquences Alu ; la sécrétion protéique avec l'ARN 7SL qui fait partie d'un complexe ribonucléoprotéique qu'est la particule de transmission du signal pour le transport des protéines vers le réticulum endoplasmique ; ou encore l'infection virale avec de petites unités de transcription comme, par exemple, les gènes EBER ou les gènes VA des adénovirus.

Nécessaire à la synthèse protéique, l'ARNr 5S long de 120 nucléotides est le seul ARNr transcrit par la Pol III. Chez les eucaryotes, il s'associe à de nombreuses protéines et avec les autres constituants ARNr transcrits par la Pol I : 5,8S et 28S, formant ainsi la grande sous unité 60S du ribosome. Chez l'homme comme chez tous les eucaryotes, il existe de nombreuses copies du gène 5S. Parfois regroupé en cluster (d'une dizaine à plus d'une centaine de copies), ce gène se retrouve disposé tout le long du génome et est donc représenté entre 400 et 500 fois. (Sorensen et Frederiksen 1991). A noter également la présence d'environ 1500 pseudogènes. Bien que transcrits par la Pol III et séparés des autres ADNr

transcrits par la Pol I, les gènes codants pour l'ARNr 5S se retrouvent abondamment dans le nucléole. Cette proximité spatiale s'explique par la nécessité d'une grande efficacité d'assemblage des différents constituants des ribosomes (Matera 1999). Les ARN constituent deux tiers du poids du ribosome et la structure de celui-ci démontre également que l'activité catalytique est portée par les ARN, on peut parler alors de ribozyme.

Les principaux transcrits de la Pol III sont d'autres ARN impliqués dans la traduction : les ARNt. Ce sont des ARN d'une taille comprise entre 73 et 94 nucléotides et codés par plus de 600 gènes dispersés dans tout le génome. Les ARNt présentent des structures secondaires et tertiaires très conservées car essentielles à leur fonction. Les ARNt possèdent une zone d'attache d'un acide aminé et d'une boucle contenant trois bases, nommée anticodon, qui reconnaît sa séquence complémentaire, appelée codon, sur l'ARNm. Ils forment donc l'adaptateur entre la séquence d'un codon d'un ARNm et l'acide aminé à incorporer au sein de la chaîne polypeptidique naissante selon le code génétique de l'organisme. C'est ce mécanisme qui constitue la clé de la traduction du message génétique en une protéine effectrice.

En plus des gènes d'ARNt et l'ARNr 5S, la Pol III transcrit quelques autres gènes en moindre mesure. Chez les eucaryotes, le petit ARN nucléaire (ARNsn) U6, est un ARN de 106 nucléotides, très conservé entre les espèces, codé par un gène présent environ 200 fois dans le génome humain mais dont seulement 5 copies sont fonctionnelles (Domitrovich et Kunkel 2003 ; Kunkel *et al.*, 1986 ; Oler *et al.*, 2010 ; Moqtaderi *et al.*, 2010). Cet ARN est le plus petit composant du spliceosome, qui est un complexe ribonucléoprotéique assurant l'épissage des ARNm. Les quatre autres ARNsn qui le composent sont transcrits par l'ARN Pol II (Kunkel *et al.*, 1986 ; Reddy *et al.*, 1987).

La Pol III synthétise d'autres ARN entrant dans la composition de complexes ribonucléoprotéiques impliqués dans la maturation des ARN. C'est le cas du composant ARN de l'ARNase MRP (pour Mitochondrial RNA Processing). Initialement ce transcrit a été découvert dans des cellules murines pour son rôle dans la réplication du brin discontinu de l'ADN mitochondrial en clivant l'ARN mitochondrial qui sert ainsi d'amorce à l'ADN polymérase (Chang et Clayton 1987). Chez la levure, l'ARNase MRP est responsable de la maturation des précurseurs des ARNr (Chu *et al.*, 1994 ; Lygerou *et al.*, 1996) et serait impliqué dans le cycle cellulaire et plus particulièrement en fin de la mitose (Cai *et al.*, 1999 ;

Gill *et al.*, 2006 ). Cet ARN de 267 nucléotides contient des régions similaires à un autre transcrit Pol III dont il est sûrement issu, l'ARN H1. Cet ARN de 341 nucléotides contribue à la formation de la nucléase appelée ARNase P connue pour être l'une des premières activités catalytiques décrite portée par un ARN (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Ce complexe ribonucléoprotéique mature l'extrémité 5' des ARNt mais aussi d'autres ARN en fonction des organismes (pour revue Esakova et Krasilnikov 2010 ). Des études récentes laissent également penser que l'ARNase P pourrait avoir un rôle de facteur de transcription Pol III (Reiner *et al.*, 2006 ; Jarrous et Reiner 2007 ).

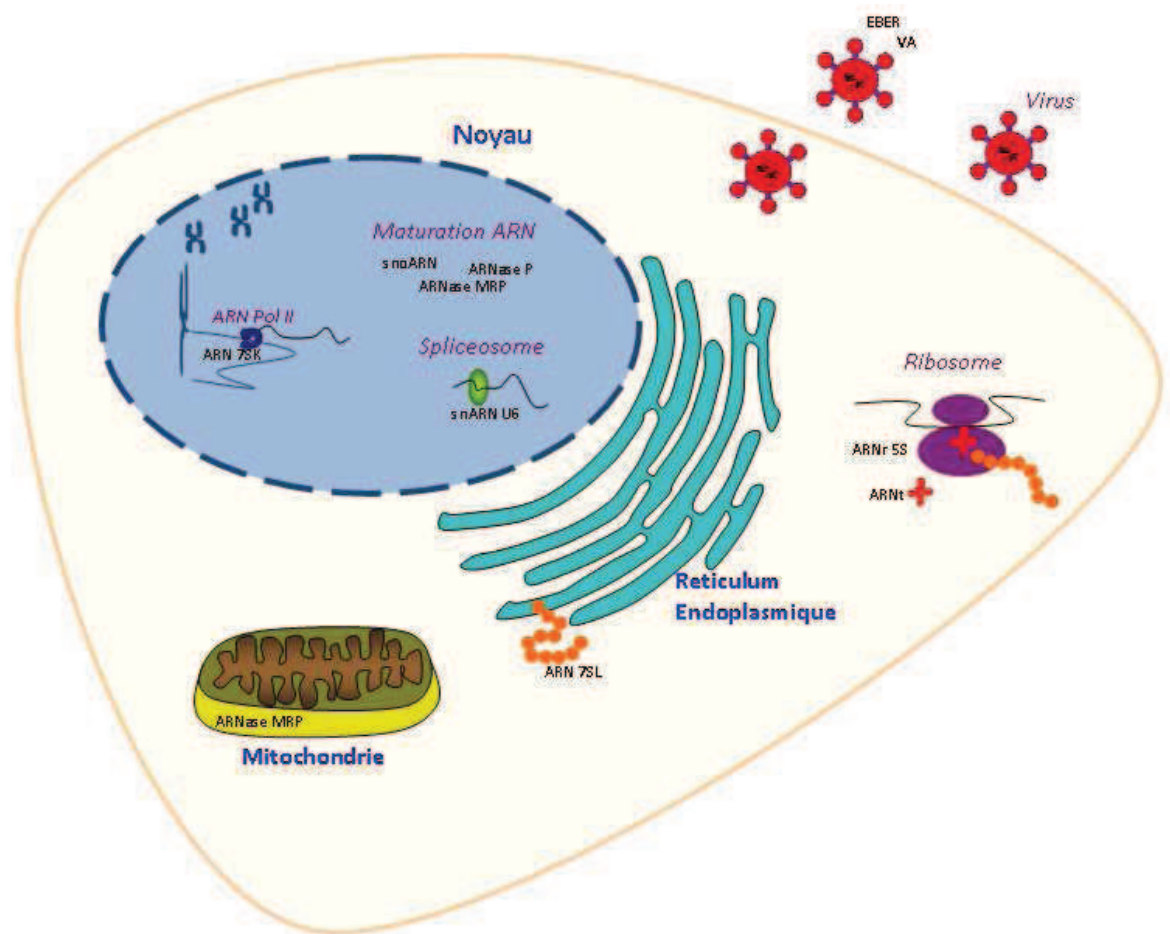


Figure 1 : Rôles de transcrits de l'ARN polymérase III dans différent processus cellulaires. D'après Dieci *et al.*, 2007

L'ARN 7SK est également synthétisé par la Pol III. Malgré un gène unique chez l'homme, il est très abondant dans la cellule et est impliqué dans la régulation de la transcription Pol II. Cet ARN de 331 nucléotides est essentiel à l'interaction de la protéine HEXIM1 qui est un répresseur du facteur d'élongation Pol II, P-TEFb (Yang *et al.*, 2001 ; Yik *et al.*, 2003 ; Diribarne et Bensaude 2009). Ce facteur P-TEFb (Positive-Transcription Elongation Facteur b), qui est un hétérodimère composé de la kinase CDK9 et d'une cycline T, stimule la transcription en phosphorylant l'ARN polymérase II. (Nguyen *et al.*, 2001)

L'ARN 7SL, fait partie d'un autre complexe ribonucléoprotéique qu'est la particule de reconnaissance du peptide signal (SRP) responsable de l'insertion des polypeptides naissant dans le réticulum endoplasmique. Cet ARN permettrait la stabilisation du complexe composé de 6 protéines (Batey *et al.*, 2000 ). Il est l'ARN le plus abondant chez la levure après les ARNr et les ARNt (Felici *et al.*, 1989).

Les séquences SINE (Short Interspersed Elements) représentent 8% à 15%, soit une forte proportion, du génome des mammifères (plus d'un million de copies chez l'homme) et possèdent des éléments promoteurs caractéristiques des gènes de classe III. Les SINE les plus connus sont les séquences Alu. Issu de la rétrotransposition de gène de classe III (ARNt, 5S, 7SL etc...) (Batzer et Deininger 2002), leur fonction précise est inconnue mais leur mobilité permet de les considérer comme important pour l'évolution par la création de nouveaux transcrits acquérant de nouvelles fonctions (Santangelo *et al.*, 2007). Les ARN BC1 et BC200 sont également classés parmi les SINE, leur fonction est connue dans la régulation de la traduction réalisée près des synapses dans le tissu nerveux. (Wang *et al.*, 2002 ; Centonze *et al.*, 2007). Néanmoins la mobilité de ces éléments conduit l'apparition d'anomalies génétiques pouvant mener à des maladies génétiques ou entraîner la survenue de cancer (pour revue Konkel et Batzer 2010).

Des transcrits Pol III (certains ARNt, l'ARN 5S, 7SK, 7SL, U6 et des éléments Alu) ont été décrits comme pouvant être sélectivement empaquetés dans la capsid virale de différent rétrovirus sans que le rôle de ces transcrits ne soit clairement compris (Onafuwa-Nuga *et al.*, 2005 ; Tian *et al.*, 2007 ). De plus, chez l'humain, lors d'infection virale par adénovirus, la Pol III transcrit de petites unités de transcription présentes dans leur génome viral. Par exemple, les gènes EBER appelés EBER1 et EBER2, sont transcrits à partir du génome du virus Epstein-Barr (EBV) par la Pol III. Durant l'infection latente, typique (EBV)

et pour l'immortalisation des cellules B, ces deux gènes sont fortement exprimés. Bien qu'aucune fonction peut-être attribuée aux ARN EBER lors de la transformation tumorale ou de la croissance cellulaire, plusieurs études soulignent leur contribution significative lors de la formation de tumeurs malignes associées à l'EBV (Ruf *et al.*, 2000 ; Liang *et al.*, 2002) probablement grâce aux interactions directes avec les protéines cellulaires avec lesquelles ils sont connus pour former des complexes. De plus l'infection par l'EBV induit la transcription de facteurs cellulaires dont notamment TFIIB et TFIIC conduisant à l'augmentation générale de la transcription Pol III (Felton-Edkins *et al.*, 2006 ). Les transcrits EBER ont pour partenaires protéiques PKR (Clarke *et al.*, 1991 ; Nanbo et Takada 2002), La (Lerner *et al.*, 1981), la protéine ribosomale L22 (Houmani *et al.*, 2009) et le protéine cytosolique RIG-I (Samanta *et al.*, 2006). Enfin, il a été récemment démontré que la transcription d'ADN d'agents infectieux, réalisée par la Pol III dans le cytosol, permettait une réponse immunitaire par la voie de signalisation induite par RIG-I (Chiu *et al.*, 2009 ; Ablasser *et al.*, 2009).

Les gènes VA des adénovirus sont également connus pour être transcrits par la Pol III (Rosa *et al.*, 1981). Essentiels pour maîtriser la réponse immunitaire des cellules hôtes, les ARN VA1 et VA2 sont capables de s'associer à différents complexes protéiques empêchant l'inhibition de la traduction de la cellule infectée (pour revue Mathews 1990). Ces transcrits perturbent également le système d'ARN interférent en bloquant les fonctions du complexe DICER et RISC (Andersson *et al.*, 2005) qui s'avère être une réponse immunitaire répandue existant même chez les plantes.

## **1.2. Les promoteurs des gènes de classe III**

L'ARN polymérase III humaine reconnaît trois types de promoteurs différents, deux internes à la séquence codante du gène, et un externe. L'organisation des promoteurs des gènes de classe III est particulière car ils sont composés d'éléments discontinus (pour revue Geiduschek et Tocchini-Valentini 1988 ; Orioli *et al.*, 2010). Et pour certains gènes il existe même des promoteurs « chimères » constitués de différents éléments de promoteurs internes et de promoteurs externes.

Le gène codant pour l'ARN 5S possède trois séquences promotrices internes, les boîtes A et C, séparées d'une vingtaine de paires de bases, et un élément intermédiaire entre ces deux boîtes. Cette structure qui forme l'ICR (Internal Control Region), en aval du site d'initiation de la transcription, est caractéristique du promoteur de type 1. La nature des séquences entre les éléments promoteurs importe peu mais la distance entre les blocs est déterminante pour la reconnaissance du promoteur par les facteurs de transcription et l'initiation de la transcription (Pieler *et al.*, 1987).

Le promoteur de type 2 est typique des gènes codant les ARNt qui constituent la grande majorité des gènes de classe III. Il possède aussi deux séquences promotrices internes notées boîtes A et B (Galli *et al.*, 1981). Egalement disposées en aval du site d'initiation de la transcription, ces boîtes sont très conservées et il est même possible de corrélérer l'efficacité de transcription avec le respect des séquences consensus de celles-ci (Nichols *et al.*, 1989). De plus, pour ses boîtes internes et donc transcrites, il est intéressant de noter qu'en plus d'être des séquences permettant le recrutement des facteurs de transcription, elles servent également à la structure des ARNt. Ce qui explique la bonne conservation des deux boîtes car elles permettent de sélectionner les séquences qui produiront une structure efficace d'ARNt. Il est important de noter par ailleurs que même si la distance optimale entre les boîtes A et B est d'environ 12 à 77 paires de bases, la distance peut augmenter jusqu'à 400 paires de bases avec la présence d'intron. (Dingermann *et al.*, 1983 ; Fabrizio *et al.*, 1987).

Enfin, les gènes codant pour les ARN U6, 7SK, et les ARN de la ARNase P et MRP présentent un promoteur de type 3. Il est situé en amont de la séquence transcrite et est composé d'une séquence éloignée du site d'initiation de transcription (environ 200 nucléotides) appelée DSE (Distal Sequence Element), d'une autre séquence plus proche appelée PSE (Proximal Sequence Element), et enfin d'une boîte TATA (Bark *et al.*, 1987 ; Carbon *et al.*, 1987 ; Das *et al.*, 1988 ; Kunkel et Pederson 1988 ; Mattaj *et al.*, 1988 ; Lobo et Hernandez 1989).

Ainsi, il a été montré que les promoteurs des gènes de classe III, ont des organisations bien différentes notamment chez des eucaryotes distincts. Et il est intéressant de relever que les facteurs de transcription se liant à ces séquences présentent une diversité comparable.



### 1.3. Les facteurs de transcription de l'ARN Polymérase III

Le recrutement de la Pol III au site d'initiation de la transcription nécessite l'interaction de facteurs généraux de transcription, avec les séquences promotrices. Les facteurs de transcription ont été purifiés à partir des fractionnements protéiques réalisés sur des extraits de cellules humaines démontrant la nécessité de trois fractions protéiques distinctes en plus de la Pol III, pour reconstituer la transcription des gènes de classe III dans un système *in vitro* (Segall *et al.*, 1980 ). Ces fractions protéiques actives ont permis de caractériser les facteurs généraux de transcription appelés TFIIA, TFIIB et TFIIC. Puis, en correspondance avec les particularités du promoteur de type 3, le facteur PTF (PSE-binding Transcription Factor) a été identifié, (Waldschmidt *et al.*, 1991 ; Murphy *et al.*, 1992 ; Sadowski *et al.*, 1993 ) ainsi que les protéines Oct1 et Staf qui se lient au DSE et participe à l'activation de la transcription. (Bark *et al.*, 1987 ; Murphy *et al.*, 1992 ; Carbon *et al.*, 1987 ; Schaub *et al.*, 1997).

#### 1.3.1. Le facteur TFIIA

TFIIA a été le premier facteur de transcription eucaryote purifié grâce à son abondance, il représente plus de 15% de la quantité totale de protéines dans les oeufs de Xénope (Engelke *et al.*, 1980 ; Pelham et Brown 1980 ; Ginsberg *et al.*, 1984). Ce facteur contient de nombreux doigts à zinc (Miller *et al.*, 1985) ce qui est caractéristique des protéines régulatrices capables de se lier à l'ADN. Cette protéine de 40 kDa est spécifique de la transcription du gène de l'ARNr 5S, elle se lie à la boîte C du promoteur mais recouvre l'intégralité de l'ICR (pour review Paule et White 2000 ). Indispensable à la transcription de l'ARN 5S, TFIIA sert de plateforme au recrutement du facteur TFIIC sur le promoteur du gène de l'ARNr 5S.

#### 1.3.2. Le facteur TFIIC

Le facteur TFIIC, est un complexe multiprotéique composé de six sous unités (220, 110, 102, 90, 63 et 35 kDa) et est donc l'un des plus gros facteurs de transcription connu (Dumay-Odelot *et al.*, 2007 ). Il est capable de reconnaître le facteur TFIIA lié sur le promoteur de type 1 du gène codant pour l'ARN 5S mais aussi directement les boîtes A et B des promoteurs de type 2. Il est assez remarquable que ces deux éléments du promoteur de type 2 soient reconnus simultanément par un seul facteur. En effet la séparation entre ces boîtes peut varier considérablement entre les différents gènes notamment pour certains gènes



d'ARNt possédant un intron court au sein de leurs régions codantes. De plus, l'orientation relative hélicoïdale des boîtes A et B n'est pas importante pour l'efficacité de la transcription (Baker *et al.*, 1987). Chez l'homme, deux composantes ont pu être séparées par chromatographie échangeuse d'ions, et appelées TFIIC1 et TFIIC2 (Yoshinaga *et al.*, 1987 ; Wang et Roeder 1996). La fonction de TFIIC1 n'est pas élucidée mais nécessaire. Des expériences ont suggéré que l'activité TFIIC1 pouvait-être comparable à celle de la sous-unité BDP1 du facteur de transcription TFIIB (Weser *et al.*, 2004 ). La purification de TFIIC2 a permis d'identifier sa composition. TFIIC2 a pu également être isolé sous une forme inactive qui n'a pas la sous-unité TFIIC110 (Sinn *et al.*, 1995 ). La principale fonction de TFIIC sur l'ADN nu est de recruter TFIIB.

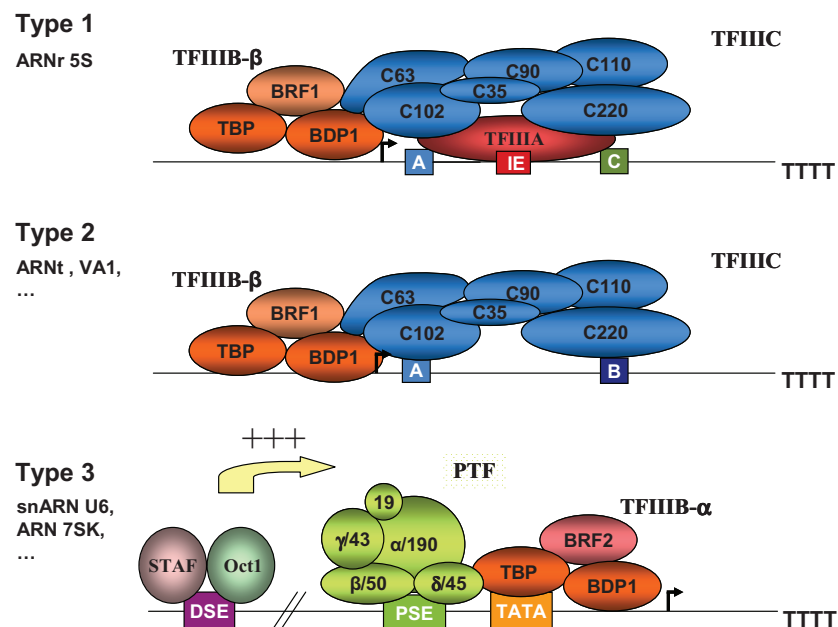


Figure 2 : Représentation schématique des promoteurs et des facteurs de transcription associés pour l'ARN Polymérase III de mammifère. D'après Dumay-Odelot *et al.*, 2010

### 1.3.3. Le facteur TFIIB

Le facteur TFIIB permet le recrutement de la Pol III pour l'initiation de la transcription. Ce facteur est ainsi essentiel à la transcription des différents gènes de classe III. Initialement identifié par deux fractions appelées B' et B'', ce complexe est formé de 3 polypeptides dont l'un est TBP (TATA Binding Protein) qui s'associe à BRF1 (TFIIB Related Factor) (Margottin *et al.*, 1991 ; Kassavetis *et al.*, 1992b ; Lobo *et al.*, 1992 ; White et

Jackson 1992 ; Wang et Roeder 1996) et à BDP1 (Bartholomew *et al.*, 1991 ; Kassavetis *et al.*, 1991). Il a été montré qu'il existait deux isoformes de TFIIB chez l'homme. Associée à TBP et BDP1 pour former TFIIB-beta, BRF1 est remplacée par BRF2 dans la forme TFIIB-alpha. (Teichmann et Seifart 1995 ; Teichmann *et al.*, 2000 ; Schramm *et al.*, 2000 ).

### ***TBP***

La protéine TBP se lie à l'ADN par reconnaissance de la boîte TATA, située en amont du site d'initiation. Ce facteur a été longtemps reconnue uniquement pour son rôle dans l'expression des gènes de classe II, mais la mise en évidence de la boîte TATA dans la séquence promotrice du gène codant pour l'ARNsn U6 de la levure et des tests de transcription *in vitro*, ont démontré l'implication de TBP dans la transcription par la Pol III (Mattaj *et al.*, 1988 ; Margottin *et al.*, 1991). Par la suite TBP s'est avéré essentiel dans la transcription de tous les gènes de classe III même dépourvu de la boîte TATA dans leur séquence promotrice (Huet et Sentenac 1992 ; White et Jackson 1992 ; Joazeiro *et al.*, 1994). TBP est alors une sous-unité d'assemblage du facteur TFIIB spécifiques du système Pol III.

### ***Bdp1***

Bdp1 est la plus grande sous-unité de TFIIB constituant même à elle seule la fraction B'', et joue un rôle dans l'assemblage du complexe (Kassavetis *et al.*, 1995). Bdp1 contient un domaine putatif de liaison à l'ADN, appelé SANT (car retrouvé sur les protéines SWI3, ADA2 et N-CoR et TFIIB) (Aasland *et al.*, 1996). Ce domaine est très conservé entre la protéine humaine et de levure (Schramm *et al.*, 2000 ).

### ***Brf1***

Appelée BRF à cause de son homologie avec le facteur de transcription TFIIB (TFIIB-Related Factor), cette protéine interagit, comme son homologue, avec la protéine TBP mais aussi avec TFIIC (Chaussivert *et al.*, 1995 ; Wang et Roeder 1995 ; Mital *et al.*, 1996). Ses propriétés d'interaction avec plusieurs constituants du système de transcription des gènes de classe III lui confèrent un rôle clé dans la formation du facteur TFIIB, dans la stabilité de l'association de TFIIB à l'ADN et dans le recrutement de la Pol III au promoteur.

### ***Brf2***

Les protéines TBP, Brf1 et Bdp1, qui constituent le facteur TFIIB chez la levure, sont impliquées dans la transcription de tous les gènes de classe III. Chez l'homme, ce facteur est caractérisé par l'existence de deux complexes nommés TFIIB- $\alpha$  et TFIIB- $\beta$  contenant

respectivement Brf2 et Brf1. Les deux complexes ciblent différents promoteurs, ainsi TFIIB- $\beta$  s'avère notamment essentiel pour la transcription du gène U6 (type 3) (Teichmann et Seifart 1995 ; Wang et Roeder 1995 ; Schramm *et al.*, 2000 ; Teichmann *et al.*, 2000 ; Cabart et Murphy 2001).

#### **1.3.4. Le facteur PTF**

La structure particulière des promoteurs de type 3, avec leurs éléments de séquence en amont du site d'initiation de la transcription (DSE et PSE), requière l'action d'un groupe distinct de protéines qui participent à la transcription Pol III ainsi que Pol II. Le DSE humain est un site de liaison de protéines, dont les principaux ligands sont les protéines Oct-1 et Staf. Oct-1 est une protéine à homeodomaine POU, avec une liaison à l'ADN bipartite grâce à deux modules de fixation (POUS et POUH) reliés entre eux par une structure hélice-boucle-hélice souple (Carbon *et al.*, 1987 ; Mittal *et al.*, 1999). Staf a été initialement identifiée chez le Xénope, par l'équipe d'Alain Krol (Schuster *et al.*, 1995 ; Schaub *et al.*, 1997), puis un homologue très conservé chez l'humain a été caractérisé, ZNF143 (Myslinski *et al.*, 1998 ). Grâce à un nucléosome, ces facteurs sont rapprochés par le repliement de l'ADN, au site PSE qui est le site de liaison du complexe PTF (Proximal element binding Transcription Factor) (Stunkel *et al.*, 1997 ; Zhao *et al.*, 2001). Ce complexe protéique, également appelé SNAPc ou PBP, est composé de cinq sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) avec des poids moléculaires approximatifs de 190, 50, 45, 43 et 19 kDa. Ces cinq protéines constituent l'activité du facteur de transcription Pol II et Pol III, qu'est PTF (Henry *et al.*, 1998). L'assemblage des facteurs de transcription au niveau du promoteur U6 humain illustre concrètement la façon dont les interactions protéine-protéine et protéine-ADN créent un contrôle de qualité dans la formation des complexes multi-protéiques spécifiques sur l'ADN. En effet, PTF et Oct-1/Staf se lient de concert sur leurs deux sites PSE et DSE séparés spatialement et il est important de noter que les liaisons de ces complexes sur l'ADN sont relativement faibles. Ainsi c'est leur interaction simultanée qui permet leur stabilisation et l'activation de la transcription des gènes contenant un promoteur de type 3.

## 1.4. Le processus de transcription par l'ARN Polymérase III

Le mécanisme de traduction puise la grande majorité de l'énergie d'une cellule et même l'activité de la Pol III est requise. La transcription Pol III se doit donc d'être un processus rapide et efficace. Pour sa compréhension, il est possible de décomposer la transcription en plusieurs étapes. La première est la fixation des facteurs de transcription sur les séquences promotrices, et le recrutement de la Pol III sur l'ADN. La Pol III ainsi en interaction directe avec l'ADN et les facteurs de transcription forme le complexe de pré-initiation (« preinitiation complex » -PIC). L'étape suivante est l'initiation de la transcription avec la dénaturation locale de l'ADN et la formation de la bulle de transcription, puis intervient l'élongation. Enfin, arrivée au terminateur, la Pol III libère le transcrit néosynthétisé.

La formation du complexe de pré-initiation garantit la spécificité des gènes à transcrire et permet le bon positionnement de l'enzyme sur le site d'initiation de la transcription. L'assemblage du complexe peut être décrit comme une succession d'étapes par lesquelles tous les facteurs nécessaires à l'initiation de la transcription, s'associent l'un après l'autre pour recruter la polymérase. Pour tous les gènes, à l'exception du gène de l'ARNr 5S, la première étape du recrutement de la machinerie de transcription est la liaison du facteur TFIIC sur les séquences promotrices des gènes. Chez l'homme comme chez la levure, TFIIC comprend deux domaines, chacun étant impliqué dans l'interaction à l'ADN au niveau des boîtes A et B. Des expériences de mutagenèse des boîtes A et B ont montré que la liaison de TFIIC sur la boîte B est plus stable que celle sur la boîte A (Baker *et al.*, 1987). Néanmoins, la liaison suffisante de TFIIC à la boîte A permet un recrutement et un positionnement correct de TFIIB en amont du site d'initiation de la transcription (Guffanti *et al.*, 2006 ). Des expériences de photo-pontage ont montré que ce très grand facteur peut recouvrir la quasi-totalité d'un gène d'ARNt de petite taille (environ 100 pb) (Bartholomew *et al.*, 1990 ; Braun *et al.*, 1992).

Le recrutement du facteur TFIIC sur les séquences promotrices du gène codant pour l'ARNr 5S nécessite la liaison au préalable du facteur TFIIA. Des expérimentations RMN et l'étude cristallographique démontrent que les doigts de zinc de la région amino-terminale de TFIIA se lient dans le grand sillon de la double hélice d'ADN, au niveau de la boîte C. Cette

liaison constitue environ 95% de l'ancrage du facteur sur le promoteur du gène d'ARNr 5S. Une liaison de plus faible affinité s'établit ensuite entre d'autres doigts de zinc et la boîte A (Nolte *et al.*, 1998). La liaison de TFIIA sur les séquences promotrices du gène de l'ARNr 5S est hautement spécifique mais le complexe TFIIA/ADN est relativement instable (Hanas *et al.*, 1984). L'association du facteur TFIIC à ce complexe a un effet stabilisateur important (Keller *et al.*, 1992).

Le rôle essentiel de TFIIC est le recrutement et la liaison de TFIIB à l'ADN en le positionnant en amont du site d'initiation de la transcription. Ce positionnement est co-dirigé par l'interaction de TFIIB avec des régions en amont du site d'initiation de la transcription. En effet, les régions amont des gènes de classe III ont une influence sur l'efficacité de la transcription et TFIIB, seul, ne peut pas se lier au promoteur sans boîte TATA (promoteur de type 1 et 2). Mais TFIIB peut également se lier à l'ADN directement grâce à l'affinité de la TBP pour la boîte TATA dans le cas des promoteurs de gènes de classe III ayant cette séquence spécifique. Il a été démontré que la transcription par la Pol III était altérée par une mutation dans cette séquence mais pouvait être restaurée par un mutant de TBP se liant à cette boîte mutée (Strubin et Struhl 1992). La liaison de TFIIB provoque une courbure de l'ADN entre le site de fixation du complexe et le site d'initiation de la transcription. Cette conformation particulière expliquerait la très grande stabilité du complexe (Grove *et al.*, 1999). Ces propriétés mécaniques de TFIIB sur un promoteur muni d'une boîte TATA peuvent sans doute être appliquées aux promoteurs de type 1 et 2 en général.

Enfin, TFIIB en recrutant la Pol III, termine la mise en place de la machinerie transcriptionnelle. Ce sont les interactions entre les sous-unités de TFIIC et celles de la Pol III qui permettent le bon positionnement de la Pol III au site d'initiation de la transcription. (Werner *et al.*, 1993 ; Khoo *et al.*, 1994 ; Andrau *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1997 ; Ferri *et al.*, 2000). Le sous-complexe ternaire C82, C34, C31, identifié et caractérisé initialement chez *S. cerevisiae*, est particulièrement important pour la reconnaissance spécifique de l'assemblage des facteurs liés à l'ADN (Werner *et al.*, 1992 ; Thuillier *et al.*, 1995). Chez l'homme, la sous-unité orthologue à C34 (RPC39) interagit également avec l'orthologue de Brf1, mais aussi avec TBP. Ces interactions pourraient faciliter le recrutement de la Pol III sur le complexe de pré-initiation et stabiliser celui-ci. Sachant que TFIIC semble lié au promoteur intragénique au cours de l'élongation (Ruet *et al.*, 1984 ; Jahn *et al.*, 1987), il est intéressant de penser que le maintien de la fixation de TFIIC sur les promoteurs, permettrait

le recyclage rapide de la Pol III après chaque synthèse ARN et une ré-initiation efficace de la transcription.

Ainsi, la liaison à l'ADN des facteurs reconnaissant les séquences promotrices des gènes de classe III permet l'initiation de la transcription par la Pol III. L'initiation de la transcription aux sites spécifiques n'intervient qu'après l'assemblage du complexe de pré-initiation. Le recrutement de la Pol III par le complexe formé par l'ADN et les facteurs conduit au complexe de pré-initiation dit fermé, en raison de la double hélice ADN pas encore séparée. La dénaturation de l'ADN du site de démarrage de la transcription n'est pas encore élucidée mais des données au sein du laboratoire laissent présager l'intervention de complexe ternaire de la Pol III chez l'homme. Après ouverture de double brin d'ADN et la formation de la fourche de transcription, la Pol III synthétise les premières liaisons phosphodiester du brin ARN par complémentarité du brin ADN matrice. La bulle de transcription formée s'étend jusqu'à 22 paires de bases autour du site d'initiation (Kassavetis *et al.*, 1990 ; Kassavetis *et al.*, 1992a). Il a été démontré la formation de deux ou trois ARN abortifs de quelques nucléotides avant une étape d'élongation complète pour la synthèse du transcrite (Bhargava et Kassavetis 1999). L'ARN Pol III rencontre le facteur TFIIC qui occupe la région transcrite lors de cette phase d'élongation, mais de façon surprenante la progression de l'enzyme n'est ni arrêtée ni ralentie sur cette région (Bardeleben *et al.*, 1994 ; Matsuzaki *et al.*, 1994). De plus, le facteur TFIIC n'est pas libéré malgré le passage de la Pol III, et reste fixé à l'ADN.

Que ce soit chez *S. cerevisiae* ou chez l'homme, la Pol III reconnaît très efficacement le signal de terminaison de la transcription et ne nécessite aucun facteur additionnel (Cozzarelli *et al.*, 1983). Néanmoins chez l'homme, il a été démontré que la protéine NF1 pouvait contribuer à la terminaison ainsi qu'à la ré-initiation de la transcription par la Pol III du gène VA1 (Wang *et al.*, 2000). Le signal de terminaison consiste en une répétition de plusieurs thymines (4 à 5 suffisent) qui provoque une pause importante de l'enzyme entraînant ainsi la dissociation de la Pol III et de l'ADN ce qui libère également le transcrite (Matsuzaki *et al.*, 1994 ; Richard et Manley 2009). De façon intéressante, après le premier cycle de transcription l'enzyme n'est pas libérée et permet la ré-initiation sur ce même gène (Dieci et Sentenac 1996 ; Landrieux *et al.*, 2006 ; Cabart *et al.*, 2008). Ainsi la Pol III est recyclée efficacement après la libération du transcrite néosynthétisé. De plus la transcription après ré-initiation s'avère beaucoup plus rapide. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la plupart des transcrits Pol III sont courts et que les facteurs de transcription, toujours

fixés aux séquences promotrices, courbent l'ADN, et maintiennent la Pol III toujours à proximité du site d'initiation (Ferrari *et al.*, 2004 ). Et il a également été décrit que le facteur de transcription TFIIB reste en contact de la Pol III même pendant l'élongation (Kassavetis *et al.*, 1992a).

Il a été décrit ici que la transcription par la Pol III était mécanisme séquentiel. Mais la mise en évidence d'une ré-initiation rapide et efficace, ou encore la capacité d'élongation malgré la présence de TFIIC sur l'ADN, laisse supposer l'existence d'une holoenzyme Pol III. Il n'est pas exclu qu'un complexe renferme l'intégralité de la machinerie de transcription Pol III pré-assemblée. Notamment, l'existence de complexes préformés en absence d'interaction avec l'ADN a été relevée pour la Pol III (Wingender *et al.*, 1986 ; Wang et Roeder 1997).

### **1.5. Les constituants de l'ARN Polymérase III**

L'expression du patrimoine génétique étant essentielle à la vie, les organismes les plus primitifs disposent d'une machinerie de transcription. Mais contrairement aux cellules eucaryotes, les procaryotes ne présentent qu'une seule enzyme portant l'activité de transcription. Ainsi, l'ARN polymérase bactérienne a une composition relativement simple avec un noyau catalytique de base constitué de deux sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$ , la protéine  $\omega$  et un dimère  $\alpha 2$  ( $\alpha 2\beta\beta'\omega$ ). Le facteur  $\sigma$  s'ajoute au complexe permettant l'initiation spécifique de la transcription (Ishihama 1981).

Les études menées chez les procaryotes et les eucaryotes unicellulaires ont abouti à la détermination des structures cristallographique de l'ARN polymérase de *Thermophilus aquaticus* (Zhang *et al.*, 1999) et de 10 des 12 sous-unités de l'ARN polymérase II de la levure *S. cerevisiae* (Cramer *et al.*, 2001 ). Les résultats obtenus ont permis de constater des similitudes structurelles déjà supposées grâce aux homologues de séquences (Archambault et Friesen 1993 ; Ebright 2000). La comparaison des deux structures a révélé une très forte conservation du complexe qui place les sous-unités homologues aux mêmes positions (Geiduschek et Kassavetis 2001).



Pour les eucaryotes, ce sont donc trois enzymes, les ARN polymérases I, II et III qui synthétisent l'ARN lors de la transcription de l'ADN des gènes. Les données les plus détaillées sur ces complexes enzymatiques chez les eucaryotes sont disponibles chez la levure *S. cerevisiae*. La taille et la complexité des polymérases augmentent de la Pol II (12 unités, 514 kDa) à la Pol I (14 unités, 588 kDa) puis à la Pol III (17 unités, 693 kDa). Là encore, de la levure *S. cerevisiae* à l'homme, la Pol III composée de 17 sous-unités, est très conservée. De plus, les protéines entrant dans la composition des trois ARN polymérases démontrent une évolution, et une complexification, du mécanisme de transcription à partir du système primitif.

Gènes	Protéines	Orthologues chez <i>S. cerevisiae</i>	Masse	Position/Fonction
POLR3A	RPC1	C160	155,4 KDa	noyau catalytique
POLR3B	RPC2	C128	127,6 KDa	
POLR3K	RPC10 / RPC11	C11	12,5 KDa	
POLR1C	RPAC1 / RPA5 / RPA39	AC40	40 KDa	
POLR1D	RPAC2 / RPA9 / RPA16	AC19	16 KDa	
POLR2E	RPABC1 / RPB5 / RPB25	Rpb5 (ABC27)	23 KDa	
POLR2F	RPABC2 / RPB6 / RPB14	Rpb6 (ABC23)	14,4 KDa	
POLR2H	RPABC3 / RPB8 / RPB17	Rpb8 (ABC14.5)	17,1 KDa	
POLR2L	RPABC4 / RPB10	Rpb10 (ABC10 $\alpha$ )	7,6 KDa	
POLR2K	RPABC5 / RPB12	Rpb12 (ABC10 $\beta$ )	7 KDa	
/	RPC9	C17	18,6 KDa	
POLR3H	RPC8	C25	22,9 KDa	
POLR3E	RPC5	C37	80 KDa	hétérodimère
POLR3D	RPC4 / BN51 / RPC53	C53	47 KDa	
POLR3C	RPC3 / RPC62	C82	62 KDa	complexe ternaire
POLR3F	RPC6 / RPC39	C34	39 KDa	
POLR3G	RPC7 / RPC32	C31	32 KDa	

Tableau 1 : Récapitulatif des sous-unités composant l'ARN polymérase III humaine.

Parmi les sous-unités de la Pol III, cinq (codées par les gènes POLR2E, POLR2F, POLR2H, POLR2L et POLR2K) sont communes aux trois polymérases, deux (codées par POLR1C et POLR1D) sont partagées par la Pol I et la Pol III (mais il est important de noter l'existence de sous-unités paralogues dans la Pol II) et cinq (POLR3A, POLR3B, POLR3H, RPC9 et POLR3K) ont des paralogues dans les Pol I et Pol II. Chez la levure les sous unités C17/C25 entrant dans la composition de la Pol III remplacent le sous-complexe RPB4/RPB7 de la Pol II. Ce sous-complexe C17/C25 forme une tige qui dépasse du noyau de la polymérase, et qui est impliqué dans l'initiation de la transcription via la reconnaissance des facteurs de transcription fixés au promoteur (Jasiak *et al.*, 2006). Les cinq dernières sous-unités (POLR3E, POLR3D, POLR3C, POLR3F et POLR3G) sont spécifiques à l'ARN polymérase III et aucun homologue structurel ou fonctionnel n'a été identifié dans les Pol I ou



Pol II (Hu *et al.*, 2002). Cependant, il est semble désormais évident que certaines de ces sous-unités partagent des homologies structurelles, et peut-être de fonction, avec des facteurs de transcription du système Pol II (Kassavetis *et al.*, 2010 ; Carter et Drouin 2010 ; Lefèvre *et al.*, 2011).

Trois des cinq sous-unités spécifiques de la Pol III (POLR3C, POLR3F, POLR3G) forment le sous complexe ternaire. Il a été montré dans la levure *S. cerevisiae* que les sous-unités RPC31, RPC34 et RPC82 (orthologues respectivement des protéines RPC32, RPC39 et RPC62 humaines) pouvaient être séparées des autres sous-unités de la Pol III par gel d'électrophorèse en condition native (Valenzuela *et al.*, 1976a ; Valenzuela *et al.*, 1976b). Ainsi il a été démontré que ce sous-complexe sert de pont entre les sous-unité catalytique de la Pol III et les facteurs d'initiation (Werner *et al.*, 1993 ; Brun *et al.*, 1997).

De plus, d'autres études ont révélé que le sous-complexe ternaire humain (RPC62, RPC39 et RPC32) peut être dissocié des 14 autres sous-unités de la Pol III par ultracentrifugation ou par traitement avec un dénaturant léger (2 M d'urée) (Wang et Roeder 1997). La Pol III humaine dépourvue de ce complexe ternaire est incapable d'effectuer une étape d'initiation de la transcription spécifique aux promoteurs Pol III, ce qui indique que ce sous-complexe doit être particulièrement important pour les interactions entre les facteurs de transcriptions et le corps catalytique de la polymérase lors de l'initiation. Néanmoins la Pol III sans les sous-unités RPC62, RPC39 et RPC32 reste capable de réaliser l'élongation de la transcription suite à une initiation non spécifique. Mais il faut noter également que l'activité d'élongation de cette Pol III tronquée a significativement été réduite, ce qui suggère que le complexe ternaire peut également être impliqué lors de l'élongation de la transcription (Wang et Roeder 1997). Des approches biochimiques ont pu identifier des interactions *in vitro* entre TFIIC63 et RPC62, TFIIC90 et RPC62, et entre TFIIC90 et RPC39, (Hsieh *et al.*, 1999a ; Hsieh *et al.*, 1999b).

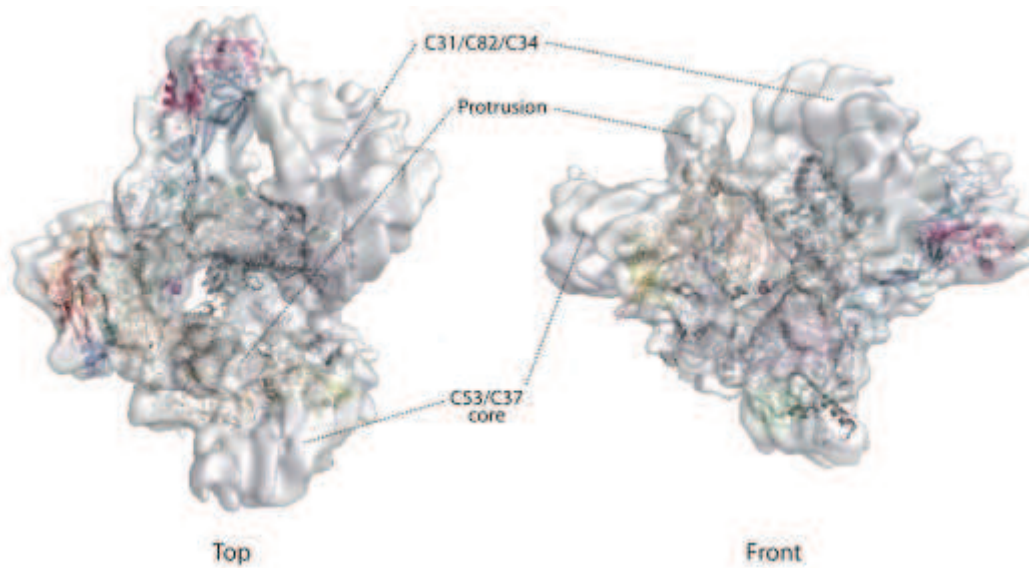


Figure 3 : Reconstitution de l'ARN polymérase III chez *S. cerevisiae* par microscopie électronique. Issue de la publication Fernandez-Tornero *et al.*, 2010

Les deux autres sous-unités spécifiques de la Pol III RPC53 et RPC37 forment un hétérodimère. Celui-ci est important pour la reconnaissance de la terminaison de transcription et en collaboration avec RPC11, ces trois sous-unités jouent également un rôle clé dans la ré-initiation facilitée (Landrieux *et al.*, 2006).

La structure cristallographique de la Pol III n'a pas encore été déterminée. La première et la seule sous-unité spécifique de la Pol III à être résolue est RPC62 (Lefèvre *et al.*, 2011). Néanmoins, grâce aux similitudes de séquences des sous-unités composant les différentes ARN polymérases et à l'aide des interactions protéiques décrites au sein de la Pol III, il a été établi un modèle tridimensionnel de l'ARN polymérase III de *S. cerevisiae* (Geiduschek et Kassavetis 2001). Plus récemment, la reconstruction par microscopie électronique de la Pol chez la levure a été réalisée (Fernandez-Tornero *et al.*, 2007 ; Fernandez-Tornero *et al.*, 2011), apportant encore plus d'information sur l'agencement dans la structure, de chaque sous-unité du complexe.

## II. LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION POL III

La croissance d'un organe et/ou d'un organisme nécessite une coordination parfaite entre les mécanismes de croissance cellulaire et ceux de la division cellulaire. Ainsi leur dérégulation peut entraîner le déclenchement de maladies graves par une instabilité génomique ou une accélération de la croissance comme observé lors de la formation de tumeurs. Ce qui explique le fait que ces mécanismes sont finement régulés. La régulation a lieu principalement au niveau de l'expression de l'information génétique et est réalisée de différentes façons notamment au cours de la transcription. Certaines de ces régulations s'effectuent en modifiant l'accessibilité des gènes par remaniment de la chromatine, d'autres requièrent directement l'action de protéines à différentes étapes de la transcription par liaison à l'ADN, ou en interagissant avec les facteurs de transcription Pol III.

### 2.1. Régulation épigénétique et chromatinienne

La chromatine se compose de l'ADN, chargé négativement et des histones qui sont des protéines riches en acides aminés chargés positivement (lysine et arginine). Il existe cinq types d'histones et quatre (H2A, H2B, H3 et H4) forment un octamère constitué de deux molécules de chacun d'entre eux. Autour de ce noyau protéique s'enroulent 146 pb d'ADN formant la structure élémentaire de la chromatine, le nucléosome. Une série de nucléosomes, séparés par environ 50 pb s'apparente à un « collier de perles » (beads on a string). La chromatine est présente sous deux états en formant l'euchromatine ou l'hétérochromatine. En effet, les nucléosomes peuvent être articulés entre eux avec les histones H1 dit « de lien » dans une structure plus compacte qui peut ensuite être encore repliée et produire une fibre de chromatine de 30nm de diamètre appelée hétérochromatine. Ces structures empêchent l'accessibilité des séquences ADN promotrices par les facteurs de transcription et les ARN polymérases. Les histones y sont alors hypoacétylées (Strahl et Allis 2000). Inversement dans l'euchromatine, les histones H3 sont hyperacétylées, notamment par l'acétyltransférase GCN5 (Kenneth *et al.*, 2007 ), ce qui a pour effet de décompacter les nucléosomes et de permettre l'accessibilité à l'ADN pour l'expression des gènes. Ainsi, la structure chromatinienne, en fonction de son état de compaction régule l'expression génétique. La transcription Pol II est associée à des modifications d'histones qui ont également été montrées comme influençant la transcription Pol III (Barski *et al.*, 2010 ; Oler *et al.*, 2010 ; Moqtaderi *et al.*, 2010).

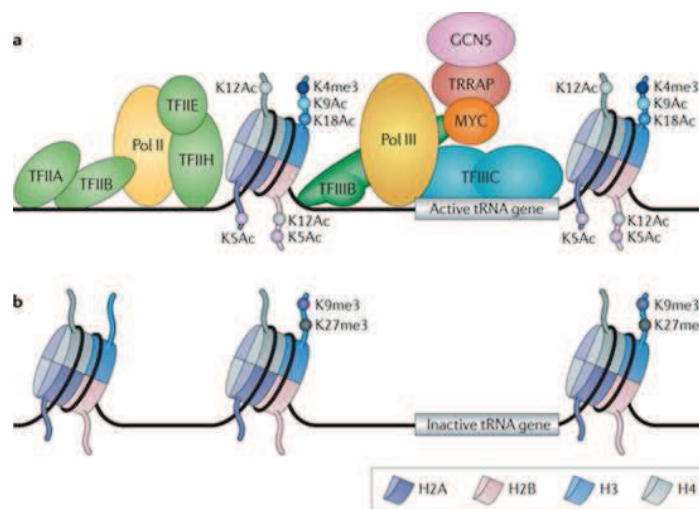


Figure 4 : Représentation schématique de la régulation chromatinienne de la transcription Pol III. Issue de la publication de White 2011.

Ces études récentes menées par « ChIP sequencing » (Chromatine Immuno Precipitation) ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la présence de la Pol III et l'état de méthylation des histones dans les régions promotrices Pol III (Barski *et al.*, 2010). Ainsi la prévalence de la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est plus importante pour les gènes de classe III actifs que pour les gènes inactifs, ce qui était déjà observé pour les gènes transcrits par la Pol II. De plus, cette régulation est confirmée par la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 qui, comme pour les gènes de classe II, devient une marque de l'inactivité transcriptionnelle des gènes transcrit par la Pol III. Les conclusions des investigations menées sur les modifications épigénétiques corrélées à l'activité de la Pol III, sont similaires à ce qui était déjà connu pour l'activité de la Pol II. Outre ce contrôle épigénétique, l'activité de l'ARN Polymérase III est également régulée en fonction de différents stimuli qui sont transmis par des voies de signalisation jusqu'à la machinerie de transcription Pol III.

## 2.2. Les régulateurs de la transcription Pol III

De nombreux facteurs et mécanismes permettant la régulation de la transcription de l'ARN polymérase III ont été identifiés par les études menées chez la levure *S. cerevisiae*. Cet organisme unicellulaire adapte son expression génique à travers les trois ARN polymérases en fonction des conditions environnementales. Des conditions de croissance favorables amènent un niveau élevé de la transcription, alors que le manque des nutriments conduit à la répression

de celle-ci. Certaines des voies impliquées dans la régulation de la transcription Pol III chez la levure sont parfois conservées chez l'être humain. Il s'agit notamment de la voie de signalisation de sécrétion (Li *et al.*, 2000), la voie TOR (Target Of Rapamycin) (Zaragoza *et al.*, 1998 ; Wei *et al.*, 2009 ; Tsang *et al.*, 2010), la voie de PKA (un effecteur en aval de la voie RAS/AMPC) (Moir *et al.* 2006) et les voies de dommages à l'ADN.

L'interruption de la voie de sécrétion des protéines que ce soit lors de l'intégration des peptides dans le réticulum endoplasmique (RE) ou lors la fusion des vésicules de sécrétion, induit la répression de la transcription des gènes d'ARN ribosomiaux de classe I et des gènes codants pour les protéines ribosomiales (Mizuta et Warner 1994). Mais un défaut dans la voie sécrétoire conduit également à la répression de la transcription de l'ARN 5S et des ARNt (Li *et al.*, 2000). Des mutations dans des gènes codants pour des composants du RE ou de l'appareil de Golgi, ou étant impliqués dans le trafic des protéines et des vésicules entre les RE et l'appareil de Golgi, mènent également à la répression de la transcription Pol III. Cette répression peut être partiellement empêchée par la suppression de la protéine kinase C (PKC1) (Willis *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2000). PCK1 est la kinase effectrice centrale de la voie de maintien de l'intégrité de la cellule. Cette voie est donc activée lors de perturbations dans la voie de sécrétion mais aussi par un grand nombre d'effecteurs comme le régulateur du cycle cellulaire Cdc28, des hormones sexuelles, des stress de température ou d'osmolarité. De plus, il a été mis en évidence le rôle direct de PKC1 dans la répression transcriptionnelle des différents composants du ribosome et des ARNt (Nierras et Warner 1999). Il est important de noter que la déplétion du gène codant pour la protéine MAF1 enlève la répression de la transcription Pol III induit par un défaut dans la voie de sécrétion, (Upadhyya *et al.*, 2002), ce qui laisse envisager la possibilité que MAF1 joue un rôle en aval de la PKC1 dans la régulation de la voie de sécrétion.

MAF1 a aussi été identifié comme un effecteur en aval de la voie TOR lors de la répression de la transcription la Pol III. Ainsi, la carence en nutriment, le traitement à la rapamycine, le stress oxydatif ou encore un défaut de la voie de sécrétion, qui causent une inhibition de l'activité Pol III, se sont avérés être dépendant de MAF1 (Ciesla et Boguta 2008). Ceci suggère que beaucoup des signaux de répression de la transcription Pol III chez la levure convergent à travers MAF1. Dans des conditions de croissance favorables, SHC9 et la protéine kinase A phosphorylent MAF1 ce qui maintient la protéine dans le cytoplasme. Dans des conditions de croissance défavorables, MAF1 est déphosphorylée par la protéine

phosphatase 2A (PP2A), conduisant à sa translocation dans le noyau où elle inhibe la transcription Pol III principalement à travers ses interactions directes avec BRF1 et la Pol III (Oficjalska-Pham *et al.*, 2006 ; Roberts *et al.*, 2006 ; Vannini *et al.*, 2010). MAF1 est conservé entre la levure et l'homme (Pluta *et al.*, 2001) et plus que la protéine, c'est son mécanisme de régulation qui a été conservé (Reina *et al.*, 2006 ; Rollins *et al.*, 2007).

Ainsi chez l'homme, durant le cycle cellulaire, l'activité transcriptionnelle est également fortement régulée. La transcription nucléaire est réprimée lors de l'étape de mitose pour limiter les perturbations entre les deux mécanismes distincts que sont la réplication de l'ADN et la transcription. Dans des extraits obtenus à partir de cellules HeLa, il a été démontré l'absence d'activité TFIIB dans des cellules en phase M (White *et al.*, 1995). Cette inhibition est régulée par un jeu de kinases mitotiques qui entraîne une hyper-phosphorylation de Brf1, et par la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui s'oppose ainsi à la répression de la transcription Pol III (Fairley *et al.*, 2003). De plus, le facteur Bdp1 est également phosphorylé et cette phosphorylation est maximale en mitose (Hu *et al.*, 2004). La répression se ferait donc via la phosphorylation de Brf1 et Bdp1 qui déstabiliserait le complexe TFIIB, ce qui empêcherait le recrutement de la Pol III.

La caséine kinase II (CK2) pourrait notamment intervenir dans la répression de la transcription Pol III. Dans les cellules humaines HeLa notamment, il est détecté la protéine CK2 lors de la purification de la Pol III (Hu *et al.*, 2003). CK2 phosphoryle spécifiquement la sous-unité Bdp1 (Hu *et al.*, 2004) et également la sous-unité Brf1 (Johnston *et al.*, 2002) ce qui contribue à la répression transcriptionnelle en mitose. De façon surprenante, l'inhibition de CK2 dans des extraits de cellules en phase M restaure la transcription par la Pol III, tandis que son inhibition dans des extraits actifs de phase S abolit la transcription (Hu *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter également que d'autres protéines de la machinerie Pol III sont également phosphorylées lors de la mitose : RPC5, RPC32 et RPC62 ; Brf2 ; TFIIC220 et TFIIC110 ; PTF $\alpha$ . (Dephore *et al.*, 2008 ).

Enfin, lors de dommage à l'ADN, les transcriptions par les Pol I et III sont réprimées (Ghavidel et Schultz 2001). Ces dommages entraînent une réponse cellulaire comprenant entre autres un arrêt du cycle cellulaire jusqu'à réparation de la molécule d'ADN. Une protéine présente chez l'homme « PC4 » et qui trouve un orthologue chez la levure « Sub1 », se lie à l'ADN par un domaine conservé et est impliquée dans différents processus ADN



dépendant, comme la réplication, la transcription mais également la réparation de l'ADN (Ge *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 2004 ; Mortusewicz *et al.*, 2008 ). Sub1 et PC4 sont des protéines associées à la chromatine et initialement décrites comme co-activateur de la transcription de la Pol II *in vitro* (Henry *et al.*, 1996 ).

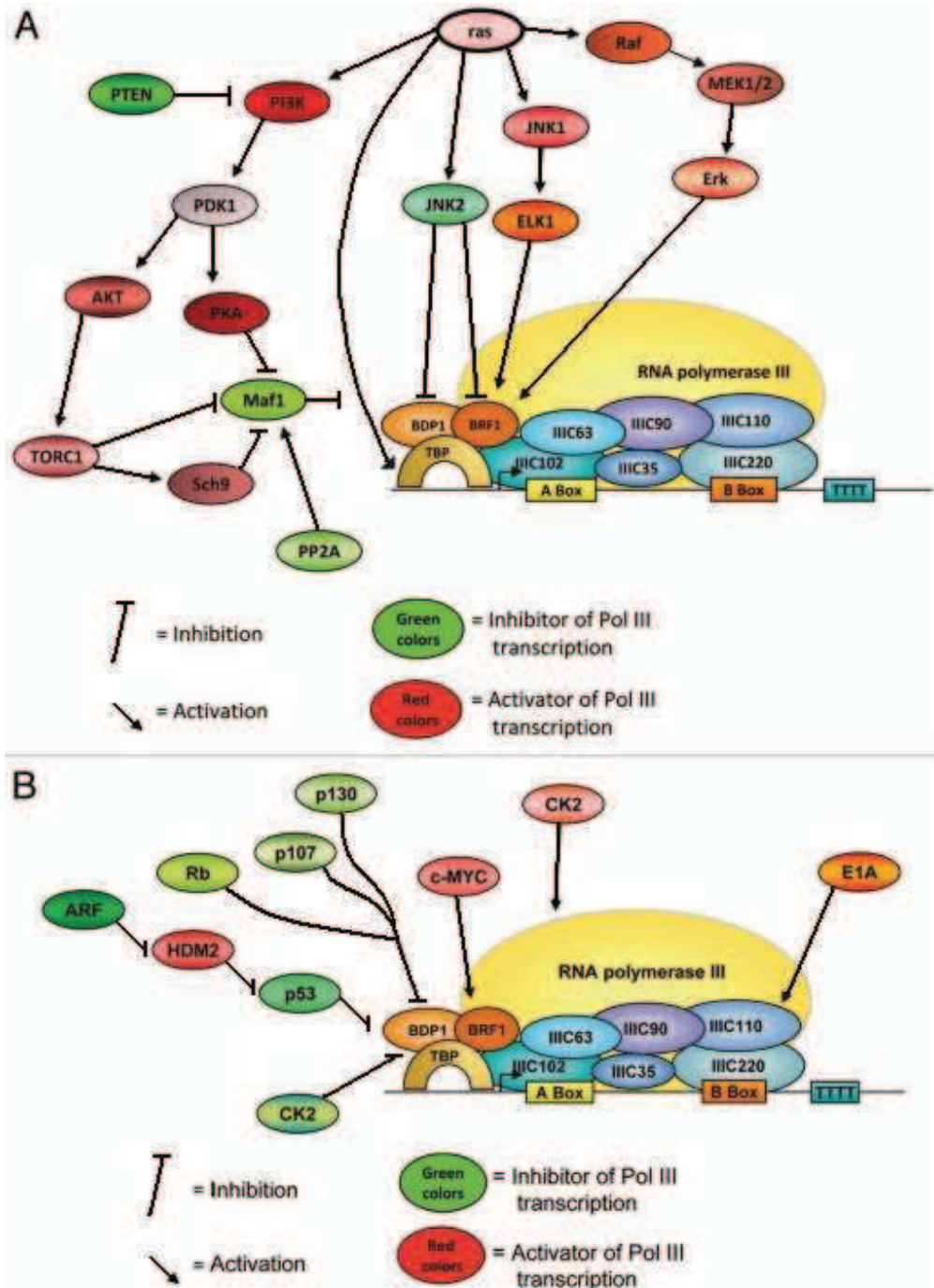


Figure 5 : Représentation schématique de plusieurs voies de régulation de la transcription de l'ARN polymérase III (A) voies dépendantes de Ras. (B) voies dépendantes de protéines suppresseurs de tumeurs et oncogènes. Issue de la publication de Dumay-Odelot *et al.*, 2010

Récemment, des études ont montré que le rôle de Sub1 n'est pas limité à la transcription Pol II chez la levure, mais est également impliqué dans la transcription Pol III (Tavenet *et al.*, 2009 ) mettant ainsi en évidence une fonction plus générale dans la régulation de la transcription. De plus, PC4 et Sub1 qui interagissent avec des éléments de la machinerie Pol III (TFIIIB et TFIIC), semblent jouer un rôle bivalent, positif et négatif, complexes dans l'expression des gènes. Elles ont des effets sur les multiples étapes de la transcription de l'initiation à la terminaison, et à la ré-initiation (Knaus *et al.*, 1996 ; Wang et Roeder 1998 ; Das *et al.*, 2006 ; Tavenet *et al.*, 2009 ).

La liste des régulateurs de la transcription Pol III présentée est loin d'être exhaustive. Ainsi, d'autres régulateurs sont connus, notamment pour leurs fonctions lors de développement de tumeurs.



### III. LA TRANSCRIPTION PAR LA POL III ET LE CANCER

#### 3.1. Dérégulation de la transcription Pol III lors des cancers

Il a été mis en évidence une corrélation évidente entre l'efficacité de la transcription réalisée par les Pol I et Pol III et la prolifération cellulaire (pour revue White 2005 ; White 2008 ; Marshall 2008 ; Dumay-Odelot *et al.*, 2010). Il a même été démontré la causalité directe entre la surexpression BRF1, qui augmente l'activité transcriptionnelle de la Pol III, et l'immortalisation de fibroblaste, notamment murin (Marshall *et al.*, 2008). C'est au travers des voies de signalisation oncogénique dont Ras, Raf, la PI3-K et Akt, que la régulation est effectuée. Ces voies modifient l'état de phosphorylation des machineries transcriptionnelles. Grâce à l'activation de ces MAP kinases (Mitogen-Activated-Protein), la transcription réalisée par la Pol III mais également par la Pol I, est stimulée (Stefanovsky *et al.*, 2001 ; Felton-Edkins *et al.*, 2003a ; Zhao *et al.*, 2003). Une de ces MAP kinase est la protéine Erk (Extracellular signal-Regulated Kinase), dont l'une des cibles est la protéine Brf1. La phosphorylation de Brf1 par Erk est impliquée dans la stabilisation des interactions entre TFIIB et TFIIC2 mais aussi entre TFIIB et la Pol III (Felton-Edkins *et al.*, 2003a).

L'oncogène c-MYC régule également la transcription Pol III. La protéine c-Myc connue pour son implication de la transcription Pol II, stimule également la transcription Pol III par le recrutement de l'acétyltransférase GCN5 et le co-facteur TRRAP, qui acétyle l'histone H3 et maintient ainsi la chromatine active (Kenneth *et al.*, 2007). Ce facteur c-Myc est impliqué dans un nombre important de processus biologiques tels que la division, la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'immortalisation et l'angiogenèse. De plus, l'interaction directe entre c-Myc et Brf1 permet aussi un recrutement efficace de la Pol III par TFIIB sur les promoteurs des gènes de classe III actifs. Ainsi, il a été montré que l'induction de la croissance tumorale par c-Myc est dépendante d'un fonctionnement normale de la Pol III (Johnson *et al.*, 2008).

Les cellules des mammifères disposent d'inhibiteurs des processus de croissance et de prolifération, dont deux puissants suppresseurs de tumeur que sont pRb et p53. Ces protéines ont des effets importants sur la régulation de la croissance et répriment en particulier les transcriptions Pol I et III (Felton-Edkins *et al.*, 2003b). Ces suppresseurs de tumeurs, sont

connus pour avoir leurs activités compromises dans une proportion élevée de tumeurs malignes. pRb réprime *in vitro* la transcription Pol III par interaction avec TFIIB. Cette interaction suffit pour l'inhibition, car TFIIB ainsi capté n'est plus capable d'interagir avec TFIIC et la Pol III (Chu *et al.*, 1997 ; Sutcliffe *et al.*, 2000). C'est l'état de phosphorylation de pRb qui détermine son association avec TFIIB, phosphorylée cette interaction n'a pas lieu. La voie RAS active les différents pairs de cyclines et kinases cycline-dépendantes (CDKs), notamment les cyclines D et CDK4/6, permettant la phosphorylation de pRb et stimule ainsi la transcription Pol III (Scott *et al.*, 2001 ). Lors de cancers, il est constaté l'altération de l'activité de pRb à cause de mutations, d'hyperphosphorylation ou de séquestration de la protéine (Felton-Edkins *et al.*, 2003b).

La protéine p53 est connue pour initier des processus se conduisant à l'apoptose ou à l'arrêt de la croissance et du cycle cellulaire. A l'instar de pRb, elle peut également se complexer à TFIIB et empêcher ainsi le recrutement de ce dernier aux promoteurs des gènes transcrits par la Pol III, ce qui réprimerait alors leurs expressions (Crighton *et al.*, 2003). p53 semble inhiber l'assemblage de la machinerie mais serait inefficace sur le complexe d'initiation pré-assemblé (Cairns et White 1998). La dérégulation de l'activité p53, associée à la dérégulation de pRb, peut expliquer l'augmentation de l'activité de transcription de la Pol III dans des cellules tumorales.

La protéine PTEN inhibe également la transcription Pol III grâce à sa capacité à inhiber la voie de signalisation de la PI3 Kinase qui mène à la dissociation du complexe TFIIB (Woiwode *et al.*, 2008). L'inhibition de la voie PI3-K est un moyen pour la cellule de contrôler une voie de signalisation majeur dans l'apparition et la survie des cellules cancéreuses. Ainsi dans de nombreux cancers l'expression des ARNt et de l'ARN 7SL augmentent nettement en l'absence de l'activité de PTEN ou lors de sur-activation de la voie PI3-K. Ainsi, il semble important de noter également que TFIIB apparait comme étant un élément clé de la régulation de la transcription Pol III. Empêtré dans un système d'interactions multiples et complexes, TFIIB tend vers un état plus actif dans la plupart des cancers, victime de ce réseau qui est probablement dérégulé.

Enfin, les virus oncogéniques (le virus Epstein-Barr, le virus de l'hépatite B, le virus HTLV-1 ou encore le virus SV40), stimulent la transcription réalisée par la Pol III par l'augmentation des niveaux d'expression de facteurs de transcription spécifique à la

polymérase, comme TFIIC, TBP, Brf1 ou Bdp1 (Wang *et al.*, 1997 ; Larminie *et al.*, 1999 ; Winter *et al.*, 2000 ; Felton-Edkins et White 2002 ). Un certain nombre de ces facteurs sont également connus pour être importants dans le contrôle transcriptionnel des gènes viraux. Autres exemples, les onco-protéines E6 et E7 du Papillomavirus humain peut stimuler la transcription Pol III par inactivation de p53 et séquestration de la famille de protéines Rb. Enfin, certaines autres protéines virales oncogènes activent aussi directement la transcription Pol III comme, in vitro, la protéine Tax du virus HTLV-1 (Gottesfeld *et al.*, 1996).

### **3.2. L'existence de l'ARN Polymérase III Alpha et de l'ARN polymérase III Beta**

Récemment, au sein du laboratoire du Pr. Teichmann deux isoformes distinctes de l'ARN polymérase III ont pu être caractérisées chez l'homme (Haurie *et al.*, 2010 ). Cette découverte est issue d'une recherche *in silico* qui a permis d'identifier la sous-unité RPC32 $\beta$ , un paralogue, de la sous unité RPC32 précédemment décrite dans la Pol III (Wang *et al.*, 1997 ; Hu *et al.*, 2002) et désormais appelée RPC32 $\alpha$ . Ces deux paralogues n'apparaissent au cours de l'évolution que chez les vertébrés. Les deux isoenzymes sont donc définies par la présence de RPC32 $\alpha$  (codée par le gène POLR3G) dans la composition de la Pol III $\alpha$  ou de RPC32 $\beta$  (codée par le gène POLR3GL) dans la Pol III $\beta$ .

En analysant le profil de migration de ces deux complexes enzymatiques, il semble que leur composition ne diffère que par les deux sous unités homologues de RPC32 uniquement. De plus, il est très probable que les deux isoformes isolées dans les cellules humaines soient les orthologues des deux isoformes Pol III relevées précédemment dans les cellules de myélome de souris. En effet, la purification de la Pol III à partir de cellules de myélome de souris (MOPC 315) a conduit à l'identification par chromatographie de deux enzymes distinctes (Pol IIIA et Pol IIIB) qui sont toutes deux actives pour la transcription des gènes de classe III (Schwartz *et al.*, 1974 ). La détermination de la composition de ces enzymes a mis en évidence qu'elles sont extrêmement proches et ne diffèrent que par la présence soit d'un polypeptide de 32 kDa (Alpha) ou un 33 kDa (Beta) (Sklar et Roeder 1976).

Malgré une séquence primaire des gènes POLR3G et POLR3GL chez l'homme relativement différente, l'alignement des séquences polypeptidiques des protéines RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  révèle la conservation de nombreux domaines. Ceci dénote vraisemblablement des caractéristiques structurelles et fonctionnelles proches. Localisées toutes deux principalement dans le noyau, les deux formes de Pol III humaines sont notamment actives pour la transcription des différents types connus de promoteur Pol III *in vitro*.

RPC32 $\alpha$	1	MA---GNKGRGRAAYTFNIEAVGFSKGEKLPDVVLKPPPLFPD TDYKPVP	47
		MA G +GRGR TFN+EAVG KG+ LP L+P PLFP +++PVP	
RPC32 $\beta$	1	MASRGGGRGRGRGQLTFNVEAVGIGKGDALPPPTLQPSPLFPPLFRPVP	50
RPC32 $\alpha$	48	LKTGEGEEYMLALKQELRE TMKRMPYF IETPEERQDIERYSKRYMKV---	94
		L +GE EY+LALKQELR M+++PYFI ++D+ERYS +Y	
RPC32 $\beta$	51	LPSGEEGEYVLALKQELRGAMRQLPYFIRPAVPKRDVERYSDKYQMSGPI	100
RPC32 $\alpha$	95	-YKEEWIPDWRRLPREMPR-NKCKKAGPKPKKAKDAGKGTPLTNTEDVL	142
		+W PDWRRLPRE+ R K +K K K T + E+ +	
RPC32 $\beta$	101	DNAIDWNPDWRRLPRELKIRVRKLQKERITILLPKRPPKTT--EDKEETI	148
RPC32 $\alpha$	143	KKMEELEKRGDGEKSDEENEEKEGSKEKSKEGDDDDDDAAEQEEYDEEE	192
		+K+E+LEK+ + E + EE+EEKE +EK +E E+EEYDEEE	
RPC32 $\beta$	149	QKLETLEKK-EEEVTSEEDEEKEEEEEKEEE-----EEEEYDEEE	187
RPC32 $\alpha$	193	QEEENDYINSYFEDGDDFGADSDDNMDEATY	223
		EEE DYI SYF++G+DFG DSDDNMDEA Y	
RPC32 $\beta$	188	HEEETDYIMS YFDNGEDFGGSDDNMDEAIY	218

Figure 6 : Alignement des séquences polypeptidique des homologues RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  chez l'homme.

Néanmoins, l'étude comparative de ces deux sous unités RPC32 paralogues a mis en évidence qu'elles ne sont pas équivalentes sur le plan fonctionnel. Ainsi RPC32 $\beta$  est exprimé dans tous les tissus analysés ce qui n'est pas le cas de RPC32 $\alpha$  qui montre un profil d'expression restreint en se retrouvant principalement dans les cellules souches embryonnaires humaines indifférenciées et dans des cellules transformées. Il a également été démontré qu'au cours de la différenciation induite de cellules embryonnaire H1, le niveau d'expression de RPC32 $\beta$  restait constant, contrairement à l'expression de RPC32 $\alpha$  qui diminuait fortement. De plus, alors que l'inhibition d'expression RPC32 $\beta$  par siARN est létale, la suppression d'expression de RPC32 $\alpha$  ne mène pas à la mort de la cellule mais induit seulement une diminution de la capacité des cellules HeLa à former des colonies en agars mou. L'étude du niveau d'expression des deux sous unités paralogues dans un modèle de transformation

contrôlé de fibroblastes IMR90 humain (Hahn *et al.*, 1999) révèle un niveau constant d'expression de RPC32 $\beta$  mais une forte augmentation de l'expression de RPC32 $\alpha$  au cours de la transformation tumorale de ces cellules. Enfin, dans les cellules IMR90 partiellement transformées par l'introduction des gènes codants pour les protéines du papillomavirus E6 et E7 (inhibant respectivement p53 et pRb), l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  mène à la transformation complète. L'acquisition des caractéristiques tumorales des cellules est associée à la surexpression de certains gènes de classe III (l'ARN 7SK, U6, l'ARNr 5S ou l'ARNt Met initiateur) mais aussi de gènes de classe II dont leur influence est connue pour la transformation des cellules (Cycline E, Aurora A, p27kip1).

Sur la base de ces constatations il a été déduit que la sous-unité RPC32 $\beta$ , est exprimée de façon ubiquitaire que ce soit dans les tissus différenciés et indifférenciés. La létalité de la suppression par siARN de RPC32 $\beta$ , indique également que la Pol III $\alpha$  ne peut pas remplacer toutes les fonctions de la Pol III $\beta$  *in vivo*. Ce qui suggère donc que la Pol III $\beta$  est l'enzyme critique pour la transcription des gènes de classe III qui sont, comme il a été précédemment montré, essentiels pour la croissance et l'homéostasie des cellules. Par conséquent, et étant donné que la Pol III $\alpha$  ne semble pas être essentielle pour la survie des cellules, la Pol III $\beta$  apparaît l'effecteur principal de la transcription des gènes de classe III.

Bien que l'isoforme  $\alpha$  ait été la polymérase III initialement identifiée et décrite chez l'homme, elle pourrait n'exercer des fonctions importantes que pour une partie seulement des cellules des vertébrés. En outre, l'expression de l'ARNm de RPC32 $\alpha$  dans les cellules souches embryonnaire H1 et sa forte diminution comparable aux autres marqueurs de l'état non différencié des cellules (Oct3/4, Nanog et Lefty), indiquent que l'expression de RPC32 $\alpha$  peut être liée à l'état de différenciation d'une cellule. Cette hypothèse est à mettre en parallèle avec l'expression élevée de RPC32 $\alpha$  dans les cellules tumorales, ainsi que la nette augmentation des taux (ARNm et protéique) de RPC32 $\alpha$  au cours de la transformation des fibroblastes IMR90. En effet, il est désormais admis que les cellules tumorales retrouvent des aptitudes et caractéristiques des cellules souches avec la notion de « cancer stem cells » (cellules souches cancéreuses) (Ben-Porath *et al.*, 2008 ; Rosen et Jordan 2009 ; Tysnes 2010). Lors de l'inhibition d'expression de RPC32 $\alpha$  par siARN, l'observation de la diminution de formation de colonies dans l'agar mou, souligne une fonction importante pour RPC32 $\alpha$  dans le maintien de la croissance indépendante de l'ancrage des cellules transformées.

Enfin, il est intéressant de noter que l'augmentation d'expression de certains transcrits Pol III ne résulte pas d'une augmentation générale d'activité de transcription Pol III, mais il s'agit sûrement d'une conséquence des caractéristiques intrinsèques de RPC32 $\alpha$  dans au sein de la Pol III $\alpha$ . De plus, il semble évident que la transcription de certains gènes de classe III influence directement ou indirectement l'expression de gènes transcrits par la Pol II.

## TRANSITION :

Le laboratoire du Pr Teichmann a été le premier à décrire l'isoforme de la Pol III humaine contenant la nouvelle sous-unité RPC32 $\beta$  au lieu de la sous-unité paralogue RPC32 $\alpha$ . Il était déjà connu que l'altération de l'activité de la Pol III pouvait contribuer à l'apparition de cancer. Mais la comparaison de l'expression de RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  et l'observation des effets des isoenzymes correspondantes ont mis en évidence des fonctions extrêmement importantes et distinctes de ses deux complexes dans la survie des cellules, le développement embryonnaire et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Néanmoins, les informations à notre disposition concernant les mécanismes mis en jeu lors de ces événements sont toujours limitées

Les études menées au cours de cette thèse et rapportées dans ce manuscrit, s'inscrivent dans la continuité de ces découvertes récentes. Elles ont pour but d'améliorer la compréhension actuelle de l'activité des désormais deux ARN Polymérase III humaine.

L'existence de ces deux Pol III laissait présager deux familles de gènes cibles spécifique des Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$  *in vitro* et *in vivo*. D'ailleurs, l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  transformant les fibroblastes humains entraîne une augmentation accrue des niveaux de transcription de nombreux transcrits Pol III analysés *in vivo* mais pas de tous. De façon intéressante, les expérimentations de transcription *in vitro* ont pourtant démontré une capacité intrinsèque identique des Pol III pour la transcription des gènes des trois types de promoteur de classes III. Bien évidemment la spécificité des gènes cible de la Pol III $\alpha$  et  $\beta$  ne peut être réduite au simple nombre de gènes testés *in vitro*, mais il est possible d'envisager dès lors que les différences d'activités des deux isoformes soient conditionnées par l'interaction avec d'autres partenaires dans la cellule. Ainsi, il n'est pas exclu que les Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$  aient des compositions différentes, ou du moins que leurs sous-unité subissent des modifications post-traductionnelles différentes les rendant chacune plus ou moins compétentes pour l'interaction avec les différents facteurs de transcription. Au cours de cette thèse, des expérimentations ont été développées en ce sens.

La régulation d'expression des différents facteurs de transcriptions nécessaires à la machinerie Pol III, ou la régulation de l'expression même des deux sous-unités paralogues pourrait être envisagée comme déterminant le groupe de gènes de classe III à transcrire. Et là encore des modifications post-traductionnelles des deux sous unités RPC32 ou des différents facteurs pourraient influencer leur devenir et affecter l'activité de transcription de la Pol III. L'étude de l'expression de différents partenaires de la machinerie de transcription Pol III a aussi été menée.

A l'instar de certains gènes de classe III, plusieurs transcrits réalisés par la Pol II ont également vu leur expression être drastiquement modifiée lors de l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  dans des fibroblastes humains partiellement transformés. Des gènes associés à la survie cellulaire, à la croissance tumorale, ou à la formation de métastases sont ainsi sur exprimés et plusieurs autres gènes dit suppresseurs de tumeur sont quant à eux sous exprimés. Ces effets sont spécifiques de l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  et doivent résulter d'effets indirects de la transcription Pol III $\alpha$  sur les gènes transcrits par la Pol II. Pour mieux apprécier l'impact des évènements de transcription des deux Pol III sur la transcription Pol II, une exploration plus vaste des modifications d'expression des gènes de classe II a également été réalisée lors de l'expression ectopique de chacune des deux sous-unités paralogues, RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ .

Enfin, les observations relevées au cours des différentes expérimentations ont été confrontées à l'analyse d'échantillon de patients atteints de leucémie. Le but étant de valider l'implication de la Pol III $\alpha$  dans l'apparition de cancers chez un individu et entrevoir la capacité de RPC32 $\alpha$  à être un marqueur tumoral et potentiellement une cible thérapeutique anticancéreuse.



## RESULTATS

Chez les eucaryotes, l'ARN polymérase III est la plus complexe des trois enzymes responsables de la transcription nucléaire. Des informations sur la structure cristalline des 10 sous-unités de base de la Pol III (Cramer *et al.*, 2000 et 2001), et les 12 sous-unités de l'enzyme complète de la Pol II sont disponibles (Armache *et al.*, 2003 et 2005 ; Bushnell et Kornberg, 2003). Ainsi ces structures ont offert un cadre intéressant pour la compréhension de l'architecture des ARN polymérases nucléaires. Mais pour la Pol III, les questions sur la structure et l'assemblage des sous-unités restent posées. (Chedin *et al.*, 1998; Geiduschek et Kassavetis, 2001; Schramm et Hernandez, 2002 ; Fernandez-Tornero *et al.*, 2007 et 2010 ; Vannini *et al.*, 2010). Des précédentes études ont permis de mettre en évidence l'existence de deux ARN Pol III chez les vertébrés (Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$ ) (Sklar et Roeder, 1976 ; Haurie, Durrieu-Gaillard *et al.*, 2010). Il est néanmoins difficile de savoir si dans les cellules, la Pol III existe comme un complexe intact de 17 sous-unités, ou si d'autres sous complexes coexistent. avec notamment l'absence de certaines sous-unités ou la modification d'autres pouvant éventuellement entraîner des différences dans la fonction du complexe enzymatique (Huet *et al.*, 1985 ; Ferri *et al.*, 2000 ; Haurie, Durrieu-Gaillard *et al.*, 2010). Il semble donc important de déterminer la composition exacte des deux iso-enzymes Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$ . Dans cette première partie des résultats nous abordons la question ouverte de la composition des deux Pol III humaines, en analysant l'ensemble des sous-unités de l'ARN polymérase.

## **I. Identification des partenaires des sous-unités RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$ au sein de la machinerie de transcription Pol III**

Après la mise en évidence de deux isoformes de la sous-unité RPC32, il paraît indubitable que ces deux protéines peuvent entrer dans la composition de l'ARN Pol III. La possibilité de réaliser une réaction de transcription *in vitro* avec le complexe Pol III immunoprécipité via les sous-unités RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ , prouve que les deux ARN Pol III sont fonctionnelles (Haurie *et al.*, 2010 ). Les données connues sur le complexe chez d'autres organismes laissent supposer qu'une seule copie des deux protéines isoformes participe à la composition d'un complexe. Dans un premier temps nous avons donc voulu savoir si les protéines RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  sont associées à d'autres sous-unités de l'ARN polymérase III dans des cellules HeLa. Comme il a été décrit que la sous-unité RPC39 forme un complexe ternaire avec RPC32 et avec RPC62 (Wang et Roeder 1997), nous avons choisi

d'immunoprécipiter RPC39 à partir d'extraits nucléaires dérivés de cellules HeLa et d'analyser par western blot si RPC32 $\alpha$  et/ou RPC32 $\beta$  co-précipitaient avec RPC39. Nous n'avons pas choisi des cellules HeLa simples, mais des cellules HeLa qui expriment de façon stable soit la sous-unité RPC32 $\alpha$  soit la sous-unité RPC32 $\beta$  toutes deux étiquetées en N-terminal par la séquence épitope FHM (Flag, HA, Myc). Nous avons choisi ces lignées cellulaires, parce que nous avons pu déterminer avec une seule expérience si les sous-unités RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  endogènes (non étiquetées) et étiquetées sont capables d'interagir avec la sous-unité RPC39. La figure 7A montre que les deux sous-unités, RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ , interagissent et sont co-immunoprécipitées avec RPC39. De plus, ces expériences montrent que ces deux sous-unités peuvent être co-précipitées qu'elles soient étiquetées ou non (Fig. 7A, piste 1 et 4).

Pour savoir si deux molécules de RPC32 $\alpha$  ou seulement une molécule RPC32 $\alpha$  et une molécule RPC32 $\beta$  peuvent être également présentes dans une immunopurification de la Pol III $\alpha$ , nous avons fait les expériences visibles sur la figure 7B. Les voies 1 et 2 de la figure 7B montrent que RPC32 $\alpha$  endogène est exprimée dans les deux lignées HeLa utilisées, qui expriment soit RPC32 $\alpha$  (voie 1) soit RPC32 $\beta$  étiquetées (voie 2). Nous détectons également RPC32 $\alpha$  étiquetée dans la lignée qui exprime de façon stable RPC32 $\alpha$  étiquetée (voie 1; la bande à environ 40 kDa), mais pas dans la lignée qui exprime RPC32 $\beta$  étiquetée (voie 2). L'immunoprécipitation de RPC32 $\alpha$  étiquetée par des anticorps anti-FLAG présents sur les billes M2-agarose (réf. Sigma, #A2220), reconnaissant l'épitope FLAG-HA-MYC révèle la précipitation de la sous-unité étiquetée (Fig. 7B, voie 3). Par contre, la sous-unité RPC32 $\alpha$  non étiquetée (endogène) n'est pas co-immunoprécipitée, indiquant qu'une seule sous-unité RPC32 $\alpha$  est présente dans l'immunoprécipitation (voie 3). De façon similaire, l'immunoprécipitation de RPC32 $\beta$  étiquetée par des anticorps anti-FLAG n'entraîne pas la co-immunoprécipitation de RPC32 $\alpha$ , indiquant que RPC32 $\beta$  et RPC32 $\alpha$  ne sont pas présents en même temps dans les complexes immunoprécipités (Fig. 7B; voie 4).

Il semble évident que les deux ARN polymérases III humaines interviennent dans des processus biologiques différents. Des propriétés distinctes des deux isoformes, telles que l'efficacité de transcription ou la spécificité pour certains gènes cibles pourraient être déterminées par leur composition polypeptidique. Bien que les connaissances sur les différentes ARN polymérases et la Pol III en particulier permettent d'avancer qu'une seule copie de chaque sous-unité est inclus dans l'holoenzyme (Lorenzen *et al.*, 2007), il n'est pas

exclu néanmoins que l'une ou l'autre des isoformes du complexe soit dépourvue d'une ou plusieurs sous unités.

De plus, d'autres sous-unités pourraient comme RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  se substituer l'une à l'autre même si l'étude bioinformatique ne met pas en évidence d'autres gènes codants pour des sous unités paralogues de ceux déjà identifiées pour la Pol III. Il pourrait également exister des formes d'épissages alternatifs, comme pour la sous-unité RPC5 (POLR3E) (Raha *et al.*, 2010 ), qui entreraient de façon spécifique dans la composition de l'une ou l'autre des deux Pol III. Enfin, leurs protéines qui co-purifient les Pol III pourraient également nous apporter des informations concernant les spécificités de leurs fonctions.

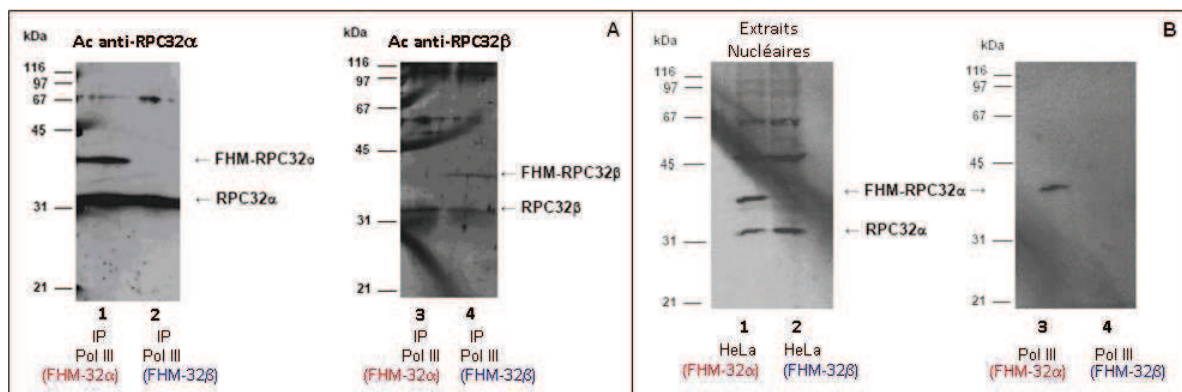


Figure 7. **Analyses des protéines RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  dans la Pol III :** (A) Les anticorps dirigés contre RPC32 $\alpha$  ( $\alpha$ RPC32) et couplés sur des billes de protéines A sepharose ont été utilisés pour immunopurifier la Pol III (Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$ ) à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa qui expriment de façon stable soit FHM-RPC32 $\alpha$  (piste 1 et 3) soit FHM-RPC32 $\beta$  (piste 2 et 4). Les pistes ont été révélées par western blot grâce à des anticorps dirigés contre RPC32 $\alpha$  (à gauche) et RPC32 $\beta$  (à droite). (B) Analyse western blot (à gauche) de 30 $\mu$ g d'extrait nucléaire de cellules HeLa qui expriment de façon stable FHM-RPC32 $\alpha$  (pistes 1) et de cellules HeLa qui expriment de façon stable FHM-RPC32 $\beta$  (pistes 2), et révélée avec des anticorps anti-RPC32 $\alpha$ . Sur la partie droite de la figure, des billes M2-agarose ont permis d'immunopurifier la Pol III (Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$ ) à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa qui expriment de façon stable soit FHM-RPC32 $\alpha$  (piste 3) soit FHM-RPC32 $\beta$  (piste 4). Les pistes ont été révélées par W-B grâce à des anticorps dirigés contre RPC32 $\alpha$ .

Ainsi nous avons essayé d'identifier de manière exhaustive par spectrométrie de masse, les protéines associées à chacune des deux isoformes RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  purifiées et leurs possibles modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination etc...). La purification des deux complexes enzymatiques a été réalisée individuellement à partir de la lignée cellulaire HeLa sur-exprimant de façon stable la sous-unité FHM-RPC32 $\alpha$  ou FHM-RPC32 $\beta$ . Les éluats des immunopurifications réalisées avec des anticorps monoclonaux anti-FLAG fixés sur des billes d'agarose (M2-agarose), ont été soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes avec la présence de sodium dodécylsulfate (SDS) sur gel gradient 4 à

20% polyacrylamide (PAGE). Les protéines présentes dans le gel SDS-PAGE ont été révélées par coloration au nitrate d'argent (Fig. 8).

Il est important de noter que la masse de chacun de ces polypeptides conditionne directement leur aptitude à être révélés grâce au nitrate d'argent, ce qui explique que malgré un seuil de détection d'environ 0,1ng, il est difficile de détecter la présence des protéines de moins de 20 kDa. De plus, l'intensité de la coloration au nitrate d'argent n'est pas linéaire car elle est également dépendante de la composition des protéines en acides aminés capables de réduire les ions argent. Ainsi même pour des protéines de poids moléculaires proches avec une intensité de coloration équivalente, il est impossible de dire que ces sous-unités soient présentes en des quantités équimolaires.

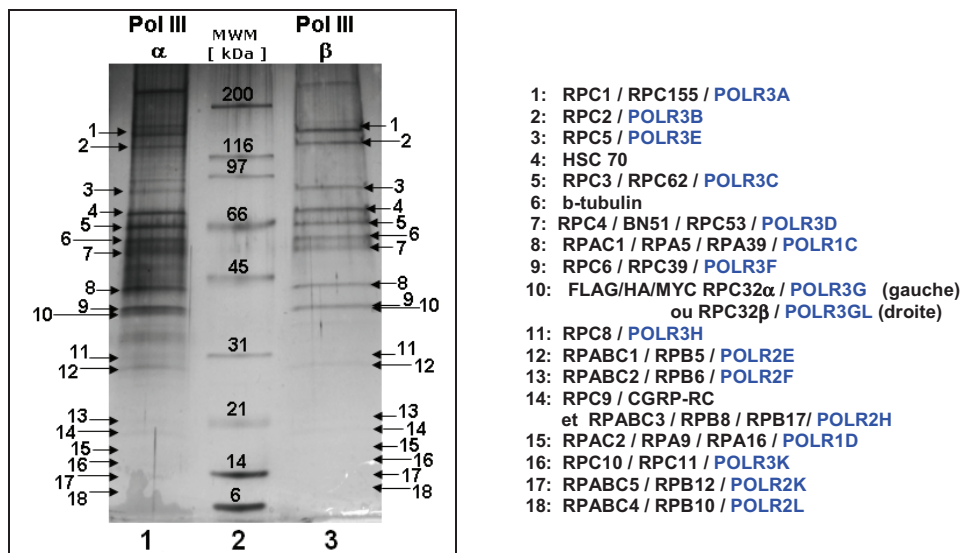


Figure 8 : Analyse des sous unités de deux Pol III humaines : Gel SDS / PAGE (4-20%) pour l'analyse des Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$  humaines. Immuno-purification de la Pol III associée à FHM-RPC32 $\alpha$  (piste 1) et immuno-purification de la Pol III associée à FHM-RPC32 $\beta$  (piste 3). Les bandes révélées par coloration au nitrate d'argent sont numérotées associées aux sous unités connues de la Pol III. Sur la piste 2 apparait le marqueur de poids moléculaires et les masses correspondantes.

Sur le gel (Fig. 8) il est remarquable que les profils des protéines de la Pol III $\alpha$  et de la Pol III $\beta$  qui co-purifient respectivement avec FHM-RPC32 $\alpha$  et FHM-RPC32 $\beta$  sont très similaires (piste 1 et 2). Ainsi nous pouvons supposer que seule la sous unité RPC32 est différente entre la Pol III $\alpha$  et la Pol III $\beta$ . Cela avait déjà été envisagé chez la souris (Sklar et Roeder, 1976). Ce profil est assez caractéristique pour pouvoir numéroter et nommer la quasi-totalité des polypeptides sur le gel, par ordre de poids moléculaire décroissant. Nous les considérons comme les sous-unités putatives des complexes.

Pour acquérir une liste plus exhaustive des protéines qui co-purifient avec les sous-unités RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  nous avons tenté une identification par analyse MS/MS sur MALDI-Q-TOF premier de Waters, en collaboration avec le laboratoire CBMN (dirigé par JM Schmitter.) Nous avons testé sur l'appareil les peptides obtenus par digestion trypsique des différentes bandes séparées sur le gel SDS PAGE après dépôt de l'éluat des immunopurification. Aucune protéine spécifique de la Pol III ou de sa machinerie n'a pu être identifiée. La technologie ne s'est donc pas avérée assez sensible. Mais en suivant l'amélioration de la sensibilité et de la résolution de la technologie de spectrométrie de masse nous nous sommes intéressés au spectromètre de masse LTQ orbitrap XL™ (Thermo Scientific). Cet ESI-LTQ-Orbitrap est utilisé en couplage avec un système de nanochromatographie capillaire UltiMate 3000 de Dionex pour une analyse d'échantillons peptidiques complexes. Cette technologie qui s'avère plus sensible a pu être utilisée en collaboration avec la Plateforme de Protéomique de Bordeaux. Le passage des échantillons sur cet outil a confirmé la présence des peptides issus des sous-unités de la Pol III $\beta$  (RPCAC1/POLR1C, RPC1/POLR3A, RPC2/POLR3B, RPC62/POLR3C, RPC32 $\beta$ /POLR3GL et RPC39/POLR3F ; par un ensemble de 12 peptides). Elle a également et surtout permis de détecter de nombreux peptides provenant de protéines n'ayant pas de lien établi avec la transcription (cf Annexe 2). En effet, de part leur activité, des protéines pouvaient être des candidats prometteurs pour une analyse fine, mais il s'avère que pour la plupart elles correspondent à une contamination classique lors d'une immunopurification à l'aide de bille d'agarose (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008 ). L'identification de ces protéines résulte de la contamination de l'éluat par un ensemble de polypeptides qui ont une affinité pour les billes de M2 agarose utilisées pour cette purification.

Mis à part ces six sous-unités de la Pol III, aucun autre composant de la machinerie de transcription n'a été détecté dans l'éluat de l'immunoprécipitation. Comme déjà observé par western blot, l'analyse de l'éluat de la Pol III $\beta$  (via l'étiquetage FHM de RPC32 $\beta$ ) n'a pas permis de détecter des peptides issus de la sous-unité RPC32 $\alpha$  confirmant l'existence et la distinction des deux iso-enzymes. Néanmoins aucun peptide provenant de la Pol III $\alpha$  (déposé sur la piste 1 de la figure 8) n'a été décelé alors que sa présence dans cet éluat a été révélée par western blot. Il apparaît évident que l'éluat de la Pol III $\alpha$  est plus contaminé que l'éluat de la Pol III $\beta$  à la vue du bruit de fond sur la piste 1. Cet ensemble de contaminants est inévitablement co-purifié lors d'une telle stratégie d'immunoprécipitation. Mais le manque de

sensibilité et l'absence de résultats pour cette piste peut-être également expliqué par la limite de l'analyse par spectrométrie elle-même, car elle ne détecte que les peptides les plus abondants du mélange. Le manque de matériel spécifique à analyser ne nous a pas permis non plus d'identifier de possibles modifications post-traductionnelles.

Le problème de la liaison non spécifique de protéines sur les billes de purification ne peut être surmonté de façon satisfaisante en utilisant des méthodes de purification trop stringente, car cela entrainerait une perte significative des interactions des partenaires de la Pol III. Il fallait donc des méthodes pour augmenter le signal, à savoir, l'abondance des complexes protéiques purifiés, tout en réduisant le bruit de fond, c'est à dire les protéines qui se lient par affinité mais de façon non spécifique à la matrice sur laquelle sont fixés les anticorps. La stratégie a donc été d'augmenter les quantités d'extraits nucléaires et de les fractionner par FPLC sur colonne échangeuse d'ions pour éliminer un nombre conséquent de protéines. Puis l'immunoprécipitation des complexes a été réalisée uniquement sur les fractions contenant la Pol III, à l'aide de billes magnétiques sur lesquelles sont couplés les anticorps anti-Flag-M2. Notre choix s'est porté sur cette matrice car elle est décrite comme celle ayant le moins d'interaction avec les protéines d'extraits nucléaires (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008 ) mais aussi en raison d'observations de Chiara Pascali qui a réalisé dans notre laboratoire des immunoprécipitations de la chromatine (ChiP) plus spécifiques grâce à ces billes magnétiques.

Ainsi de nouveaux extraits nucléaires (pour chacune des deux lignées HeLa sur-exprimant FHM-RPC32 $\alpha$  ou FHM-RPC32 $\beta$ ) ont été fractionnés sur colonne FPLC échangeuse d'anions. Chaque protéine ou complexe se lie sur cette colonne et peut être élué plus ou moins rapidement en fonction de leur charge ionique qui détermine leur affinité pour la résine (EDF : EMD-DEAE-Fractogel ; Merck). Le passage d'un gradient de concentration en sel (de 60mM à 530mM KCl) permet leurs éluions en différentes fractions. Le système de chromatographie ÄKTA explorer™ utilisé dispose d'une cellule spectrophotométrique pour mesurer l'absorption des rayons UV au passage des protéines sur la colonne de chromatographie et permet le suivi de la purification. Cette méthode simple permet d'éliminer une partie importante des protéines d'un extrait car nous récupérons uniquement les fractions contenant notre complexe d'intérêt. En effet, après obtention d'une fraction non-retenue par la résine et d'une vingtaine de fractions qui ont été liées puis éluées de la colonne, chacune fut testée par western blot pour l'identification des fractions contenant les sous-unités de la Pol



III. (Fig. 9). Ainsi elles furent testées à l'aide d'anticorps dirigés contre les sous-unités RPC53, RPC39 et contre les sous unités FHM-RPC32 $\alpha$  (anti-Flag et anti RPC32 $\alpha$  commercial) et FHM-RPC32 $\beta$  (anti-Flag). Nous avons pu alors isoler les fractions 10 à 16 contenant la majorité des sous-unités de la Pol III testées. Ce sont ces fractions qui ont servi pour une nouvelle immunopurification des deux ARN Pol III humaines.

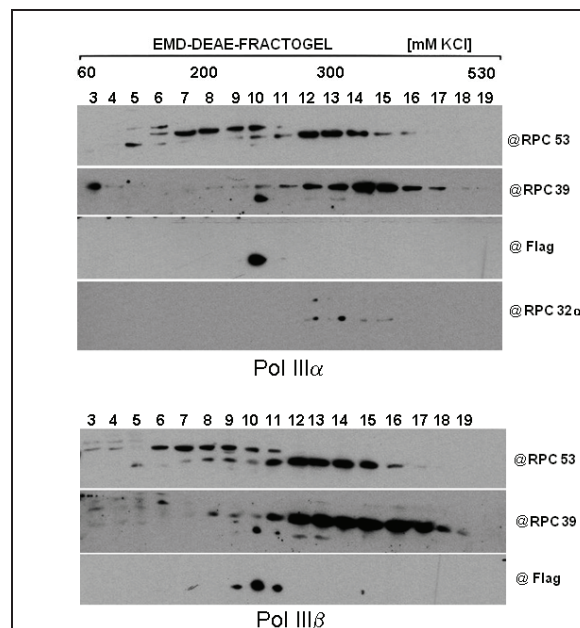


Figure 9 : **Analyse western blot après chromatographie sur DEAE-EMD-Fractogel (EDF)** : Les deux extraits nucléaires issus de cellules HeLa qui expriment de façon stable FHM-RPC32 $\alpha$  (en haut) et de cellules HeLa qui expriment de façon stable FHM-RPC32 $\beta$  (en bas), on été fractionnés par chromatographie. Les différentes fractions ont été analysées sur gel SDS-PAGE. Les pistes 3 à 19 représentent 5  $\mu$ l de chaque fraction obtenue par élution des extraits sur la colonne d'EDF avec un dégradé linéaire de 60 à 530 mM de KCl. L'analyse a été réalisée par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les sous unités RPC53, RPC39 et RPC32 ou contre l'étiquette Flag.

Il est intéressant de remarquer un décalage entre les signaux des différentes sous unités et le signal pour l'étiquette Flag (Fig. 9). Bien que les différences d'intensité des signaux résultent de l'efficacité propre à chacun des anticorps, nous notons que le signal le plus intense contre l'épitope Flag est situé dans la fraction 10 contrairement aux autres sous-unités dont les signaux sont plus intenses entre les fractions 12 et 15. Ainsi, bien qu'ayant démontré la possibilité de purifier par co-immunoprécipitation les constituants de la Pol III grâce aux sous unités FHM-RPC32 $\alpha$  ou FHM-RPC32 $\beta$ , il est probable que l'intégration de ces protéines étiquetées dans le complexe soit moins efficace que celle des protéines endogènes. Ceci pourrait notamment expliquer la faible quantité de matériel déposée sur gel SDS-PAGE et disponible pour l'analyse par spectrométrie de masse.

L'éluat de l'immunopurification effectué à partir des fractions 10-16 de la colonne EDF a de nouveau été séparé sur gel SDS PAGE (Fig. 10). Les peptides obtenus après digestion trypsique des bandes révélées par coloration au nitrate d'argent ont été analysés par l'appareil LTQ orbitrap XL™ (Thermo Scientific). Malgré l'amélioration de la spécificité de l'immunopurification, nous sommes toujours confrontés à la limite de détection due à une quantité trop faible de matériel déposée sur gel. Ainsi, cette nouvelle méthodologie a mis en évidence la présence des peptides issus des sous-unités de la Pol III $\alpha$  (RPC62/POLR3C, RPC32 $\alpha$ /POLR3G, RPABC3/POLR2H, RPAC1/POLR1C, RPABC1/POLR2E, RPC53/POLR3D; avec un ensemble de 62 peptides) et de la Pol III $\beta$  (RPC39/POLR3F, RPAC1/POLR1C; avec seulement 2 peptides) mais également encore de nombreuses protéines dont la co-immunopurification est sûrement aspécifique (cf Annexe 2bis).

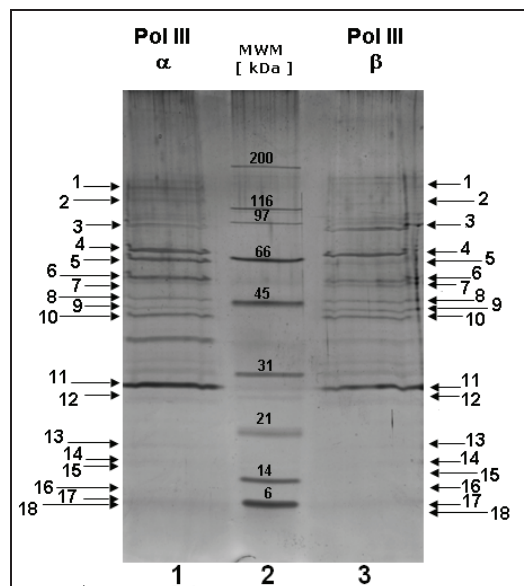


Figure 10 : **Analyse des sous unités de deux Pol III humaines** : Gel SDS / PAGE (4-20%) pour l'analyse des Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$  humaines. Immunopurification de la Pol III associée à FHM-RPC32 $\alpha$  (piste 1) et immunopurification de la Pol III associée à FHM-RPC32 $\beta$  (piste 3). Les bandes sont révélées par coloration au nitrate d'argent. Sur la piste 2 apparaît le marqueur de poids moléculaires et les masses correspondantes.

À cause des limites liées à la détection de faible quantité de protéines et de la complexité de la Pol III, la technologie LC MS-MS ne nous a pas permis d'être exhaustifs dans la détermination de la composition des deux ARN Pol III. Cette approche nous a apporté des informations sur la présence de sous-unités de la Pol III pour lesquelles l'interaction dans le complexe est forte. Cette analyse n'a pas permis non plus la mise en évidence de possibles modifications post-traductionnelles.

Toujours dans le but de rechercher des différences entre la Pol III $\alpha$  et Pol III $\beta$ , l'étude de l'expression de RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  dans les tissus humains s'est poursuivie. Les résultats précédents dans le laboratoire décrivaient une forte augmentation de l'expression de RPC32 $\alpha$  au cours de la transformation tumorale dans un modèle de transformation contrôlée de fibroblastes IMR90 humains (Hahn *et al.*, 1999 ; Hahn *et al.*, 2002). Ce modèle cellulaire consiste en l'introduction et l'expression de différentes combinaisons de gènes (G12V-HRAS, les protéines de Papillomavirus Human E6, E7, du Virus Simien 40, Small T et TERT) dans des cellules IMR90, à l'aide de vecteur rétroviral. L'expression de ces éléments génétiques définis mènent ainsi les cellules IMR90 à la transformation tumorale. Nous avons observé alors une très forte augmentation de l'ARNm et du taux de protéines de RPC32 $\alpha$  lors de la transformation cellulaire, alors que les niveaux ARNm et protéique de RPC32 $\beta$  restaient inchangés. Cela laissait supposer une augmentation du taux de Pol III $\alpha$ .

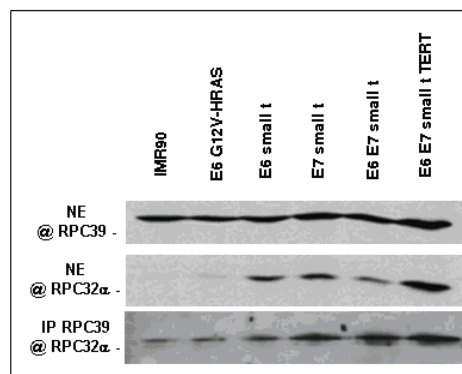


Figure 11 : **Augmentation de l'expression de RPC32 $\alpha$  ainsi que de la quantité de Pol III $\alpha$**  : Analyse western blot des extraits nucléaires de lignées IMR90 (piste 1), d'IMR90 sur exprimant E6/G12V-RAS (piste 2) ou E6et Small t (piste 3), E7 et Small t (piste 4), E6/E7 et Small t (piste 5) ou encore E6/E7 Small t et TERT (piste 6). Les protéines RPC39 et RPC32 $\alpha$  ont été respectivement révélées par des anticorps spécifiques (en haut et au milieu). Le blot du bas est la révélation de la sous unité RPC32 $\alpha$  après immunoprécipitation de la Pol III dans chacune des lignées grâce aux anticorps anti-RPC39 fixés sur des billes de protéine A sépharose.

Pour vérifier ce taux relatif de la Pol III $\alpha$ ., l'ensemble des ARN polymérase III a été immunopurifié à partir d'extraits nucléaires de chaque lignée cellulaire du modèle en utilisant des anticorps anti-RPC39 couplés à des billes de protéine A-sépharose. La sous-unité RPC32 $\alpha$  spécifique de la Pol III $\alpha$  a été détectée par western blot avec des anticorps spécifiques (Fig.11). Nous observons que l'augmentation du niveau protéique de RPC32 $\alpha$  révélé dans les extraits nucléaires dans le modèle de la transformation contrôlée est corrélée à une augmentation du taux de Pol III $\alpha$  immunopurifiée à partir de ces extraits. Ainsi, nous

démontrons que l'augmentation d'expression de RPC32 $\alpha$  entraîne effectivement une augmentation du taux de Pol III $\alpha$ .

## II. Influence de RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$ sur la machinerie Pol III.

A partir des cellules IMR90 partiellement transformées par l'introduction des gènes codants pour les protéines virales E6 et E7, nous avons démontré que l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  menait à la transformation complète, contrairement à l'expression ectopique de RPC32 $\beta$ . Afin d'étudier les bases moléculaires des différences observées entre les fibroblastes IMR90 E6/E7 surexprimant de façon ectopique RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ , nous avons étudié par RT qPCR les extraits ARN issus de ces lignées cellulaires. Malgré des expérimentations de transcription *in vitro* qui ont démontré une capacité intrinsèque identique des deux Pol III pour la transcription des gènes des trois types de promoteur de classes III, il avait été observé *in vivo* une régulation différentielle des gènes transcrits par les deux Pol III (Haurie *et al.*, 2010). Il était notamment intéressant de noter l'impact de l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  sur la transcription de deux gènes de type 2 distincts (ARNt Met initiateur et ARNt Glu) qui impliquent la reconnaissance des promoteurs par les mêmes facteurs que sont TFIIC et TFIIB. En effet, la régulation de transcription différentielle de ces gènes impliquerait alors l'existence d'autres facteurs de transcription, ou des modifications des facteurs déjà décrits. Les dérégulations observées pour les gènes de classe III, avec des séquences et des structures promotrices distinctes, semblent donc être probablement dues à des changements de la machinerie générale de transcription Pol III.

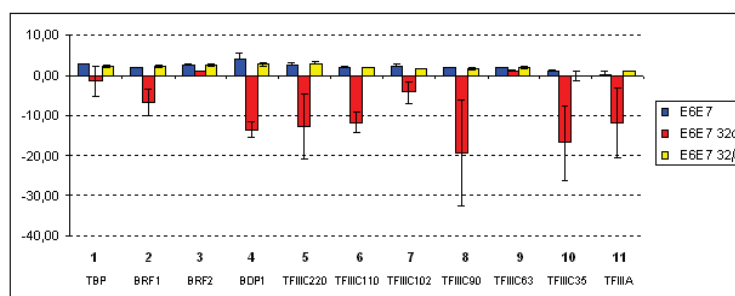


Figure 12 : **Analyse RT-qPCR** : L'expression individuelle des ARN a été déterminée dans les fibroblastes IMR90 exprimant E6 et E7 (barres bleues), E6/E7 et RPC32 $\alpha$  (barres rouges), ou E6/E7 et RPC32 $\beta$  (barres jaunes). L'expression des gènes suivants codants pour des protéines de la machinerie Pol III ont été analysés: TBP (piste 1) ; BRF1 (piste 2) ; BRF2 (piste 3); BDP1 (piste 4); TFIIC220 (piste 5); TFIIC110 (piste 6) ; TFIIC102 (piste 7) ; TFIIC90 (piste 8) ; TFIIC63 (piste 9) ; TFIIC35 (piste 10) et TFIIA (piste 11). La hauteur des barres indique le niveau d'expression relatif par rapport à l'expression dans les IMR90, qui a été fixée à 1.

Nous avons envisagé dans un premier temps que les différences d'activité des deux isoformes pourraient être conditionnées par l'interaction des enzymes avec d'autres partenaires de la machinerie Pol III. Ne pouvant caractériser ces facteurs par spectrométrie de masse, nous nous sommes donc intéressés à l'expression de l'ensemble de la machinerie Pol III pour identifier d'éventuelles régulations.

Les études réalisées par RT-qPCR, ont révélé, pour les lignées IMR90 E6/E7 sur-exprimant de façon ectopique RPC32 $\alpha$ , une sous expression globale des gènes codants pour le facteur de transcription TFIIA et de différents composants des facteurs TFIIC et TFIIB (Fig. 12). Ces résultats doivent être interprétés avec prudence, car nous nous sommes alors placés pour ces expérimentations à la limite de sensibilité de la technique de RT qPCR. Différents résultats RT-qPCR ont mis en évidence une modification importante de la distribution des différentes classes de transcrits dans les cellules transformées par RPC32 $\alpha$ . Un test a notamment démontré que le gène de référence qu'est la  $\beta$ -actine est 100 fois moins présent pour une quantité d'ARN identique, entre la lignée IMR E6/E7 et la lignée IMR90 E6/E7 sur-exprimant FHM-RPC32 $\alpha$  (Annexe 3).

Néanmoins l'étude par western blot de l'expression protéique de sous-unités de TFIIC à partir d'extraits nucléaires démontre, de façon surprenante, une forte baisse du taux de TFIIC110 qui le rend quasi indétectable (Fig. 13 A et B). Ce résultat concernant la protéine TFIIC 110 est particulièrement intéressant. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de la Pol III associée à la tumorigénèse est couramment décrite dans la littérature comme étant induite par l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription et notamment de TFIIC (Sinn *et al.*, 1995 ; Winter *et al.*, 2000 ). Il est vraiment intrigant d'observer ici une sous expression de TFIIC110. Or, il a également déjà été montré qu'il existait deux formes de TFIIC dont l'une contenait la sous unité TFIIC110 et était active, alors qu'une seconde forme dite « inactive » ne possédait pas la sous-unité TFIIC110 au détriment d'une autre protéine de 70kDa qui n'a pas été identifiée à ce jour (Sinn *et al.*, 1995 ).

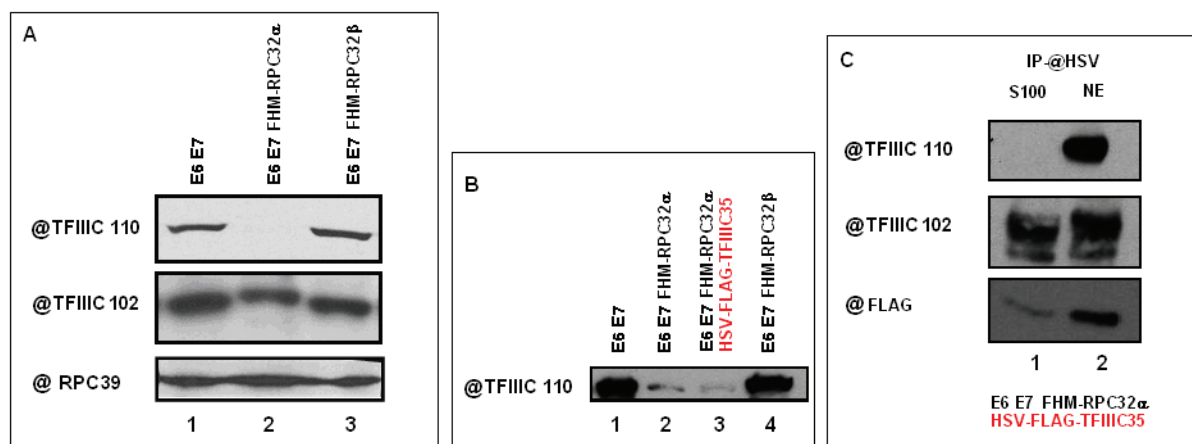


Figure 13 : **Expression différentielle de la protéine TFIIC110** : (A) Dépôt de 30 $\mu$ g d'extraits nucléaires de cellules IMR90 E6/E7 (piste 1) ou qui expriment de façon stable soit FHM-RPC32 $\alpha$  (piste 2) soit FHM-RPC32 $\beta$  (piste 3), sur un gel de SDS-PAGE 8%, puis analysés par western blot avec des anticorps contre TFIIC110 (en haut), TFIIC102 (milieu) et normalisés par RPC39 (en bas). (B) Dépôt de 30 $\mu$ g d'extraits nucléaires de cellule IMR90 E6/E7 (piste 1) ou qui expriment de façon stable soit FHM-RPC32 $\alpha$  (piste 2) soit FHM-RPC32 $\alpha$  et HSV-FLAG-TFIIC35 (piste 3) soit FHM-RPC32 $\beta$  (piste 4), sur un gel de SDS-PAGE 8%, puis analysés par western blot avec des anticorps contre TFIIC110. (C) Les anticorps dirigés contre l'épitope HSV et couplés à des billes de protéines A sepharose ont été utilisés pour immunopurifier le facteur TFIIC à partir d'extraits cytoplasmique (piste 1) et nucléaires (piste 2) de cellules IMR90 E6/E7 qui expriment de façon stable FHM-RPC32 $\alpha$  et HSV-FLAG-TFIIC35. L'analyse western blot a été effectuée avec des anticorps dirigés contre TFIIC110 (en haut), TFIIC102 (milieu) et l'épitope FLAG (en bas).

Nous nous sommes donc interrogé sur la composition de TFIIC dans la lignée IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\alpha$ . Nous avons établi une lignée cellulaire transformée par FHM-RPC32 $\alpha$  qui exprime de façon stable la sous-unité TFIIC35 étiquetée par les épitopes 'HSV' et 'FLAG' puis nous avons vérifié que l'expression de TFIIC110 n'était pas modifiée par l'ajout de TFIIC35 (Fig.13B). Le facteur TFIIC a été immunopurifié à partir d'extrait protéique issu de la lignée cellulaire exprimant HSV-FLAG-TFIIC35 en utilisant des anticorps anti-HSV couplés à des billes de protéine A-sépharose. A l'aide d'anticorps spécifiques, différentes sous-unités TFIIC ont été détectées par western blot dans les éluats de l'immunoprécipitation effectuée sur l'extrait nucléaire et cytoplasmique (Fig.13C). De façon inattendue, nous détectons effectivement la sous-unité TFIIC110 au sein du facteur de transcription TFIIC. Il n'est néanmoins pas exclu que la sous-unité TFIIC110 soit l'élément limitant de la formation du facteur TFIIC connu « actif » mais que celui-ci coexiste avec une autre forme dont la composition et le rôle n'a pas encore été défini. Le dépôt sur gel SDS-PAGE du complexe TFIIC purifié et la coloration au nitrate d'argent de ses composants pourraient peut-être mettre en évidence des sous unités différentes des 6 déjà identifiées.



### III. Influence de RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$ sur des transcrits Pol II

Dans notre publication révélant l'existence des deux isoformes de l'ARN polymérase III humaine, nous avons mis en évidence de façon intéressante la régulation de l'expression de gènes associés à la survie cellulaire, la croissance tumorale et la formation de métastases. Ces données nous ont conduit à analyser plus particulièrement l'expression de p16 et p53. En effet, la régulation des gènes CDKN2A (ou p16<sup>Ink4A</sup>) et TP53 codant pour ces protéines p16 et p53, dont le rôle anti-tumorale a clairement été identifié, paraît particulièrement importante dans nos lignées transformées par la Pol III $\alpha$  (Fig.14A). De plus, l'analyse western blot a confirmé une diminution drastique du taux de ces protéines (Fig.14B).

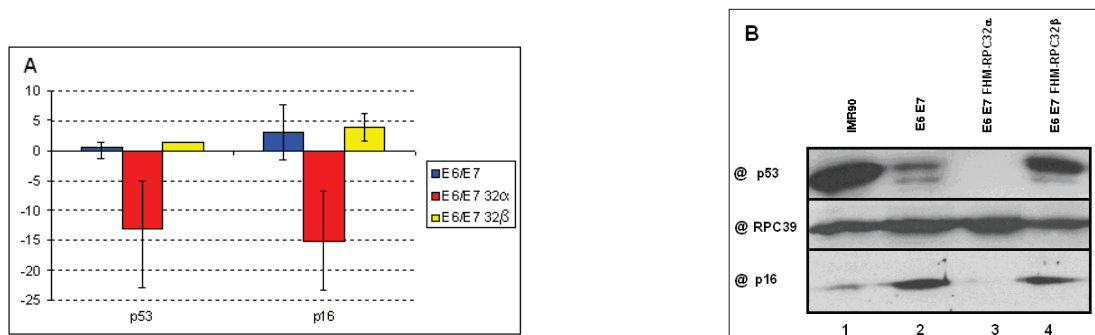


Figure 14 : **Expression différentielle des gènes codants pour p53 et p16** : (A) L'expression individuelle des ARN a été déterminée dans les fibroblastes IMR90 exprimant E6 et E7 (barres bleues piste 1), E6/E7 et RPC32 $\alpha$  (barres rouges), ou E6/E7 et RPC32 $\beta$  (barres jaunes). L'expression des gènes codants pour les protéines p53 et p16. La hauteur des barres indique le niveau d'expression relatif par rapport à l'expression dans les IMR90, qui a été fixée à 1. (B) Dépôt de 30 $\mu$ g d'extraits nucléaires de cellules IMR90 (piste 1), IMR90 exprimant E6/E7 (piste 2) ou qui expriment également de façon stable soit FHM-RPC32 $\alpha$  (piste 3) soit FHM-RPC32 $\beta$  (piste 4), sur un gel SDS-PAGE 10%, puis analysés par western blot avec des anticorps contre les protéines p53 (en haut), p16 (en bas) et RPC39 (au milieu).

Il était intéressant de noter que la surexpression d'une sous-unité spécifique de la machinerie de transcription Pol III puisse réguler l'expression de gènes transcrits par l'ARN Pol II. Un mécanisme connu de régulation du gène codant pour la protéine p16 est la répression par modification de la chromatine. Il s'agit d'une triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Cette « marque » nécessite l'intervention des complexes PRC (Polycomb Repressive Complex) et est associée à l'inactivation des gènes (pour revue Schartz et Pirotta, 2007). Ce mécanisme est particulièrement connu pour la régulation de la famille des gènes contenant un homeodomaine (ou homeobox) dont les gènes Hox. Ces gènes sont régulés au cours du développement et permettent le contrôle de l'identité cellulaire (notamment selon l'axe antéro-postérieur et proximal/distal). Connaissant la régulation de RPC32 $\alpha$  au cours de la différenciation, nous nous sommes donc demandé si les gènes Hox



pouvaient être eux mêmes régulés négativement dans les lignées transformées comme l'est CDKN2A/p16<sup>INK4a</sup>. Nous avons donc testé les gènes Hox, normalement exprimés dans des fibroblastes de poumon (Chang *et al.*, 2002 ). L'analyse RT qPCR démontre une régulation négative des gènes Hox normalement exprimés dans les fibroblastes humains sauf pour le gène HoxB7 (Fig.15A). Là encore il est important de nuancer ces résultats à cause du seuil de sensibilité atteint pour la lignée surexprimant FHM-RPC32 $\alpha$ .

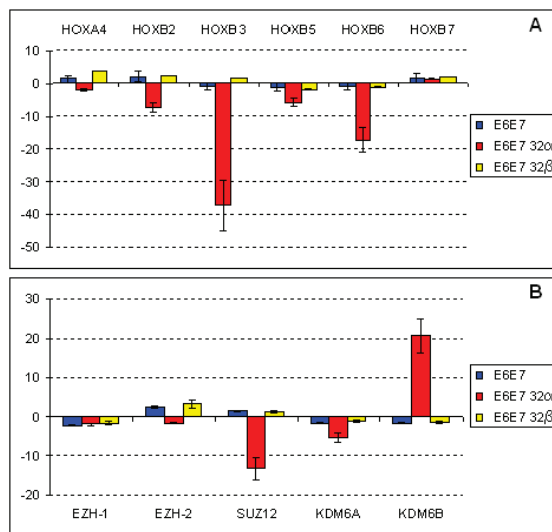


Figure 15 Analyse RT-qPCR :

(A) L'expression individuelle des ARNm des gènes Hox A4, HoxB2, HoxB3, HoxB5, HoxB6 et HoxB7, a été déterminée dans les fibroblastes IMR90 exprimant E6 et E7 (barres bleues), E6/E7 et RPC32 $\alpha$  (barres rouges), ou E6/E7 et RPC32 $\beta$  (barres jaunes). La hauteur des barres indique le niveau d'expression relatif par rapport à l'expression dans les IMR90, qui a été fixée à 1.

(B) De même l'expression individuelle des ARNm des gènes EZH-1, EZH-2, SUZ12, et KDM6-A et KDM6-B, a été déterminée dans les fibroblastes IMR90 exprimant E6 et E7 (barres bleues), E6/E7 et RPC32 $\alpha$  (barres rouges), ou E6/E7 et RPC32 $\beta$  (barres jaunes). La hauteur des barres indique le niveau d'expression relatif par rapport à l'expression dans les IMR90, qui a été fixée à 1.

La réduction d'expression des ces gènes pourrait être due au marquage H3K27me3 et impliquer les complexes PRC2 et PRC1. La sous-unité catalytique de PRC2, EZH2, est une méthyltransférase qui catalyse la di-et triméthylation de H3K27, marque qui est alors reconnue par PRC1 (pour revue Tony 2007). Le marquage répressif H3K27me3 peut être enlevé par l'une des deux déméthylases d'histones connues, KDM6A (UTX) et KDM6B (JMJD3). KDM6B a été montrée pour enlever la marque H3K27me3 des histones du promoteur de CDKN2A/p16<sup>INK4a</sup> (Agger *et al.*, 2009 ), tandis que KDM6A est impliquée dans la déméthylation de H3K27me3 sur les promoteurs de plusieurs gènes codants des protéines de liaison à la protéine pRB (Wang *et al.*, 2010 ). La régulation des gènes Hox étant mise en évidence, nous avons voulu savoir ce qu'il en était des éléments régulateurs. Nous avons donc testé l'expression de certains de leur composant (EZH1, EZH2, SUZ12) et les déméthylases (KDM6A et KDM6B) capables d'ôter la marque de régulation sur les histones. Les résultats

obtenus sont à l'inverse de ce que nous pouvions attendre (Fig.15B). Alors que les gènes EZH1 et EZH2 ne semblent pas particulièrement régulés, nous observons dans la lignée surexprimant RPC32 $\alpha$ , une sous expression de la protéine SUZ12 qui est une sous-unité essentielle pour la constitution de complexe PRC2. La déméthylase KDM6B capable d'ôter la triméthylation sur la lysine 27 de l'histone H3, voit son expression régulée à la hausse dans la lignée transformée. Enfin, la déméthylase KDM6A, est légèrement sous exprimée dans ces mêmes cellules.

Ces résultats demandent d'être confirmés par d'autres analyses mais laissent envisager une régulation chromatinienne du génome lors de la transformation des lignées cellulaires IMR90 surexprimant RPC32 $\alpha$ . Un ChIP est en cours d'élaboration contre les marques épigénétiques H3K27me3 et H3K4me3, afin de déterminer si l'état de méthylation des histones H3 aux promoteurs des gènes tels TP53 ou CDKN2A/p16<sup>INK4a</sup> peuvent expliquer leurs régulations.

#### **IV. Analyse globale de l'expression des gènes Pol II sous influence de l'expression de RPC32 $\alpha$ ou RPC32 $\beta$ .**

Tout d'abord, il avait été démontré que l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  transformant les fibroblastes humains entraîne une augmentation accrue des niveaux de transcription de nombreux transcrits Pol III analysés *in vivo*. Cela dit ce n'est pas le cas de l'ensemble du transcriptome Pol III. Nos investigations ont également permis d'observer une régulation au niveau d'ARN transcrits par la Pol II. Parmi ces gènes, certains, associés à la croissance tumorale sont sur exprimés et plusieurs autres gènes dit suppresseurs de tumeur sont quant à eux sous exprimés (Haurie *et al.*, 2010 ). De plus, lors des travaux que nous présentons nous avons constaté que d'autres gènes impliqués dans la différenciation cellulaire tels que sont les gènes Hox, semblent également être régulés.

A la vue de ces résultats encourageants, nous avons développé une approche globale d'analyse de l'expression des gènes. Une méthode d'analyse de l'expression des gènes à grande échelle a été permise par les puces à ADN (ou « microarrays »). Cette méthodologie a été réalisée afin d'étudier la régulation *in vivo* de l'ensemble des gènes de classe II. Nous avons utilisé des puces Affymetrix (Human Genome U133-plus 2.0) sur lesquelles sont disposées des fragments d'ADN (sondes ou probes) correspondant à la majorité des séquences transcrites par la Pol II. Les puces contiennent plusieurs représentants de certains des gènes de classe II (54 675 jeux de sondes ou probes set). Ainsi l'étude a porté sur trois répliques techniques de chaque lignée cellulaire, IMR90 E6/E7, IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\alpha$  et IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\beta$ . Les ARN totaux de ces lignées ont été extraits puis purifiés et leur intégrité a été testée à l'aide du Bioanalyseur 2100 d'Agilent (cf annexes 4). Ceux-ci ont été envoyés à la société Genome Explorations, Inc (Memphis, TN). Les transcrits Pol II ont été spécifiquement marqués par un fluorophore lors d'une étape de transcription reverse réalisée avec des oligonucléotides poly-dT. Les ARN complémentaires (ARNc) ainsi marqués, issus de chaque lignée, ont été hybridés individuellement sur une puce à ADN Affymetrix® Human Genome U133 Plus 2.0.

Le profile global d'expression du génome a été évalué sur les lignées IMR90 E6/E7, IMR90 E6/E7 sur-exprimant FHM-RPC32 $\alpha$  et IMR90 E6/E7 sur-exprimant FHM-RPC32 $\beta$ . Le but étant une comparaison d'expression des gènes basée sur la lignée IMR90 E6/E7

désignée comme «contrôle», avec une lignée IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\alpha$  (puce alpha) ou FHM-RPC32 $\beta$  (puce beta) afin de sélectionner les produits de transcription différentiellement exprimés. Une fois les intensités brutes extraites des biopuces, elles ont été normalisées à la fois par la méthode RMA, GC-RMA et la méthode PLIER. Ces algorithmes s'avèrent être les plus pertinents (Irizarry *et al.*, 2006 ). Les normalisations ont été effectuées conformément aux procédures standards suggérées par les concepteurs. Nous ne retiendrons que les gènes présents dans l'intersection des trois algorithmes. Il fallait aussi que la « P value» associé aux valeurs d'intensité soit inférieur à 0.05 et que le signal soit considéré présent. Ainsi, il semblait approprié de retirer les produits de la transcription dont la valeur moyenne des intensités des sondes les a déterminé « absent ».

C'est alors qu'une difficulté est apparue pour les puces « alpha » sur lesquelles a été hybridé l'ARNc synthétisé à partir des ARN totaux de la lignée IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\alpha$ . Malgré une quantité et une qualité d'ARNc comparable déposée sur les 9 puces, il n'a été détecté, en fonction des algorithmes, un signal « présent » que sur 8% environ des trois puces « alpha » contre 45% environ pour les 6 autres (« beta » et contrôle). Autrement dit, seulement 8% des sondes de ces trois puces « alpha » trouveraient une séquence complémentaire transcrite dans cette lignée. Cette difficulté est du même ordre que celle déjà rencontrée pour l'analyse RT-qPCR. Avec les puces « alpha » nous atteignons également les limites de la technique. Etant donné la faible intensité du signal de ces puces, ce dernier a été artificiellement augmenté dans le but de pouvoir les comparer aux puces contrôles. Ainsi, dans une population ARN fortement modifiée, ne pouvant être certain que les sous expressions révélées par l'analyse de ces puces « alpha » correspondaient à une réelle sous expression et non à une dilution de ces transcrits Pol II, nous nous sommes intéressé uniquement aux gènes surexprimés. Cette rectification arithmétique du signal amène à une augmentation équivalente du bruit de fond, et c'est la raison pour laquelle le seuil du « fold change » a été positionné à 4 (3000 gènes s'avèrent régulés avec un fold change compris entre 2 et 4).

Les comparaisons par paires ont montré 223 gènes statistiquement surexprimés dans la lignée IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\alpha$  par rapport à la lignée contrôle IMR90 E6/E7. Il est important de rappeler qu'un gène peut être représenté par plusieurs produits de la transcription ou ensembles de sondes (probes set) sur une biopuce reflétant peut-être la

présence d'épissage alternatif du gène. Les profils d'expression des 223 produits de la transcription régulés positivement par la surexpression ectopique de RPC32 $\alpha$  sont récapitulés dans le tableau en annexe (5).

Il est évident que nous devons prendre les résultats des puces « alpha » avec prudence. L'étude des résultats pour la surexpression des gènes dans la lignée IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\alpha$  ne fait pas apparaître de voie de signalisation particulièrement régulée. Néanmoins nous relevons la surexpression de gènes très étudiés pour leur implication dans les processus de cancérisation comme les gènes PTEN et HDM2. Le gène PIAS2, à l'instar de HDM2, inhibe la protéine p53, et est également retrouvé dans notre analyse. Nous avons pu trier les données grâce à la convention Gene Ontology qui permet un consensus dans les termes de description des gènes et de leurs activités. Ainsi, nous observons la régulation positive de nombreux gènes impliqués dans le développement et la différenciation cellulaire comme FGF-10, PAX6, PAX8, NODAL et bien d'autres. Nous notons la surexpression des gènes MLL2 et MLLT10 dont leurs noms sont dus à leurs implications dans l'apparition de cancer du sang. Nous remarquerons également la surexpression de 4 gènes codants pour des variantes d'histones (HIST1H2AB, HIST1H2AD, HIST1H2AI, HIST1H2AJ).

L'analyse des données des puces « beta » étant moins problématique, nous avons pu relever les régulations positives et négatives de la lignée IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\beta$  par rapport à la lignée contrôle IMR90 E6/E7. Ici nous avons également pu observer des régulations plus fines avec un seuil placé pour un changement d'expression supérieur ou égale à 2 fois. Les comparaisons par paires ont mis en évidence 329 gènes statistiquement exprimés de façon différente entre la lignée IMR90 E6/E7 et la lignée IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\beta$ . 64 gènes seulement sont régulés positivement et 265 le sont négativement. Ces résultats sont récapitulés sur les tableaux en annexe (6). Parmi le peu de gènes régulés positivement, nous trouvons le gène GAS6 (growth arrest-specific 6). En plus de participer à la régulation de la prolifération des fibroblastes, la protéine codée par ce gène est connue pour être impliquée dans la modulation immunitaire *in vitro* et *in vivo*. Le rôle de GAS6 serait d'être un agent anti-inflammatoire en régulant l'expression de TNF- $\alpha$ , IL6 et IL1- $\beta$  (Alciato *et al.*, 2010). Sans relever de régulation d'expression de TNF- $\alpha$ , plusieurs protéines associées sont néanmoins sous-exprimées (TNFAIP3, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF13B, TNFSF15 ou TNIP1). De façon intéressante, nous retrouvons aussi dans cette

analyse la sous expression de l'IL6 et de l'IL1- $\beta$ . Ainsi une grande partie des gènes sous-exprimés dans la lignée cellulaire surexprimant RPC32 $\beta$  sont impliqués dans la réponse immune et inflammatoire à travers des voies d'interaction cytokine-cytokine. Dans la grande famille des cytokines, des molécules retrouvées dans la voie de signalisation des chimiokines qui sont impliquées la réponse immunitaire mais également dans le développement, sont fortement sous exprimé (CCL11, CCL2, CCL5, CCL7, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCR7). Connue pour être régulé par le facteur de transcription NF-kappaB, le gène BCL2A1 est aussi sous-exprimé dans cette lignée cellulaire. Nous notons que les gènes NFKBIA et NFKBIZ qui codent pour des protéines inhibitrices de la fonction de NF-kappaB le sont également. De nombreux autres gènes impliqués dans les voies de régulation de l'inflammation, de la réponse immunitaire et de l'apoptose, sont également régulés et pour la grande majorité négativement. La famille de gène OAS (2'5'-OligoAdenylate synthetase), qui sont induits par la réponse interféron, sont également fortement sous exprimés tout comme les gènes IFI27, IFI35, IFI44, IFI44L, IFI6, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IFITM1, ISG20.

Une autre famille est particulièrement représentée dans les gènes régulés, ce sont les gènes codants pour des variantes d'histones. Nous relevons la sous expression de 13 d'entre eux (HIST1H1C, HIST1H1E, HIST1H2BD, HIST1H2BE, HIST1H2BH, HIST1H2BI, HIST1H2BJ, HIST1H2BK, HIST1H3H, HIST1H4H, HIST2H2AA3, HIST3H2A et H2BFS). Il est intéressant de noter que toutes ces variantes sous exprimées dans la lignée IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\beta$  alors que quatre autres de ces gènes histones avaient été observés surexprimés dans la lignée IMR90 E6/E7 surexprimant FHM-RPC32 $\alpha$ . De plus, dans notre analyse, aucun gène ne se retrouve régulé à la fois dans la lignée IMR90 E6/E7 surexprimant l'isoforme alpha, et dans la lignée surexprimant l'isoforme beta.

Les analyses des données de microarrays n'en sont qu'à leur début, et l'étude est loin d'être exhaustive mais mérite grandement d'être approfondie. La régulation des gènes qui semblent particulièrement intéressants devra notamment être confirmée par des analyses RT-qPCR.

## **V. Implication de RPC32 $\alpha$ dans le développement et la différenciation cellulaire.**

Dans les travaux réalisés précédemment au laboratoire, il a été démontré qu'au cours de la différenciation induite de cellules embryonnaires H1, le niveau d'expression de RPC32 $\beta$  restait constant, contrairement à l'expression de RPC32 $\alpha$  qui diminuait fortement (Haurie *et al.*, 2010). Pour déterminer le rôle fonctionnel de RPC32 $\alpha$  au cours de la différenciation, nous avons voulu réaliser une étude en utilisant un système lentiviral permettant la sous expression inducible de RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  grâce à un shARN dans des cellules NTera-2. Nous avons choisi les cellules NTera-2 car, issues d'un teratocarcinome, elles sont capables de se différencier en cellules neurales par induction à l'acide rétinoïque. Ainsi nous espérons apprécier la capacité de ces cellules à se différencier en l'absence de RPC32 $\alpha$ . L'inhibition de l'expression des sous unités protéiques se fera via le mécanisme d'ARN interférence. L'ARN interférence se base sur la reconnaissance de l'ARNm cible par des siARN qui entraînent la formation d'ARN double brin dégradé par la ribonucléase Dicer. L'expression des shARN sera induite en présence de la doxycycline. Le système commercial utilisé (Knockout<sup>TM</sup> Inducible RNAi Systems de Clontech) est composé de deux vecteurs lentiviraux dont l'un exprime une protéine répresseur qui inhibe l'expression du shARN présent dans le deuxième vecteur. Les séquences codantes pour les shARN ont été clonées dans le vecteur (RNAi Ready pSIREN-RetroQ-TetP) sous la direction d'un promoteur régulé par la tétracycline et composé de deux parties : un opérateur à la tétracycline bactérien (tetO) et le promoteur fort U6. La protéine répresseur de transcription contrôlée par la tétracycline (tTS) est apportée par le deuxième plasmide (pQC-tTS-IN). Cette protéine appelée tTS, est une protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN du répresseur de la tétracycline bactérien fusionné à un répresseur de la transcription eucaryote KRAB. En absence de tétracycline, le tTS se lie à l'ADN et réprime la transcription. Ainsi, en présence de tétracycline (ou de doxycycline) le répresseur se détache du promoteur U6 ce qui permet la transcription du shARN.



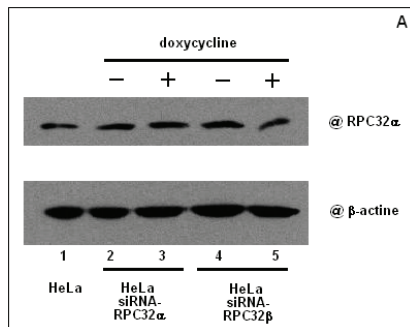
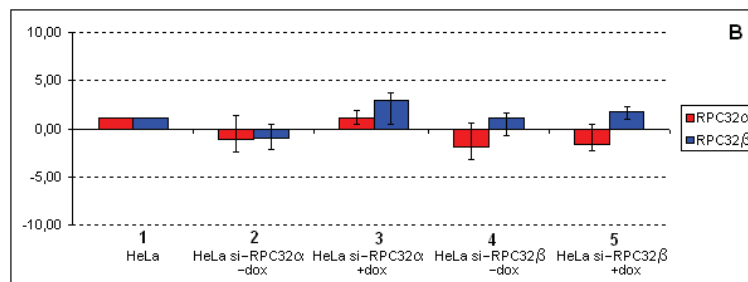


Figure 16 : Contrôle de la répression siARN contre RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  : (A) Analyse Western blot pour l'expression de RPC32 $\alpha$  de 30 $\mu$ g d'extrait nucléaire de cellules HeLa (piste 1) qui expriment de façon stable le siARN contre RPC32 $\alpha$  en absence de doxycycline (pistes 2) ou en présence (piste 3) et de cellules HeLa qui expriment de façon stable le si ARN contre RPC32 $\beta$  en absence de doxycycline (pistes 4) ou en présence (piste 5).



(B) L'expression des ARNm des gènes RPC32 $\alpha$  (rouge) et RPC32 $\beta$  (bleu), a été déterminée dans les cellules HeLa simples (ligne 1) et exprimant un siARN contre RPC32 $\alpha$  sans induction dox (ligne 2) avec induction doxycycline (ligne 3), ou un siARN contre RPC32 $\beta$  sans induction doxycycline (ligne 4) et avec induction doxycycline (ligne 5). La hauteur des barres indique le niveau d'expression relatif par rapport à l'expression dans les HeLa simple, qui a été fixée à 1.

Dans un premier temps et dans le but de valider le système, nous avons choisi d'établir des lignées de cellules HeLa contenant les deux vecteurs exprimés stablement pour tester le contrôle de l'expression par shARN des deux orthologues de RPC32. Nous avons utilisé les mêmes séquences que celles des siARN déjà validés au laboratoire (Haurie *et al.*, 2010), pour réaliser le shARN dirigé contre RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ . Après clonage et vérification par séquençage de shARN continu dans le vecteur, la transfection et l'établissement des lignées cellulaires, et induction de la régulation par l'ajout de 1 $\mu$ g/ml de doxycycline, l'analyse western blot n'a pas fait apparaître de baisse du niveau d'expression des protéines (Fig 16A). L'absence de régulation négative induite par la doxycycline a été confirmée par les tests RT-qPCR (Fig. 16B). Nous avons même observé que l'introduction seul du vecteur d'expression de shARN n'entraînait pas de sous expression de l'ARN cible.

Une analyse de la séquence du promoteur de ce vecteur démontre l'absence de DSE (Elément de Séquence Distal) ce qui pourrait expliquer la non expression du shARN. Même si une analyse northern blot devra être réalisée pour confirmer l'absence d'expression du shARN, nous envisageons de cloner le promoteur U6 complet dans le vecteur commercial pour remplacer le promoteur défaillant.

## VI. Modification post-traductionnelle de RPC32 $\alpha$

Les résultats décrits précédemment démontrent l'implication forte de la sous-unité RPC32 $\alpha$  dans la transformation tumorale. Nous retrouvons l'expression élevée de RPC32 $\alpha$  dans les cellules tumorales, ainsi que la nette augmentation des taux (ARNm et protéique) de RPC32 $\alpha$  au cours de la transformation des fibroblastes IMR90. De plus, l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  mène à la transformation complète des IMR90 E6/E7. Mais de façon intéressante, la sur expression de RPC32 $\alpha$  n'entraîne pas systématiquement la transformation tumorale. Ainsi nous disposons au laboratoire de lignées IMR90 E6/E7 sur exprimant FHM-RPC32 $\alpha$  mais qui ne se sont pas totalement transformées.

Une analyse précise de la migration sur gel SDS-PAGE de la protéine RPC32 $\alpha$  nous a conduit à nous interroger sur la présence de plusieurs bandes spécifiquement révélées avec les anticorps reconnaissant RPC32 $\alpha$  (Fig. 17). La figure représente une analyse par western Blot révélant la protéine RPC32 $\alpha$  dans des extraits nucléaires de cellules IMR90, IMR90 E6/E7, IMR90 E6/E7 FHM-RPC32 $\alpha$  transformées et non transformées, et IMR90E6/E7 FHM-RPC32 $\beta$ . Nous observons que deux bandes à 32kDa et même une troisième à 39kDa sont reconnues par l'anticorps anti-RPC32 $\alpha$ . La bande supérieure pouvant correspondre à RPC32 $\alpha$  étiquetée FHM dans les cellules exprimant RPC32 $\alpha$  étiquetée. Néanmoins, de façon surprenante une trace de cette bande à 39kDa est observée dans les IMR90 puis apparait clairement dès l'expression des éléments génétiques E6/E7 (lignées contrôles). Cela laisse envisager une modification post-traductionnelle type ubiquitylation, neddylation, ou sumoylation. Nous pensons donc ainsi observer que RPC32 $\alpha$  est une protéine modifiée. Avant de décrire les expériences que nous avons réalisé pour identifier les modifications, nous pouvons noter que la surexpression de la sous-unité RPC32 $\beta$  entraîne une forte sous-expression de la RPC32 $\alpha$  et aucune des trois formes n'est alors révélée par western blot.

La bande qui apparait environ 8kDa au dessus de la taille attendue nous a orienté vers une possible modification par ubiquitylation (environ 8,5 kDa). Pour étudier cette possibilité, nous avons donc cloné le gène codant pour l'ubiquitine avec une séquence codant l'étiquette HA-6His dans le vecteur pBabe. Nous avons pu alors l'exprimer dans les cellules IMR90 E6/E7 qui semblent fortement exprimer cette forme de RPC32 à 39kDa. Les expériences de

purification sur colonne de nickel ou à l'aide d'anticorps M2-agarose sont en cours, mais n'ont pour l'instant pas permis de mettre en évidence la régulation de RPC32 $\alpha$  par l'ajout d'un groupement ubiquitine. De plus, d'autres modifications dont nous ne pouvons connaître l'impact exact sur les capacités de migration de RPC32 $\alpha$ , sont également envisageables. Alors que la polyubiquitination des protéines cibles entraîne habituellement leur dégradation par le protéasome, l'ajout d'un groupement SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) ou NEDD8 (Neuronal precursor cell expressed, developmentally downregulated gene 8 ) est plutôt décrit comme ayant une fonction régulatrice (pour revue Weissman 2001). Par exemple, il a été démontré que des modifications de p53 par l'ajout de SUMO ou NEDD8 permettaient de moduler l'activité de p53. N'ayant pas de réponse concernant cette modification, nous envisageons des analyses complémentaires pour mettre en évidence ce type de régulation potentiel pour RPC32 $\alpha$ .

La protéine RPC32 $\alpha$  apparaît également sous deux formes à 32kDa. Les poids moléculaires très proches permettent d'envisager des modifications pouvant modifier légèrement les capacités de migration de la protéine comme le ferait la phosphorylation. Il est ici important de noter que les bandes, de migration plus ou moins lente sont présentes en proportions légèrement variables les unes par rapport aux autres, dans les différentes lignées testées (Fig.17). De plus, leur présence semble être relativement instable d'après nos différentes expériences. Plusieurs articles dans la littérature ont déjà rapporté que RPC32 $\alpha$  pouvait être modifiée par phosphorylation notamment lors de la mitose (Molina *et al.*, 2007 ; Dephoure *et al.*, 2008 ).

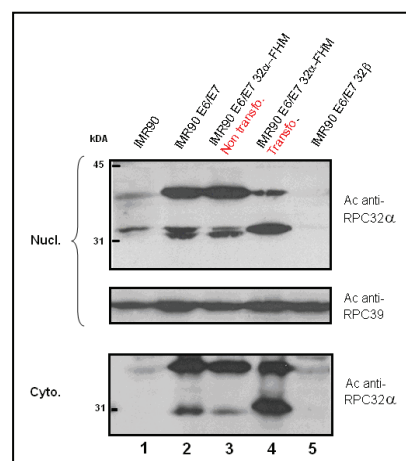


Figure 17 : **Analyse western blot** : 30 $\mu$ g d'extraits nucléaires (en haut) ou cytoplasmiques (en bas), issus de fibroblastes IMR90 (piste 1) ou IMR90 exprimant E6 et E7 (piste 2), ou E6/E7 et RPC32 $\alpha$  non transformés (pistes 3), ou E6/E7 et RPC32 $\alpha$  mais transformés (piste 4), E6/E7 et RPC32 $\beta$  (piste 5) ont été séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE-10%, puis transférés sur membranes de nitrocellulose et révélés avec les anticorps anti-RPC32 $\alpha$  ou anti-RPC39 comme indiqué sur la droite de la figure.

Si nous considérons la forme supérieure comme hyper-phosphorylée et la forme inférieure comme hypo-phosphorylée, alors il semblerait que la forme déphosphorylée disparaît lors de la transformation cellulaire. Il serait intéressant de mettre en évidence que la déphosphorylation de RPC32 $\alpha$  pourrait réguler son activité. La modification évidente de l'expression des deux formes à 32 kDa nous a suggéré qu'une condition de la régulation de la transcription de la Pol III est induite par la phosphorylation de RPC32 $\alpha$ . De plus, il apparaît également que plus la forme supérieure est intense, plus la bande à 39kDa est faible et inversement, plus la bande inférieure est intense, plus la bande à 39 kDa l'est également. Ainsi dans la piste 2 (IMR90 E6/E7) par exemple, alors que nous observons une bande inférieure à 32kDa qui n'est qu'une légère trace dans la piste 1 (IMR90), il en est de même pour la bande à 39 kDa. Cette corrélation systématique irait même jusqu'à penser que la bande à 39 kDa apparaît, parce que la bande inférieure à 32 kDa émerge. L'hyper-phosphorylation pourrait alors protéger RPC32 $\alpha$  d'une autre modification post traductionnel pouvant l'inactiver (exemple de la régulation de p53 : pour revue Carol 1998 ).

Nous avons voulu vérifier s'il était possible d'établir un lien entre l'état de phosphorylation de RPC32 $\alpha$  et sa localisation cellulaire. Lors de l'extraction des protéines, nous réalisons un fractionnement cellulaire visant à séparer les noyaux et les cytoplasmes des cellules. Nous espérons pouvoir observer une répartition différente de chacune des formes (hyper et hypo-phosphorylée) de RPC32 $\alpha$  qui sont présentes dans les cellules. Malheureusement cette expérience n'a pas pu aboutir à des résultats clairs. S'il apparaît nettement les deux formes à 32kDa dans les extraits protéiques provenant de la fraction nucléaire, il a est très difficile de visualiser ces deux formes distinctes de RPC32 $\alpha$  dans les fractions cytoplasmiques. Néanmoins, il semble que les migrations soient là encore différentes en fonction des lignées cellulaires. Des expériences d'immunopurification de RPC32 $\alpha$  n'ont pas permis d'aboutir à l'identification de RPC32 $\alpha$  phosphorylée ce qui constitue un obstacle pour pouvoir tirer des conclusions. Il est possible que nous ne la détectons peut être pas à cause de la fragilité de la forme phosphorylée, plus sujette à la dégradation malgré l'ajout d'inhibiteurs de protéases lors de l'extraction des protéines.

La transformation par la surexpression de RPC32 $\alpha$  semble être très liée à la modification par phosphorylation de cette protéine. L'analyse de la séquence de RPC32 $\alpha$  révèle plusieurs sites de phosphorylations potentielles même si RPC32 $\alpha$  n'est pas

particulièrement riche en sérines (3,1% d'acides aminés) ni en thréonine (4%) ou tyrosine (4,9%). Nous avons entrepris de déterminer les résidus phosphorylés de RPC32 $\alpha$  par la technique de spectrométrie de masse. Mais les limites de détection de la méthodologie ne nous ont pas permis de les caractériser. Néanmoins, l'identification des résidus phosphorylés de RPC32 $\alpha$  dans la littérature (Molina *et al.*, 2007 ; Dephoure *et al.*, 2008 ) nous a permis de cibler certains de ces résidus pour l'étude de l'effet de la phosphorylation sur la transformation cellulaire.

La découverte des sites de phosphorylation de RPC32 $\alpha$  ouvrait la voie aux études des mécanismes qui régissent sa fonction. Connaissant des résidus précis, il était possible, par mutation, de mimer leur phosphorylation permanente. Ces mutations dans le gène codant la protéine pouvaient nous permettre de préciser l'importance de la phosphorylation dans sa localisation cellulaire, l'intégration de la sous-unité dans la Pol III et dans le rôle direct de RPC32 $\alpha$  dans la transformation cellulaire. Il est difficile de penser qu'une seule phosphorylation de RPC32 $\alpha$  régit sa régulation mais nous espérons que la perturbation, même partielle, des modifications de RPC32 aurait pu avoir des effets sur son activité. Nous nous sommes intéressés en particulier aux sérines 157, 167 et 171 parce que les phosphorylations ont été identifiées sur ces résidus dans la littérature. La Ser 157 est conservée au cours de l'évolution chez les mammifères (qui possèdent les deux iso-formes de RPC32) ce qui suggère qu'elles jouent un rôle relativement important. De plus, chez la levure ce résidu S157 est remplacé par un acide aspartique. L'acide aspartique (Asp ou D) est un acide aminé chargé négativement qui peut mimer la charge d'une sérine phosphorylée. Nous avons entrepris de changer, par mutation du gène POLR3G, ces trois résidus particuliers de RPC32 $\alpha$  pour mimer une phosphorylation constitutive (Ser vers Asp). La substitution des sérines par des acides aspartiques a été réalisée par la société GeneART et vérifiée par séquençage.

Aucune des mutations de RPC32 $\alpha$  n'a pu entraîner une transformation tumorale plus efficace. Mais les analyses en cours sur l'expression de chacune de ces formes pourraient nous renseigner sur la régulation de RPC32 $\alpha$ . D'autres sites de phosphorylation restent sûrement à découvrir, l'analyse n'a pu être exhaustive. De plus, des études sur la Th133 seraient particulièrement intéressantes parce que sa phosphorylation dépend des phases du cycle cellulaire (Dephoure *et al.*, 2008 ). Ainsi la recherche des résidus phosphorylés devra

être poursuivie au laboratoire pour parfaire les identifications et pour mieux observer les différences de phosphorylation entre les différentes lignées.

En résumé, l'étude des sites de phosphorylation de RPC32 $\alpha$  est en cours. Nos observations préliminaires ne nous permettent pas d'affirmer que la phosphorylation de RPC32 $\alpha$  est importante pour l'activité de la transcription par la Pol III et notamment pour la transformation tumorale. Les sites potentiellement phosphorylables dans la séquence de RPC32 $\alpha$ , laissent penser que d'autres résidus de la protéine peuvent être phosphorylés. L'activation constitutive d'un ou deux sites de phosphorylations de RPC32 $\alpha$  parmi les multiples possibilités n'impacte peut-être pas suffisamment l'état de phosphorylation de la protéine pour modifier son rôle dans la transcription Pol III. La possibilité d'une implication de la régulation post traductionnelle de RPC32 $\alpha$  dans la transformation tumorale reste donc toujours à démontrer.

## VII. Régulation de RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$ dans des cellules hématopoïétiques

Nos études ont en majorité portées sur la recherche fondamentale et la compréhension de l'implication de la Pol III (notamment alpha) dans les processus cellulaires. Au cours de nos investigations précédentes ces travaux, nous avons constaté que l'ARNm de RPC32 $\alpha$  était particulièrement régulé dans les cellules humaines souches embryonnaires H1. Lors de la différenciation de ces cellules souches, nous observions une forte baisse du niveau ARNm de RPC32 $\alpha$ , qui pouvait être mis en parallèle avec la baisse des ARNm d'autres marqueurs spécifiques des cellules souches embryonnaires (Nanog, Lefty, Oct3/4) (Haurie *et al.*, 2010 ). En revanche, le niveau d'ARNm RPC32 $\beta$  ne changeait pas vraiment pendant la différenciation des cellules souches embryonnaires. De plus, lors de l'étude de l'expression des deux isoformes dans le modèle de transformation cellulaire, nous observions une augmentation importante de l'expression ARNm de RPC32 $\alpha$  confirmée par l'analyse protéique (Haurie *et al.*, 2010 ). Là encore, sur ce même modèle les niveaux ARNm et protéique des RPC32 $\beta$  restaient inchangés.

Dans le but de confronter nos observations à l'aspect clinique, en collaboration avec le laboratoire du Professeur Hermut Geiger (Division of Experimental Hematology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center), nous nous sommes intéressés à l'expression des deux isoformes de RPC32 dans les cellules souches hématopoïétiques (Fig.18). Grâce au Pr. Geiger, nous avons pu avoir accès à l'ADNc obtenu à partir d'extraits ARN totaux des cellules mises en culture provenant de patients atteints de cancer du sang ou de lignées tumorales modèles. Nous avons étudié l'expression ARN des gènes codants pour RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ , par RT-qPCR, dans les échantillons d'ADNc obtenus à partir de cellules normales de la moelle osseuse (HuBM) présentant le marqueur CD34 (CD34+), et de ces mêmes cellules non porteuses de ce marqueur (CD34-). Ce marqueur CD34 est un antigène de surface des cellules souches hématopoïétiques et son absence décrit l'avancement des cellules vers un état différencié.



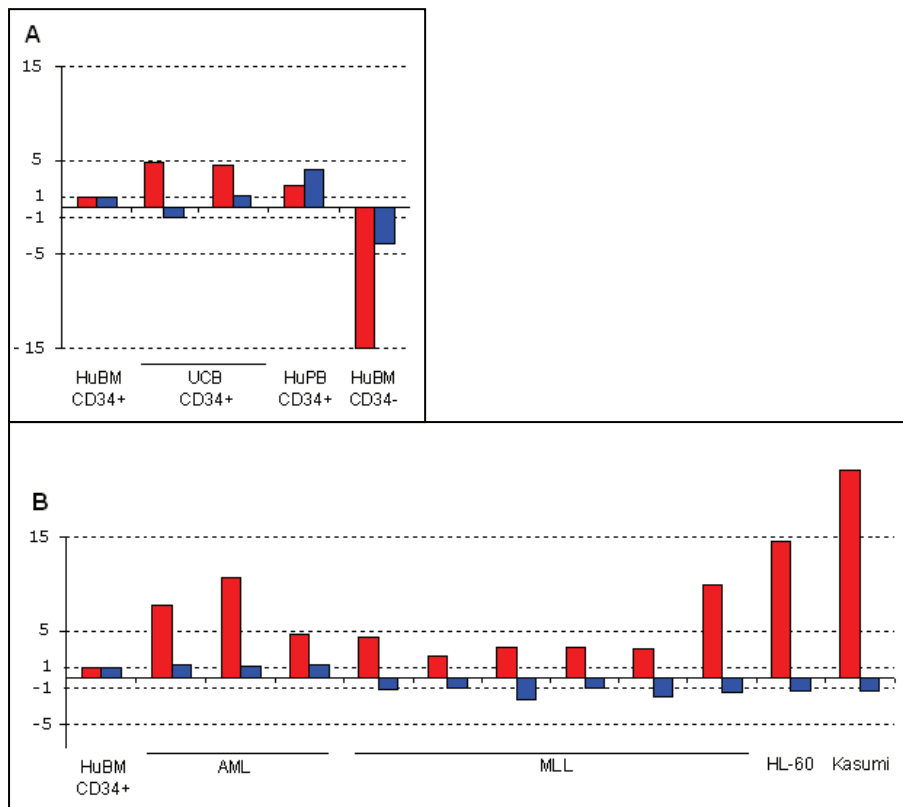


Figure 18 : **Analyse d'expression ARNm de cellules Hématopoïétiques.** (A) Représentation schématique de l'expression ARN de RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  (de valeur 1 dans les cellules de référence) dans les cellules de la moelle osseuse CD34+ (HuBM) ; des cellules souches provenant du sang de cordon (UCB) ; des cellules progénitrices CD34+ issues de sang circulant (HuPB) ; des cellules de moelle osseuse CD34 - ; (B) des échantillons d'extraits de cellules tumorales de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe (AML) ou de leucémie myéloïde/lymphoïde (MLL) ; de cellules de lignées tumorales modèles HL-60 et Kasumi.

En choisissant l'échantillon ADNc de cellules de moelle osseuse CD34+ comme référence dans notre analyse (valeur de référence noté 1 pour l'expression des gènes codants pour RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ ), nous pouvons constater que l'expression de RPC32 $\alpha$  est moins importante dans les cellules de la moelle osseuse qui ne possèdent plus cet antigène (Fig. 18 A). Nous retrouvons une expression légèrement plus importante dans les cellules progénitrices issues de sang circulant (HuPB ou Human Peripheral Blood) portant également le marqueur CD34. Ces résultats confirment l'implication de RPC32 $\alpha$  dans le maintien de l'état non différencié des cellules. Nous avons pu également tester 3 échantillons de cellules souches provenant du sang de cordon (UCB, Umbilical Cord Blood). Deux des trois échantillons présentent une expression légèrement plus importante de RPC32 $\alpha$  comparée à notre extrait de référence, et un dernier échantillon un peu moins. Ces variations d'expression dans ces cellules normales restent néanmoins limitées et nous avons pu constater une surexpression plus importante de RPC32 $\alpha$  dans les 11 échantillons extraits de cellules de

lignées tumorales. Ainsi nous relevons une expression de  $RPC32\alpha$  plus importante dans les 3 extraits issus de cellules de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe (AML pour Acute Myeloid Leukemia). Il en est de même pour les 6 extraits de cellules patients souffrants de leucémie myéloïde/lymphoïde (MLL pour Mixed Lineage Leukemia). Enfin nous avons pu tester le niveau d'expression des lignées cancéreuses modèles que sont les cellules HL-60 (Leucémie promyélocytaire) et Kasumi (Leucémie myéloïde) qui révèlent les expressions les plus importantes de  $RPC32\alpha$  dans notre analyse. Nous constatons également que le taux d'expression de  $RPC32\beta$  est relativement stable dans tous ces extraits cellulaires comme nos observations précédentes dans nos différentes lignées cellulaires étudiées pouvaient le laisser présager.

## DISCUSSION

La mise en évidence, au sein du laboratoire du Pr. Teichmann, de deux isoformes distinctes de l'ARN polymérase III chez l'homme a été publiée récemment (Haurie *et al.*,

2010 ). Les travaux présentés dans ce manuscrit ont contribué pour partie à cette publication mais se devaient surtout de participer à une compréhension plus approfondie de l'implication des deux Pol III dans les processus biologiques et notamment lors de la transformation tumorale.

Cette découverte chez l'humain, issue d'une étude *in silico*, est à mettre en parallèle avec les travaux réalisés par le laboratoire du Pr Roeder, qui avait relevé précédemment l'existence des deux isoformes de la Pol III dans les cellules de myélome de souris (Schwartz *et al.*, 1974 ). Ces deux isoformes isolées ne semblaient différer que par la présence de deux protéines de poids moléculaire légèrement différent de 32 kDa et de 33kDa (Sklar et Roeder 1976). Il apparaît évident aujourd'hui qu'il s'agit des orthologues des sous unités RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  que nous avons identifié dans les cellules humaines. La purification de la Pol III à partir de cellules de myélome de souris (MOPC 315) avait conduit à l'identification de deux enzymes distinctes (Pol IIIA et Pol IIIB) qui étaient toutes deux actives pour la transcription des gènes de classe III tout comme cela a été démontré chez l'homme (Haurie *et al.*, 2010 ). Ces deux sous-unités paralogues n'apparaissent au cours de l'évolution que chez les vertébrés mais résultent sûrement d'une duplication du gène ancestral présent chez les organismes détenant les trois ARN polymérase nucléaires comme la levure (cf Annexe1).

## **I. Purification des deux isoformes de l'ARN polymérase III humaine.**

L'observation du profil de migration sur gel SDS-PAGE des deux complexes enzymatiques laissait présager des compositions ne différant que par les deux sous unités homologues de RPC32 seulement. Mais nous devons vérifier s'il n'existait pas d'autres modifications dans la constitution des deux isoformes de la Pol III humaine. Même si l'étude bioinformatique ne met pas en évidence d'autres gènes codants pour des paralogues des sous unités de la Pol III, il pourrait néanmoins exister des formes d'épissages alternatifs, comme pour la sous-unité POLR3E/RPC5 (Raha *et al.*, 2010 ). Les banques de données (par exemple Fast DB ou Uni-ProtKB) renferment différentes formes putatives des protéines composant la Pol III, issues d'épissages alternatifs supposés. Rien ne prouve qu'elles existent mais leur présence dans les banques de données peuvent nous permettre de les identifier grâce à l'interrogation de celles-ci après analyse par spectrométrie de masse. Ainsi une partie de notre

étude a consisté à isoler les deux isoformes distinctes de la Pol III et de déterminer l'ensemble de leur composition. Nous avons pu identifier plusieurs sous unités de chacune des isoformes, mais celles-ci correspondaient aux protéines déjà connues (RPAC1/POLR1C, RPABC1/POLR2E, RPABC3/POLR2H, RPCAC1/POLR1C, RPC1/POLR3A, RPC2/POLR3B, RPC62/POLR3C, RPC53/POLR3D, RPC39/POLR3F, RPC32 $\alpha$ /POLR3G et RPC32 $\beta$ /POLR3GL). Les résultats obtenus ne nous ont pas permis ni d'établir une liste exhaustive des composants des deux complexes enzymatiques ni de caractériser les possibles modifications subies par leurs sous-unités. La seule différence de composition observée reste la présence de RPC32 $\alpha$  dans la Pol III $\alpha$  et RPC32 $\beta$  dans la Pol III $\beta$ .

Nous avons été confrontés à différentes difficultés qui peuvent expliquer cet échec. Le manque de sensibilité peut-être dû aux limites de l'analyse par spectrométrie de masse elle-même. En effet, cette technologie identifie les protéines les plus abondantes et ne permet donc pas ou peu la détection des protéines moins représentées. Le problème réside donc dans la possibilité d'isoler des protéines d'interaction forte mais peu abondante par rapport aux protéines présentes dans l'éluat de l'immunopurification, ou encore de distinguer les protéines spécifiques au complexe mais d'interaction faible et donc moins co-purifiées. De plus, l'utilisation de billes de M2-agarose entraîne l'immunopurification de contaminations déjà décrites (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008 ). Cet ensemble de contaminants est inévitablement co-purifié lors d'une telle stratégie d'immunoprécipitation à l'aide de bille d'agarose (tableau annexe 2 et 2bis).

Malgré nos efforts pour augmenter la quantité de matériel, limiter les contaminants en fractionnant les extraits nucléaires, et préférant même l'utilisation de billes magnétiques pour éviter les co-purifications aspécifiques, nous avons toujours été à la limite du seuil de détection des appareils de spectrométrie de masse. Ainsi lors de la deuxième procédure nous avons identifié moins de sous-unités de la Pol III $\beta$  que dans lors de la première expérimentation.

La difficulté de l'immunopurification des deux complexes est également dû au manque d'anticorps spécifiques des deux isoformes de la Pol III. Pour cette raison, nous avons cloné les deux sous-unités paralogues RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  dans le vecteur d'expression

pBabe permettant l'ajout d'une étiquette FHM (Flag-HA-Myc) aux deux protéines. Et ce fût grâce à cette étiquette que les deux Pol III ont pu être distinctement isolées grâce à l'expression de FHM-RPC32 $\alpha$  ou de FHM-RPC32 $\beta$  dans des lignées de cellules HeLa. Néanmoins, même si nous avons démontré la possibilité de détecter les sous-unités étiquetées lors de l'analyse western blot de la Pol III immunoprécipitée grâce à aux anticorps dirigés contre la sous-unité RPC39 (Fig.7), l'ajout de l'étiquette semble limiter l'intégration de la sous-unité dans le complexe. En effet l'analyse western blot des différentes fractions obtenues par chromatographie sur colonne EMD-DEAE-Fractogel, révèle que la sous-unité FHM-RPC32 $\alpha$  n'est pas enrichie dans les mêmes fractions que le reste des sous-unités de l'ARN Pol III dont la forme endogène de RPC32 $\alpha$  (Fig.9). Ce résultat indique que soit la sous-unité RPC32 $\alpha$  étiquetée n'est pas incorporée en totalité dans des complexes enzymatique Pol III et qu'il subsiste une partie importante de FHM-RPC32 $\alpha$  « libre » dans le noyau, soit que l'intégration au sein de la polymérase est moins stable que pour la protéine endogène non-étiquetée. L'incorporation limitée des protéines étiquetées dans la Pol III pourrait restreindre le nombre de polymérases potentiellement purifiées par immunoprécipitation et donc expliquer en partie le manque de matériel pour l'analyse par spectrométrie de masse. Nous appuyons cette hypothèse sur le fait que lorsque nous analysons par western blot l'ARN Pol III dans les cellules transformées par la surexpression de FHM-RPC32 $\alpha$ , nous observons un signal plus intense pour la forme endogène que pour la forme ectopique étiquetée (Fig.17). L'auto-activation de l'expression de RPC32 $\alpha$  endogène est également une possibilité à envisager.

Dans le laboratoire, nous avons observé que RPC32 $\beta$  était exprimée dans tous les tissus analysés et semblait être indispensable pour la survie des cellules. Ainsi nous en avons déduit que la Pol III $\beta$  représentait la forme ubiquitaire de la Pol III humaine. RPC32 $\alpha$  montrait un profil d'expression restreint aux cellules souches embryonnaires indifférenciées humaines et aux cellules transformées. De plus, l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  dans les cellules partiellement transformées augmentait la transformation en association avec une régulation de la transcription de certains gènes spécifiques. Ces résultats soulignaient les fonctions importantes de RPC32 $\alpha$  dans l'établissement et le maintien des cellules tumorales (Haurie *et al.*, 2010 ).

Dans ce manuscrit nous avons rapporté les résultats obtenus dans l'approfondissement de l'étude des modifications d'expressions induites par la surexpression des deux sous-unités paralogues de RPC32.

## **II. La machinerie Pol III impliqué dans la régulation de la chromatine et la transcription Pol II**

Il avait été démontré que la surexpression du gène ARNt Met initiateur, spécifiquement transcrit par la Pol III, pouvait mener à la transformation des fibroblastes 3T3 de souris (Marshall *et al.*, 2008). Nous avons également remarqué que l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  conduisant à la transformation tumorale des fibroblastes IMR90 exprimant E6/E7, induisait une surexpression de cet ARNt Met initiateur, alors que cela n'était pas le cas pour d'autres gènes du même type comme celui codant pour l'ARNt Glu (Haurie *et al.*, 2010 ). L'expression de ces deux transcrits nécessite néanmoins la reconnaissance de leurs promoteurs par les mêmes facteurs que sont TFIIC et TFIIB. Nous avons donc étudié la régulation des ces facteurs de transcription. L'analyse RT-qPCR de l'ARN extrait de la ligné IMR90/E6/E7 transformée par RPC32 $\alpha$ , révélait une sous expression globale des différents gènes codants pour les sous-unités constituant ces facteurs dont la protéine TFIIC110 (Fig.13A). Même si nous nous devons d'être prudents dans l'interprétation de ces résultats, la régulation négative de TFIIC110 a néanmoins été confirmée par l'étude western blot (Fig.13A). Il était difficilement compréhensible l'association de la surexpression de l'ARNt Met initiateur, avec la sous expression d'un des constituants des facteurs essentiels à sa transcription. Or la régulation de transcription différente pour des gènes possédant le même type 2 de promoteur pouvait laisser supposer l'existence d'autres facteurs de transcription, ou des modifications des facteurs déjà décrits. D'ailleurs, il a déjà été isolé deux formes du facteur TFIIC dont l'une, dite active, contient la sous-unité TFIIC110 et une autre décrite comme inactive où la sous-unité TFIIC110 est remplacée par une autre protéine de 70 kDa mais qui n'a jamais encore été caractérisée (Sinn *et al.*, 1995 ).

Nous nous sommes alors interrogés sur la composition du facteur de transcription de la machinerie Pol III, TFIIC, dans les cellules surexprimant RPC32 $\alpha$ . Mais en immunopurifiant le complexe TFIIC à partir des lignées transformés par RPC32 $\alpha$ , nous avons détecté par



western blot la présence de la protéine TFIIC110 au sein du complexe TFIIC (Fig.13C). Il est donc possible que la sous-unité TFIIC110 soit suffisamment exprimée pour la formation du facteur TFIIC connu « actif » mais que celui-ci coexiste avec une autre forme dont la composition et le rôle n'a pas encore été défini. Il est également possible que la cellule possède une boucle de régulation négative qui permettrait de corriger une dérégulation induite par la surexpression de RPC32 $\alpha$ . Dans ce cas, la régulation rétroactive amènerait à une sous-expression de TFIIC110 dans le but de limiter la transcription Pol III. Cette régulation négative de l'expression de TFIIC110 serait alors limitée par le niveau d'expression de cette protéine qui est nécessaire pour la survie d'une cellule.

Ainsi, nous observons la sous-expression drastique de TFIIC110 mais qui ne conduit tout de même pas à la déplétion du facteur de transcription TFIIC. La régulation de TFIIC110 dans les cellules transformées reste particulièrement intéressante. Lors d'une étude des sites de fixation de TFIIC sur l'ensemble du génome de la levure *S. cerevisiae*, il avait été remarqué la présence du complexe sur un site appelé ETC (pour Extra-TFIIC) situé en amont du gène TFC6 et qui code pour la sous-unité orthologue de TFIIC110 chez la levure (Moqtaderi et Struhl 2004 ). Ceci suggérait que TFIIC pouvait autoréguler le promoteur de TFC6, puis il a également été prouvé que la surexpression de la protéine Tfc6 régule négativement l'expression de son propre gène (Kleinschmidt *et al.*, 2011 ). Il est important de noter ici la capacité du complexe TFIIC à réguler directement un promoteur Pol II. De plus, il a été démontré qu'un site ETC qui ne lie que TFIIC sans le reste de la machinerie Pol III, était suffisant pour former une barrière chromatinienne pour la transcription Pol II (Simms *et al.*, 2008). L'existence de ces sites ETC chez la levure, associée aux études d'immunoprécipitation de la chromatine sur génome entier chez l'homme (Moqtaderi *et al.*, 2010 ; Oler *et al.*, 2010 ; Raha *et al.*, 2010 ), démontre que le facteur TFIIC se lie à la chromatine de manière bien plus importante que supposé jusqu'à présent. La fixation de TFIIC en l'absence de TFIIB ou de la Pol III pourrait donc jouer un rôle majeur dans l'organisation chromosomique chez les eucaryotes (pour revue White 2011 ; Donze 2011).

Les études d'immunoprécipitation de la chromatine sur génome entier (Barski *et al.*, 2010 ; Canella *et al.*, 2010 ; Moqtaderi *et al.*, 2010 ; Oler *et al.*, 2010 ; Raha *et al.*, 2010 ) démontrent également la co-localisation relativement fréquente, de la Pol II (avec l'ensemble de ces facteurs de transcription) et du facteur TFIIC associé avec la machinerie Pol III complète, notamment sur les sites ETC. Sur ces sites de co-localisation de TFIIC, TFIIB et

de la Pol III, il est également retrouvé les modifications des histones (H3K4me3 et H3K9Ac) précédemment décrites comme étant associées à des gènes activement transcrits par la Pol II. Il est alors envisageable que le facteur TFIIC et la Pol III, par leur présence sur des promoteurs Pol II, participent directement à l'importante dérégulation observée, de l'expression des gènes de classe II transcrits dans les cellules transformées par la surexpression de RPC32 $\alpha$ . Ceci démontrerait que la régulation de la transcription Pol II par la Pol III ne s'effectuerait pas seulement à travers des mécanismes indirects. Des études approfondies sur l'impact de la composition protéique du complexe TFIIC semblent être particulièrement intéressantes. Nos investigations futures devraient nous conduire vers la purification et la caractérisation du complexe TFIIC issu des cellules IMR90/E6/E7 surexprimant RPC32 $\alpha$ , et déterminer la fonction de ce facteur dans la transformation tumorale induite par RPC32 $\alpha$ .

Chez les eucaryotes, les gènes peuvent être transcriptionnellement inactivés par modifications des histones, notamment par méthylation. Ces modifications permettent le recrutement des protéines pour la formation d'hétérochromatine qui inhibe la transcription. L'une des modifications typiquement décrites associées à l'inactivation des gènes, est la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Ce processus de régulation nécessite l'intervention des complexes PRC (Polycomb Repressive Complex). Les gènes du groupe Polycomb codent pour des composants des complexes répresseurs de la transcription qui sont essentiels aux processus épigénétiques du développement cellulaire. Il est distingué deux complexes répressifs Polycomb appelés PRC1 et PRC2. Le complexe PRC2 est composé de EZH1/2 (Enhancer of Zeste Homolog 1 ou 2), de SUZ12 (Suppressor of Zest 12) et d'EED (Embryonic Ectoderm Development). SUZ12 et EED sont nécessaires à la stabilité du complexe et à l'activité méthyltransférase d'EZH1/2 qui catalyse l'addition de groupes méthyles sur H3K27 (pour revue Schwartz et Pirrotta 2007). La triméthylation de H3K27 sert de point d'ancrage pour le complexe PRC1 qui a une composition plus variable mais présentant un noyau constitué de RING1A/B et BMI, associé à ML18 ou NSPC1. PRC2 par la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3, initie ainsi la répression transcriptionnelle qui reste réversible rapidement, tandis que PRC1 qui reconnaît cette marque épigénétique, maintient les conditions répressives par l'ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 121 (Margueron et Reinberg 2011). Ce mécanisme de régulation est notamment connu pour la régulation du gène codant pour la protéine p16.

En fait ce gène CDKN2A/p16<sup>INK4a</sup> n'est pas seulement régulé par la triméthylation de H3K27, mais également par la triméthylation de H3K4. La triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 est réalisée par les complexes Trithorax, antagonistes des complexes Polycomb. Cette triméthylation de H3K4 seule est associée aux gènes activement transcrits. L'ensemble des deux triméthylations (H3K4 et H3K27) est connu sous le nom de « marque bivalente » (Bernstein *et al.*, 2006). Cette marque bivalente représente une modification chromatinienne qui est typiquement retrouvée aux promoteurs des gènes qui doivent être inactifs à un stade précoce de l'embryogénèse, mais qui doivent être ensuite activés lors du processus de différenciation cellulaire qui accompagne le développement d'un organisme multicellulaire. L'activation de l'expression de ces gènes se fait par l'enlèvement de la triméthylation sur la lysine 27 de l'histone H3, conduisant à une simple triméthylation sur la lysine 4. De nombreuses études ont souligné les rôles des protéines Polycomb dans le maintien de la pluripotence des cellules souches en réprimant les gènes codants des facteurs de transcription spécifiques, empêchant ainsi de la différenciation (Rajasekhar et Begemann 2007). Dans la littérature, il est intéressant de relever qu'une étude par approche double hybride a démontré l'interaction entre une sous-unité de TFIIC (TFIIC220) avec une sous unité de complexe PRC2 (la méthyltransférase EZH2) (Stelzl *et al.*, 2005), et d'autres travaux, les associations de TFIIC avec des histones acétyltransférases et désacétylases qui régulent également l'état de la chromatine (Kundu *et al.*, 1999 ; Venters *et al.*, 2011). La voie de régulation de la chromatine par les complexes Polycomb a été particulièrement étudiée pour l'expression de la famille des gènes contenant un homeodomaine (ou homeobox) dont les gènes Hox. Les recherches chez *drosophila melanogaster*, très actives dans ce domaine, décrivent l'existence de huit gènes Hox pour la mouche alors qu'il y en a 39 présents chez l'homme. Disposés en quatre groupes (de A à D) sur différents chromosomes, ces clusters se composent de 13 séquences paralogues. Ces gènes sont régulés au cours du développement et permettent la détermination et le maintien de l'identité cellulaire selon l'axe antéro-postérieur.

Nous avons ainsi remarqué un lien possible entre la régulation des transcrits Pol II et la machinerie la Pol III à travers des modifications chromatiniennes. Au cours de nos travaux nous avons observé que la transformation des cellules surexprimant la sous-unité RPC32 $\alpha$ , était liée à la forte régulation de l'expression de deux gènes, codant pour les protéines p16 et p53. Ainsi de façon intéressante, alors que l'expression de CDKN2A/p16<sup>INK4a</sup> est décrite comme étant surexprimé en réponse à l'inactivation de pRB par l'oncoprotéine virale E7, la

surexpression de  $RPC32\alpha$  entraîne une très forte sous expression de  $CDKN2A/p16^{INK4a}$  au niveau ARNm ainsi que protéique. p16 est un inhibiteur du cycle cellulaire en phase G1 qui régule négativement l'activité des kinases cycline-dépendantes CDK4 et CDK6. Il est important de noter qu'une forte expression de p16 a été observée dans les cellules sénescents (Stein *et al.*, 1999 ). TP53 code pour un suppresseur de tumeurs majeur qui est muté dans la moitié des cancers (Hollstein *et al.*, 1991). TP53 induit l'expression de P21, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire. De plus, TP53 active la transcription de gènes codants pour des protéines participant à l'induction de l'apoptose (par exemple PUMA ou BAX). TP53 peut être activé par le dommage d'ADN via des kinases comme CHK1 ou CHK2 ou le raccourcissement de l'ADN aux télomères reconnu également comme dommage à l'ADN. Sachant que le mécanisme des complexes Polycomb par la marque bivalente, est commun à la régulation du gène  $CDKN2A/p16^{INK4a}$ , et des gènes Hox dans le développement, et ayant mis en évidence précédemment, la régulation de  $RPC32\alpha$  au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires H1, nous nous sommes donc demandé si les gènes Hox pouvaient être régulés dans les lignées transformées par  $RPC32\alpha$  comme l'est  $CDKN2A/p16^{INK4a}$ . La mise en évidence de la sous expression de certains gènes Hox spécifiquement exprimés dans les fibroblastes de poumon (notamment HOX B3 et HOXB6) est un argument supplémentaire pour l'implication de  $RPC32\alpha$  dans le maintien de l'état non différencié des cellules. Cette dérégulation des gènes Hox révèle la perte d'identité des cellules transformées par la surexpression de  $RPC32\alpha$ . De façon remarquable, les gènes sujets au « silencing » épigénétique dans les cancers correspondent en grande partie à des gènes réprimés par la voie Polycomb dans les cellules souches embryonnaires (Schlesinger *et al.*, 2007 ; Widschwendter *et al.*, 2007). Les gènes Hox codent pour des facteurs de transcription fortement conservés avec des rôles clés dans le développement normal (Dickson *et al.*, 2009). En contrôlant des voies de signalisation, les protéines Hox déterminent précisément l'identité cellulaire et la position des types cellulaires spécifiques le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon en développement.

Ainsi, l'organogenèse et la cancérogenèse font part de mécanismes communs. La fonction des gènes Hox dans la cancérogenèse est peu connue, mais la dérégulation de l'expression d'un bon nombre d'entre eux est tout de même présentée dans la littérature. Des gènes Hox ont été décrits avec une expression anormale dans les tumeurs parathyroïdiennes dites familiales et sporadiques (Shen *et al.*, 2008 ). Beaucoup d'autres tumeurs montrent la

variation d'expression des gènes Hox en comparaison avec les tissus normaux et présentent notamment une expression différentielle dans les astrocytomes, les glioblastomes, et médulloblastomes (Abdel-Fattah *et al.*, 2006). Les gènes Hox semblent être également impliqués dans la régulation de la motilité cellulaire et l'invasivité (Klausen *et al.*, 2009). Un large panel de gènes Hox est impliqué et peut influencer la formation de tumeurs mais le mécanisme par lequel les gènes Hox jouent ce rôle n'est pas encore pleinement compris. Dans le cas du cancer du sein humain, il a même été constaté que la perte d'expression du gène HOXA5 régula négativement l'expression du suppresseur de tumeur p53 (Raman *et al.*, 2000).

### **III. Régulation globale du transcriptome induite par la surexpression des paralogues RPC32 $\alpha$ et RPC32 $\beta$**

Pour ce projet décrit jusqu'à maintenant, nous avons toujours essayé de répondre à une question précise par la mise en œuvre d'expériences ciblées sur la question posée. Ces résultats ont été très intéressants, notamment pour l'observation de la régulation d'expression de TP53, de CDKN2A/p16<sup>INK4a</sup> et des gènes HOX suite à l'expression ectopique de la sous unité RPC32 $\alpha$ . Par contre, ces expériences ne nous ont pas donné une vision globale de la régulation de l'expression de la totalité de gènes transcrits par la Pol II suite à la surexpression de RPC32 $\alpha$  ou de RPC32 $\beta$  dans les cellules IMR90/E6/E7. Ainsi, lors du choix d'une technologie pour évaluer l'action sur l'ensemble du transcriptome de la surexpression des sous unités RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ , la RT-qPCR nous paraissait assez coûteuse et laborieuse principalement dû à la sélection des amorces pour des milliers de séquences et aux difficultés observées pour la lignée surexprimant RPC32 $\alpha$ . Donc pour analyser et comparer l'expression de la totalité des gènes transcrits par la Pol II dans chaque lignée de cellules, nous avons choisi l'analyse par microarray.

Les biopuces commerciales (ou microarrays) se sont avérées un choix judicieux puisqu'elles permettaient de mesurer l'expression de la quasi totalité des transcrits Pol II par l'intermédiaire de milliers de sondes d'oligonucléotides complémentaires aux séquences ARN issues de l'extraction des lignées de notre analyse. Et avec cette technologie des puces ADN qui contribue à la caractérisation complète de divers processus cellulaires, l'intérêt pour notre

étude était clairement de pouvoir identifier l'impact de la surexpression des sous-unités RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$  sur l'ensemble du transcriptome de la Pol II. En outre, les résultats attendus nous permettaient d'envisager la construction d'une vue plus large de l'ensemble des modifications d'expressions induites par la Pol III. Néanmoins, diverses études comparatives ont été publiées au cours des dernières années, et l'observation générale sur l'exactitude, la fiabilité et la reproductibilité des investigations conduit à un optimisme prudent (Cahan *et al.*, 2007).

Dans le cadre de cette étude, que ce soit pour la lignée IMR90/E6/E7 contrôle ou pour les lignées tests IMR90/E6/E7 surpexprimant l'une des deux isoformes, toutes les biopuces ont été réalisées en triplicata. Pour obtenir une liste de gènes régulés, deux étapes ont été nécessaires. Il a fallu normaliser les données puis choisir comment déterminer les gènes différentiellement exprimés. La liste de gènes obtenue, après avoir appliqué l'équation d'expression différentielle, était largement tributaire de la méthode de normalisation. Il était problématique pour nous de sélectionner une seule méthode de normalisation puisque chaque méthode faisait ressortir un certain nombre de gènes régulés qui étaient différents d'un algorithme à l'autre. Nous avons donc choisi d'utiliser 3 algorithmes différents (RMA, GCRMA, PLIER) pour bénéficier de leur puissance d'analyse (Irizarry *et al.*, 2006) mais de ne retenir que les gènes présents dans l'intersection des 3 groupes issus de chaque requête. Cette méthodologie très stringente apporte ainsi un réel poids dans la pertinence des gènes identifiés comme différentiellement exprimés. Nous noterons tout de même que les gènes les plus fortement régulés sont toujours détectés quelle que soit la méthode de normalisation employée.

Des logiciels sont disponibles en ligne pour déterminer quelles voies particulières peuvent être impliquées lors de la régulation du nombreux transcrits. Pour nous aider dans nos investigations nous avons utilisé le programme KEGG. Nos résultats ont montré que le processus cellulaire majeur régulé suite à la surexpression de RPC32 $\beta$  était la réponse immunitaire et inflammatoire (cf tableau annexe). Ainsi de nombreuses cytokines impliquées dans des voie de signalisation des chimiokines, des régulateurs du facteur de transcription NF-kappaB (NFKBIA et NFKBIZ), étaient sous exprimés. Ce résultat était un peu surprenant de prime abord mais permettait d'envisager une fonction de l'isoforme beta de la Pol III. Il a été démontré que l'utilisation de vecteurs rétroviraux et la transfection d'ADN double brin, comme dans notre modèle d'étude, pouvait entraîner une stimulation de la réponse interféron



de type-I et notamment l'expression du gène OAS1 (Pebernard et Iggo 2004 ; Chiu *et al.*, 2009). Nous avons observé avec étonnement que ce gène OAS1, ainsi que les gènes OAS2, OAS3 et OASL, qui sont impliqués dans la stabilité des ARNm et dans des processus physiologiques comme la division cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Samuel 2001 ), étaient fortement sous exprimés dans la lignée IMR90/E6/E7 surexprimant la sous unité RPC32 $\beta$ . De nombreux gènes définis comme étant induits par les interférons le sont également (IFI27, IFI35, IFI44, IFI44L, IFI6, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IFITM1, ISG20). Cette régulation est particulièrement intéressante, car nous pouvons imaginer que la transfection à l'aide du vecteur rétrovirale pBabe des éléments génétiques E6/E7 déclenche la réponse immunitaire de la cellule telle qu'elle est décrite dans la littérature. Mais la surexpression de RPC32 $\beta$  semblerait donc inhiber le phénomène.

L'implication de la Pol III dans la réponse immunitaire a déjà fait l'objet de publications démontrant le rôle senseur du complexe pour l'induction de la réponse immunitaire innée, à travers la voie de signalisation RIG-I (Retinoic acid-induced gene I) (Samanta *et al.*, 2006 ; Chiu *et al.*, 2009 ; Ablasser *et al.*, 2009). Les travaux de Chiu révèlent ici un intérêt captivant, car l'activité de synthèse d'ARN induisant la réponse interféron de type-I par la Pol III *in vitro*, a été démontrée à partir du complexe immunoprécipité à l'aide d'une étiquette Flag sur la sous-unité RPC32 $\alpha$ . Il est donc tout à fait possible que la surexpression de la sous-unité RPC32 $\beta$ , par compétition avec l'isforme alpha, inhibe la réponse immune innée par interféron de type-I. Nous noterons tout de même que les deux publications (Chiu *et al.*, 2009 et Ablasser *et al.*, 2009) s'opposent sur la nécessité du complexe ternaire dans la constitution de la Pol III pour l'induction d'interféron de type-I. Pour Ablasser et ses collaborateurs, l'activité de transcription Pol III nécessaire à l'induction de cette réponse, serait indépendante de la présence de RPC32 $\alpha$  et de RPC62 soit deux des trois composants du complexe ternaire. Ils en déduisent que c'est tout le complexe ternaire qui est inutile pour cette activité et base leur hypothèse sur l'activité connue et décrite, de la transcription indépendante des promoteurs de la Pol III en absence des sous unités RPC32, RPC39 et RPC62 (Wang et Roeder 1997).

Nous avons également remarqué que l'interleukine 6 (IL-6) ainsi que l'interleukine 8 (IL-8) et l'interleukine 1 (IL-1A et IL-1B), qui sont décrites comme les interleukines pro-inflammatoires les plus actives, sont sous exprimées dans les cellules surexprimant RPC32 $\beta$ .



De façon intéressante nous avons déjà constaté dans des expérimentations menées précédemment au laboratoire, la surexpression de l'IL-6 dans les lignées transformées par RPC32 $\alpha$  (Sup. data Haurie *et al.*, 2010 ). Même si cette surexpression ainsi observée dans les cellules transformées par RPC32 $\alpha$  n'est pas vérifiée par l'étude des biopuces alpha, il reste néanmoins intéressant de noter cette régulation de l'interleukine 6 qui joue un rôle prédominant dans l'inflammation chronique et la croissance tumorale (pour revue Neurath et Finotto 2011), et également dans les processus de formation de cellules souches cancéreuses (Iliopoulos *et al.*, 2011 ). L'ensemble de ces observations tend à démontrer l'implication de RPC32 $\beta$  dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en participant à l'inhibition des processus biologiques liés à l'inflammation et à la prolifération.

Nous avons aussi relevé la sous-expression de nombreuses variantes d'histones (HIST1H1C, HIST1H1E, HIST1H2BD, HIST1H2BE, HIST1H2BH, HIST1H2BI, HIST1H2BJ, HIST1H2BK, HIST1H3H, HIST1H4H, HIST2H2AA3, HIST3H2A et H2BFS). Chez les eucaryotes, l'ADN est compacté dans le noyau. Les quatre histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4 forment un octamère constitué de deux molécules de chacun d'entre eux, autour duquel s'enroulent 146 paires de bases pour constituer les nucléosomes. Cette structure permet la condensation de l'ADN nucléaire. Alors que ces histones ont le rôle premier de l'empaquetage du génome, les variantes d'histones sont décrites pour avoir un rôle dans la ségrégation des chromosomes, la régulation transcriptionnelle, la réparation de l'ADN et d'autres processus cellulaires. Ainsi au cours de l'évolution, il y a eu spécialisation des variantes d'histones pour la réalisation de tâches supplémentaires (Talbert et Henikoff 2010). Il n'y a que peu d'éléments dans la littérature pour l'expression de ces gènes en particulier qui codent pour des variantes des protéines histones. Nous retiendrons néanmoins que la perte des histones semble être associée au vieillissement cellulaire (Feser et Tyler 2011).

Par opposition, parmi les gènes issus de l'analyse des puces alpha, nous avons remarqué également la surexpression de 4 gènes codants pour des variantes d'histone H2A (HIST1H2AB, HIST1H2AD, HIST1H2AI, HIST1H2AJ). Là encore il est difficile d'attribuer une quelconque fonction. Mais il est intéressant de penser que si la disparition des histones dans la cellule est associée au vieillissement de la celle-ci, alors leur surexpression pourrait être associée au « rajeunissement » cellulaire induit par la surexpression de RPC32 $\alpha$ . Nous devons néanmoins noter que même si la perte protéique des histones est associée au vieillissement

des cellules, il est observé dans ces mêmes cellules une surexpression ARN des gènes codants pour ces histones (Feser et Tyler 2011). Ainsi il est très difficile de tirer des conclusions sur la modification d'expression des gènes histones même si leur régulation semble être opposé entre les lignées cellulaires surexprimant RPC32 $\alpha$  et celles surexprimant RPC32 $\beta$ .

L'analyse des résultats issus des puces alpha ne faisait pas apparaître de voie de signalisation particulièrement régulée. Mais il faut également rappeler que la liste de gènes régulés par la surexpression de RPC32 $\alpha$  est largement incomplète à cause des difficultés rencontrées pour la technique de microarray avec les échantillons des cellules surexprimant la sous unité RPC32 $\alpha$ . Néanmoins, des logiciels tel que celui utilisé pour notre analyse (intégré dans GEASE), mettent en évidence et classent les gènes régulés grâce à la nomenclature de Gene Ontologie. Nous devions pour cela nous replacer dans les contextes pour le choix des mots clés. Ce fût une méthode nous permettant un regroupement des gènes selon leur association à des processus grâce à des termes communs dans leur définition. Cela a évité d'avoir à jauger chaque gène sur une base individuelle, mais cela ne nous apporte aucune certitude. Ainsi, nous avons pu isoler grâce à la convention Gene Ontology les gènes comme FGF-10, PAX6, PAX8, NODAL, pour les plus connus, qui sont impliqués dans le développement et la différenciation cellulaire. Confirmant ainsi l'impact de RPC32 $\alpha$  dans ces voies de régulation. Nous pouvions relever également la surexpression du gène MLL2. Initialement nommé ainsi pour sa corrélation avec l'apparition de leucémie myéloïde/lymphoïde, ce gène code une méthyltransférase impliquée dans la méthylation des histones et plus précisément dans la marque activatrice de transcription qu'est la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3. Cette protéine fait parti de la famille des régulateurs Trithorax qui régulent la chromatine à l'inverse des complexes Polycomb. Egalement impliquées dans le développement, les protéines MLL sont conservées dans l'évolution (Ernst *et al.*, 2004). Une publication très récente démontre le rôle important de MLL2 dans la surexpression de HOXC6 en réponse aux œstrogènes (Ansari *et al.*, 2011). Ce qui est intéressant c'est que HOXC6 est l'un des gènes les plus fortement surexprimés dans les lignées transformées par RPC32 $\alpha$ . De plus, HOXC6 a déjà été démontré comme étant positivement régulé dans différents cancers et notamment du poumon (Bodey *et al.*, 2000 ; Castronovo *et al.*, 1994; McCabe *et al.*, 2008 ). Ainsi, en plus de l'aspect développement et différenciation nous relevons encore la surexpression de gènes impliqués dans la transformation tumorale. Très étudiés pour leur rôle clé dans les processus de cancérisation,

les gènes PTEN et HDM2 sont également surexprimés. La régulation positive de l'oncogène HDM2 est facilement intégrable dans les fonctions oncogéniques de RPC32 $\alpha$ , tandis que la surexpression du suppresseur de tumeurs PTEN se fait peut-être dans le cadre d'un mécanisme régulateur pour limiter la croissance induite par RPC32 $\alpha$ .

#### **IV. Limites de l'analyse de l'expression ARN.**

Plusieurs gènes spécifiques validés par RT-qPCR ont été rejetés lors des normalisations des résultats. En plus des variations de sensibilité inhérente de la technique des biopuces, le choix de la méthode de normalisation a eu aussi un impact sur la décision de rejeter ou non un gène, et d'autant plus si son niveau d'expression était proche du seuil critique de détection. Les gènes identifiés étaient pour la plupart modulés de manière identique, sauf que la régulation pour certains d'entre eux était plus prononcée avec une méthode de normalisation qu'avec une autre. Ainsi un gène pouvait apparaître avec une méthode de normalisation et pas avec une autre. Et n'ayant retenu que l'intersection des trois méthodes de normalisation, si un gène n'était pas relevé par l'un des trois algorithmes, il était absent des résultats finaux. Ceci explique notamment l'absence dans nos résultats des gènes RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ .

De plus, les résultats que nous obtenons sont indissociables du niveau de confiance que nous accordons aux données recueillies. C'est en cela que nous devons prendre les résultats des puces « alpha » avec prudence. Il semblerait que la transformation tumorale induite par RPC32 $\alpha$  modifie grandement la composition ARN des cellules. Ces modifications sont telles qu'elles semblent diluer les ARN transcrits par la Pol II, d'au moins un facteur 100 (annexe 3). Cela n'est pas très dérangeant pour les gènes transcrits allégrement dans la cellule, comme les gènes transcrits par la Pol III ou comme notre gène de référence qui est la beta-actine. Néanmoins, pour une majorité de gènes faiblement transcrits, nous ne pouvons déterminer avec certitude si leur régulation négative, évaluée par RT-qPCR ou par microarrays, est réelle, ou si nous avons perdu le moyen de les détecter à cause d'une forte dilution.

Pour l'analyse RT-qPCR, cela se traduisait par l'absence d'amplification ou l'apparition d'un signal après 32 cycles d'amplification (ou Ct). La possibilité d'augmenter fortement la quantité d'ADNc pour les réactions de qPCR avait ses limites car cela menait à la saturation du système avant de pouvoir ressortir de l'information pour encore un bon nombre de gènes. De plus, pour les gènes dont l'amplification n'était possible que dans ces conditions optimisées, nous observions une mauvaise reproductibilité des résultats. C'est pour cela que dans ce manuscrit nous prenons énormément de précaution pour la présentation de sous-expression ARN dans les lignées transformées pour lesquelles nous n'avons pas d'observation d'une régulation protéique corrélée.

Nous pensions que la sensibilité de la technologie des biopuces pouvait contourner la difficulté mais cela ne fut pas le cas. Ainsi, un signal a été détecté que sur 8% de la surface des puces sur lesquelles a été déposé l'ARNc synthétisé à partir des extraits ARN des IMR90/E6/E7 transformées par RPC32 $\alpha$ . A titre de comparaison, pour les autres puces sur lesquelles a été déposés l'ARNc obtenu par les extraits ARN des cellules IMR90/E6/E7 ou surexprimant RPC32 $\beta$ , un signal était détecté sur 45% de la surface des puces. La comparaison de concordance des gènes identifiés par les différentes méthodes de normalisation (RMA, GCRMA et PLIER) révèle des profils d'expressions similaires, même pour les puces alpha. Étonnamment, les trois répliques alpha étaient extrêmement proches, et présentaient une valeur de reproductibilité équivalente aux autres répliques entre eux.

Il a été revérifié (également par Genome Explorations) l'intégrité des ARN extraits et la quantité de ceux-ci mais aucune anomalie flagrante ne pouvait être observée (annexe 4). Mais il s'avère que des résultats semblables ont pu déjà être observés pour des extraits ARN à partir de sang total (Vartanian *et al.*, 2009). Dans ce cas, l'ARN codant pour la globine est tellement présent qu'il fausse la quantification et biaise les résultats. Ayant déjà mis en évidence la surexpression importante de transcrit Pol III dans la lignée transformée par RPC32 $\alpha$  (Haurie *et al.*, 2010), nous pouvons penser qu'il s'agissait d'un transcrit Pol III dans notre cas. Néanmoins, lorsque les ARN codants pour la globine perturbent les résultats, il apparaît nettement dans l'électrophoregramme capillaire du bioanalyseur Agilent. En ce qui concerne les électrophoregrammes réalisés sur le bioanalyseur Agilent pour tester nos extraits ARN, aucune trace d'ARN perturbateur n'apparaît (annexe 4). De cette réflexion nous déduisons deux hypothèses. La première serait que le biais observé résulte d'ARN transcrits

spécifiquement par la Pol III, mais qui seraient de taille très variée pour ne pas faire apparaître un profil différent dans l'électrophoregramme. Et nous pensons alors aux séquences Alu dont la transcription par l'ARN Pol III est démontrée mais dont les fonctions sont encore mal connues. La deuxième hypothèse, et qui nous paraît la plus probable, serait une augmentation de la quantité de transcrits Pol I. En effet, pour les ARNr de classe I il est communément admis qu'ils représentent dans les cellules normales environ 75% de la population totale d'ARN. Une surexpression d'un facteur deux dans les cellules transformées par RPC32 $\alpha$  pourrait entraîner une dilution de même ordre que celle observée pour le gène de la beta-actine (annexe 4). De plus étant les ARN détectés et quantifiés par le bioanalyse Agilent, les profils obtenus ne varieraient pas ou très peu, ce qui est notre cas (cf Annexe). Des tests préliminaires nous laissent présager une augmentation des ARNr dans les cellules IMR90/E6 /E7 surexprimant RPC32 $\alpha$ . Cette augmentation potentielle de la transcription réalisée par la Pol I lors de cancer a déjà été décrite (Williamson *et al.*, 2006) et la Pol III $\alpha$  semblerait donc ici réguler positivement cette activité Pol I. Cela tend à démontrer une interconnexion encore plus importante que supposée jusqu'alors entre les activités de l'ARN polymérase I et III.

## **V. Implication de RPC32 $\alpha$ dans le développement et la différenciation.**

Il avait été mis en évidence au laboratoire, la sous expression de RPC32 $\alpha$  au cours de la différenciation de cellules souches embryonnaires H1. Cette régulation négative était associée à la diminution de l'expression de facteurs de transcription spécifiques des cellules souches (Nanog, Sox2, Lefty) (Haurie *et al.*, 2010 ). De façon intéressante, nous avons également remarqué dans la littérature, que des expériences de CHIP avaient révélé la présence de ces facteurs de transcriptions spécifiques des cellules souches (Nanog, Sox2, Oct3/4, Lefty) sur la région promotrice de POLR3G codant pour RPC32 $\alpha$  dans les cellules souches embryonnaires mais également dans les cellules cancéreuses agressives (Boyer *et al.*, 2005 ; Ben-Porath *et al.*, 2008). Nous nous demandions alors si la seule sous expression de RPC32 $\alpha$  pouvait induire la différenciation de cellules pluripotentes telles que les NTERA-2. Malheureusement, nous n'avons pas pu démontrer cela à cause de difficultés techniques. Néanmoins l'hypothèse restait particulièrement attirante et d'ailleurs dans une publication très

récente (Wong *et al.*, 2011), les auteurs décrivent le rôle essentiel de RPC32 $\alpha$  dans le maintien de l'état non différencié des cellules souches embryonnaires humaines. Ils ont utilisé la même méthodologie que celle que nous avons envisagée, mais avec plus de réussite. Avec l'induction de l'expression de shARN contre RPC32 $\alpha$ , ils ont pu observer la différenciation des cellules souches et des changements très importants de leur morphologie. Là également ils ont démontré que la différenciation cellulaire induite par la sous expression de RPC32 $\alpha$  était associée à la régulation négative des facteurs Oct4, Sox2 et Nanog. Ils suggèrent ainsi que la sous expression de RPC32 $\alpha$  entraîne une perte de la pluripotence des cellules souches embryonnaires et permet la différenciation des cellules dans les trois feuillettes de l'embryon, le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme.

Ces observations publiées récemment, nos résultats démontrant notamment la dérégulation des gènes Hox, la surexpression de plusieurs des gènes participant au développement cellulaire (dont FGF-10, PAX6, PAX8, NODAL), ou encore la régulation de l'IL-6 dans nos lignées cellulaires transformées par RPC32 $\alpha$ , laissent présager un rôle important de la Pol III $\alpha$  dans la formation de cellules souches cancéreuses (Ben-Porath *et al.*, 2008 ; Rosen et Jordan 2009 ; Tysnes 2010; Iliopoulos *et al.*, 2011 ). Ainsi nous devons nous demander si les cellules IMR90/E6/E7 surexprimant RPC32 $\alpha$ , en plus d'être tumorales, ne présentent pas des caractéristiques de cellules souches. Nos recherches prochaines sur ce point promettent d'être très intéressantes.

Nous relevons également une publication mettant en évidence un impact potentiel de la délétion du gène POLR3G codant pour RPC32 $\alpha$  chez des patients atteints d'un syndrome à l'étiologie inconnue (Engels *et al.*, 2009). Les auteurs ont identifié chez 3 patients souffrant de ce syndrome, une micro délétion somatique entraînant la perte des gènes CETN3, AC093510.2, POLR3G, LYSMD3 et GPR98/MASS1. Ces patients atteints d'un retard psychomoteur sévère souffrent d'anomalies du développement du système nerveux central et de dysmorphie bénigne dont les bases moléculaires ne sont pas encore connues. L'implication de RPC32 $\alpha$  pour la différenciation cellulaire révélée dans ce manuscrit pourrait expliquer en partie les aberrations de développement observées dans cette maladie.

## VI. Régulation de RPC32 $\alpha$ et modifications post-traductionnelles.

Tous les travaux réalisés ont démontré une régulation de la sous-unité RPC32 $\alpha$  contrairement à son homologue RPC32 $\beta$ . Du point de vue transcriptionnel, le niveau d'expression RPC32 $\alpha$  semble inversement corrélé à l'état de différenciation de la cellule (Haurie *et al.*, 2010 ; Wong *et al.*, 2011). L'observation de la dérégulation de gènes impliqués dans la différenciation et le maintien de l'identité cellulaire, nous fait ainsi suspecter une dédifférenciation cellulaire lors de la transformation tumorale des IMR90/E6/E7, induite par la surexpression ectopique de RPC32 $\alpha$ . D'ailleurs, de façon tout à fait intéressante, tout comme la surexpression des gènes Oct3/4, Sox2 en combinaison avec Klf4 et c-Myc (ou Nanog et Lin 28) qui n'amène pas obligatoirement à la formation des cellules IPS (ou Induced Pluripotent Stem Cells), la surexpression de RPC32 $\alpha$  ne transforme pas systématiquement les IMR90/E6/E7. Nous n'avons pas axé nos recherches sur ces lignées non transformées mais leur étude reste néanmoins pertinente. C'est ainsi que nous avons pu constater que la protéine RPC32 $\alpha$  semblait subir des modifications post-traductionnelles.

Plusieurs bandes à des poids moléculaires différents sont ainsi révélées par un anticorps spécifique de RPC32 $\alpha$  lors de l'étude western blot des extraits protéiques des différentes lignées cellulaires. Ces différents signaux pourraient être aspécifiques, mais ils se révèlent particulièrement bien correspondre aux différentes lignées et aux caractéristiques de ces cellules. Une bande à 32 kDa, qui est la masse moléculaire attendue pour RPC32 $\alpha$ , a été observée dans les lignées IMR90/E6/E7 transformées par RPC32 $\alpha$ . Par contre, cette bande à 32 kDa était relativement faible dans les lignées qui expriment de façon ectopique RPC32 $\alpha$ , mais qui ne sont pas transformées. Ces lignées expriment une protéine de 39 kDa qui inversement apparaît moins fortement dans les lignées transformées et qui réagit avec l'anticorps anti-RPC32 $\alpha$ . Cette bande à environ 39kDa nous a orienté vers la recherche d'une modification de RPC32 $\alpha$  et nous nous sommes particulièrement intéressés à la modification possible par un groupement ubiquitine (monoubiquitination) qui rajouterait une masse de 8 kDa à la protéine, ce qui serait compatible à une migration à environ 40 kDa. Nous avons réussi à cloner le gène codant pour l'ubiquitine étiquetée HA-6His dans un vecteur d'expression et établir la lignée IMR90/E6/E7 l'exprimant de façon stable. Mais nos purifications ne nous ont pas encore permis de mettre en évidence l'ubiquitination de RPC32 $\alpha$ .



De même, l'étude des sites de phosphorylation de RPC32 $\alpha$  reste à terminer. Les observations préliminaires laissent supposer que la phosphorylation de RPC32 $\alpha$  est importante pour la transformation des lignées cellulaires. Le nombre de sites potentiellement phosphorylables dans la séquence de RPC32 $\alpha$ , dont certains sont conservés dans l'évolution, laissent penser que d'autres résidus de RPC32 $\alpha$  peuvent être également phosphorylés. L'activation constitutive d'un ou deux sites de phosphorylation de RPC32 $\alpha$  parmi les multiples possibilités n'ont sans doute pas assez changé son état pour modifier sa régulation et son rôle dans la transcription Pol III. Nous noterons également que comme RPC32 $\alpha$  d'autres protéines de la machinerie Pol III sont également phosphorylées lors de la mitose : POLR3E/RPC5 et POLR3C/RPC62 ; BRF2 ; TFIIC220 et TFIIC110 ; PTF $\alpha$ . (Dephoure *et al.*, 2008 ). La phosphorylation de RPC32 $\alpha$  pose le problème du médiateur de cette modification. La phosphorylation de la Pol III est nécessaire pour la transcription. La kinase dont l'activité est connue pour réguler l'activité de la transcription Pol III est la caséine kinase 2 (CK2). La protéine CK2 phosphoryle spécifiquement la sous-unité Bdp1 et inactive la transcription (Hu *et al.*, 2004) ce qui contribue à la répression transcriptionnelle en mitose. Mais l'effet ambivalent de la CK2 sur la transcription Pol III en phase M et en phase S sème le doute sur les cibles de cette kinase et sur sa fonction régulatrice (Hu *et al.*, 2004 ; Johnston *et al.*, 2002). Ainsi, l'impacte de la caséine kinase II sur la transcription Pol III reste clairement à déterminer et est potentiellement un bon candidat pour la régulation de RPC32 $\alpha$ .

La question d'une corrélation entre la régulation post traductionnelle de RPC32 $\alpha$  en générale (et la phosphorylation en particulier) et la transformation tumorale est donc toujours ouverte à ce niveau de nos recherches. Pour vérifier s'il est possible d'établir ce lien, nous devons poursuivre nos investigations.

## **VII. RPC32 $\alpha$ et cellules hématopoïétiques.**

Une partie de ce projet était de confronter nos observations faites au cours de nos travaux sur des cellules en culture avec des données obtenues à partir de cellules de patients cliniques. Au vu de l'impacte de RPC32 $\alpha$  sur la différenciation cellulaire, nous nous sommes intéressés aux cellules hématopoïétiques. La production permanente de cellules par la moelle osseuse est essentielle pour le remplacement des cellules sanguines (hématies, leucocytes,

plaquettes entre autres...) mais aussi pour la réparation tissulaire. Cette fonction est assurée par des cellules souches hématopoïétiques (CSH) tout au long de la vie. Les cellules souches sont définies comme des cellules pluripotentes qui ont la capacité de proliférer par un processus d'auto-renouvellement et de générer des cellules matures d'un tissu particulier par la différenciation. (Weissman *et al.*, 2001). Ces CSH ne représentent que 0,01 à 0,05 % des cellules de la moelle osseuse et la prolifération des CSH entraîne soit un auto-renouvellement simple permettant de maintenir leur nombre et leur pluripotence, soit une division asymétrique qui engendre à la fois une CSH fille, et une cellule plus mature dite progénitrice qui à court terme donnera naissance à un lignage particulier (Ho et Wagner 2007). Ces cellules qui ont perdu leur pluripotence, sortent alors de la moelle osseuse permettant ainsi leur expansion et leur dissémination.

Notre étude s'est portée sur ces cellules pour de multiples raisons. Des gènes qui codent pour des régulateurs du cycle cellulaire tels que, p27<sup>Kip1</sup> ou PTEN (Cheng *et al.*, 2000; Walkley *et al.*, 2005 Zhang *et al.*, 2006), ont été montrés comme régulant les CSH. Ce sont ces mêmes gènes qui ont été identifiés comme étant régulés par la surexpression de RPC32 $\alpha$  ou de RPC32 $\beta$ . Nous remarquerons que PTEN a été démontrée comme régulant le maintien des CSH, à travers une restriction de leur prolifération (Yilmaz *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006). De plus, il est à noter que les progéniteurs hématopoïétiques expriment à leur surface des Toll-like receptor (TLR), comme les cellules de l'immunité innée (Nagai *et al.*, 2006). Et nous avons relevé la régulation de TLR3 lors de la surexpression de RPC32 $\beta$ . Ces récepteurs sont responsables de la reconnaissance de produits bactériens et viraux et par conséquent impliqués dans la survie cellulaire. Or, en présence d'un ligand des TLR, les progéniteurs myéloïdes vont se différencier en macrophages et/ou monocytes, et les progéniteurs lymphoïdes en cellules dendritiques, indiquant donc que l'activation des TLR est suffisante pour engendrer la différenciation hématopoïétique. De plus, la différenciation hématopoïétique est un processus qui est régulé par des cytokines, et les CSH sont sensibles à des facteurs solubles favorisant la survie ou la différenciation (dont IL-1, IL-6, IL-8) (Lacorazza *et al.*, 2006). D'autres gènes sont retrouvés dans notre analyse microarray et ont un impact connu sur ces cellules (BCL2-A1, BMP2 etc...). De plus, nous avons relevé la surexpression des gènes MLL2 et MLLT10 dans les lignées surexprimant RPC32 $\alpha$ , deux gènes dont l'implication dans l'apparition de cancer du sang est démontrée, et qui leur a valu leurs noms.

Des populations de ces lignages hématopoïétiques, peuvent dériver de la transformation maligne d'une cellule souche ou d'un progéniteur multipotent, et entraîner l'apparition de cancer. En fonction du lignage concerné, différents types de cancer peuvent survenir. La leucémie myéloïde aigüe (AML) est une affection sanguine caractérisée par l'envahissement de la moelle osseuse par une population myéloïde immature et monoclonale. Les cellules AML sont caractérisées par une prolifération anarchique et un blocage de la différenciation. Ainsi, les cellules souches ou les progéniteurs devenus malins vont donner naissance à une population myéloïde bloquée à un stade précoce de la différenciation cellulaire et donc incapable de maturation terminale. Un autre type de cancer dit MLL (pour Mixed Lineage Leukemia) est du a des cellules ayant un profil d'expression génique différent des autres leucémies aigües, myéloïde ou lymphoïde. Cette transformation maligne de cellules normales peut être induite par différents mécanismes, conférant à ces dernières un avantage de survie et la perte du potentiel de maturation cellulaire. Mais ces cellules souches normales ou leucémiques, semblent partager les mêmes grandes voies de signalisation pour les mécanismes d'auto-renouvellement. Les lignées tumorales dont la grande résistance au traitement (chimiothérapie) est connue, démontre des caractéristiques des cellules souches cancéreuses (Ben-Porath *et al.*, 2008; Rosen et Jordan 2009 ; Tysnes 2010).

Nous avons observé pour la première fois une régulation de  $RPC32\alpha$  dans les cellules souches adultes. En présence de la protéine de surface CD34 sur les cellules de la moelle osseuse, l'expression de  $RPC32\alpha$  est plus importante qu'en l'absence de ce marqueur. Le marqueur CD34 est couramment utilisé pour sélectionner les CSH chez l'homme car les cellules de la moelle osseuse n'exhibant plus ce marqueur à leur surface sont entrées dans un processus de différenciation. Néanmoins, il faut noter que les cellules en quiescence, nécessaires pour le maintien à long terme de la population de CSH, ne présentent également plus ce marqueur de surface. Mais dans les deux cas, les cellules n'ont plus d'activité d'auto-renouvellement. Pour les cellules circulantes présentant également le marqueur CD34, dans le sang de cordon (cellules souches) ou dans le sang périphérique (cellules progénitrices) le niveau d'expression de  $RPC32\alpha$  reste stable, démontrant encore une fois l'expression de  $RPC32\alpha$  dans les cellules non différenciées quelles qu'elles soient.

Puis nous avons mis en évidence le maintien de l'expression ou la surexpression de RPC32 $\alpha$  dans différentes lignées tumorales issues de patients atteints de leucémie. Ces observations concordent avec notre hypothèse attribuant un rôle important de RPC32 $\alpha$  dans le maintien des cellules à un état non différencié et sa dérégulation lors d'apparition de cancer. Les deux lignées modèles que sont Kasumi et HL-60 ont d'ailleurs présenté le plus fort taux d'expression de RPC32 $\alpha$ . Et une nouvelle fois, nous avons également observé la non régulation de la sous unité RPC32 $\beta$  quelque soit l'échantillon étudié. Il apparaît crucial de vérifier à l'avenir, si la régulation des CSH est dépendante de RPC32 $\alpha$  dans ce modèle d'étude. Cette analyse n'est que la première et nécessitera d'évaluer la présence de cette dérégulation de RPC32 $\alpha$  dans un panel plus important de cellules tumorales.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :

Ces dernières années ont vu apparaître des progrès considérables concernant la compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent l'activité de transcription de l'ARN polymérase III pendant les processus de croissance et division cellulaire. Une nouvelle branche de recherche passionnante s'est ouverte avec les travaux sur les cellules souches embryonnaires et la possibilité de reprogrammer des cellules différenciées en cellules souches (induced pluripotent stem cells -iPS). A mon arrivée dans le laboratoire du Pr. Teichmann, son équipe venait de mettre en évidence l'existence de deux protéines paralogues de la sous-unité RPC32 déjà décrite chez l'homme. Ainsi, cette découverte décrivait une isoforme de l'ARN polymérase III (Pol III $\alpha$ , contenant la sous-unité RPC32 $\alpha$ ) qui est spécifiquement exprimée dans les cellules souches embryonnaires et se retrouve dans certains types de cellules tumorales (au moins). L'autre isoforme de la Pol III (Pol III $\beta$ , contenant la sous-unité RPC32 $\beta$ ) représente l'enzyme commune et indispensable à la survie de toutes les cellules humaines analysées jusqu'à aujourd'hui. Les travaux décrits dans ce manuscrit ont eu pour but de mieux caractériser et comprendre les deux isoformes de la Pol III humaine. Ces travaux ont participé pour partie à une publication du laboratoire en 2010 (Haurie *et al.*, 2010 ).

Les purifications de la Pol III $\alpha$  et de la Pol III $\beta$  ont permis d'observer que toutes les sous-unités qui ont été identifiées par spectrométrie de masse sont identiques aux deux polymérases. Nous n'avons identifié aucune protéine spécifique d'une des deux isoformes autres que les sous-unités RPC32 $\alpha$  et RPC32 $\beta$ . Nos efforts ne nous ont toujours pas permis d'obtenir la liste exhaustive des constituants des deux isoformes. Une telle analyse approfondie qui nous amènera à déterminer tous les composants protéiques des deux isoformes de la Pol III nous semble essentielle pour une compréhension des fonctions spécifiques des deux complexes. L'amélioration technologique et l'expérience que nous avons acquise dans les méthodes de purification, laisse entrevoir une caractérisation prochaine des sous-unités des deux isoformes de la Pol III humaine.

Nous avons remarqué que la transformation des cellules IMR90/E6/E7 résulte en une dérégulation importante d'expression de protéines. Notre but a été et restera de déterminer comment l'expression ectopique de RPC32 $\alpha$  conduit une cellule avec des fonctions de p53 et de pRb compromises, à être complètement transformée et devenir ainsi immortelle. Notre hypothèse pour expliquer la transformation par RPC32 $\alpha$  se base sur deux mécanismes qui résultent tous les deux de la régulation de l'expression des ARN messagers: (i) La Pol III $\alpha$

contenant le RPC32 $\alpha$  pourrait être présente sur des éléments régulateurs de gènes transcrits par la Pol II et déranger leur expression. (ii) La Pol III $\alpha$  pourrait transcrire des ARN qui ont des fonctions régulatrices, influençant ainsi l'expression de gènes Pol II de façon indirecte. Les deux mécanismes ne sont pas exclusifs et pourraient se compléter. Il nous semblait donc important de déterminer quels sont les gènes transcrits par les deux isoformes de Pol III. Cette étude de l'occupation des gènes à grande échelle a déjà été effectuée selon une approche globale par la technique de l'immunoprécipitation de la chromatine couplée à une étape de séquençage massif (ChIP-Seq). Les expériences dont l'analyse est toujours en cours ont été réalisées au laboratoire par Galina Boldina et Chiara Pascali. Avec les travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons tenté de déterminer quels sont les gènes transcrits par la Pol II régulés par l'expression de RPC32 $\alpha$  (ou de RPC32 $\beta$ ). Nous avons révélé la régulation d'expression de certains gènes particuliers (p16; HOX; TFIIC110) par des analyses ciblées et nous avons également essayé de décrire les changements d'expression des gènes au niveau globale en utilisant la technologie de microarrays.

La sous-unité TFIIC110 (GTF3C2) du facteur de transcription TFIIC nous a particulièrement intéressé parce qu'elle a été décrite comme importante pour la constitution d'un facteur TFIIC actif et aussi comme pouvant être la cible d'une autorégulation. Comme TFIIC110 n'était plus détectable par western-blot après la transformation des IMR90/E6/E7 par RPC32 $\alpha$ , nous avons spéculé que la composition de TFIIC aurait pu être altérée. Les expériences mises en place pour analyser la composition de TFIIC dans les cellules transformées nous a montré que TFIIC110 était présent dans le complexe. Par contre, nous ne pouvons pas exclure que seulement une partie des complexes TFIIC contient cette sous-unité TFIIC110 et qu'une autre partie pourrait effectivement être composée par une autre protéine remplaçante de TFIIC110. Dans les prochains mois, nous allons explorer cette possibilité.

Notre découverte de l'altération de l'expression de p16 et de certains gènes HOX suite à la transformation des IMR90/E6/E7 par RPC32 $\alpha$  nous a amené à l'hypothèse que cette transformation entraîne certaines modifications chromatiniennes. Les deux, p16 et les gènes HOX sont régulés dans leur expression par la marque bivalente (H3K4me3 et H3K27me3), comme de multiples gènes dont leur expression est réprimée dans les cellules souches embryonnaires et devient active durant le processus de différenciation. Nous avons débuté une



analyse par la technique de ChIP, pour l'étude de ces deux modifications d'histones sur les promoteurs des gènes HOX et p16. Si ces travaux confirment une altération des deux marques par l'introduction de RPC32 $\alpha$ , nous allons enchaîner en effectuant un ChIP-seq dans les cellules IMR90/E6/E7 et les cellules transformées par RPC32 $\alpha$  avec des anticorps anti-H3K4me3 et anti-H3K27me3. En effectuant ces expériences nous nous attendons à mieux comprendre un des possibles mécanismes impliqués dans la transformation tumorale par RPC32 $\alpha$ .

Au-delà de l'analyse d'expression de gènes spécifiques, nous avons également essayé d'établir une vue d'ensemble des gènes différentiellement exprimés entre la lignée de cellules IMR90/E6/E7 et les lignées dérivées exprimant soit RPC32 $\alpha$  soit RPC32 $\beta$ . Nous avons utilisé la technologie de microarray (Affymetrix) pour ces analyses et nous avons pu extraire des informations importantes mais incomplètes, comme cela a été discuté dans ce manuscrit. Certaines pistes de dérégulation d'expression de gènes par l'expression de soit RPC32 $\alpha$  soit RPC32 $\beta$  (inflammation, histones,...) seront à poursuivre dans le futur. Il nous reste à obtenir des données sur les changements de l'expression de gènes transcrits par la Pol II plus exploitables à partir des cellules transformées par RPC32 $\alpha$ . Nous essayons une autre analyse microarray (Agilent cette fois) et nous allons également effectuer un séquençage massif des ARN (RNA-seq). Comme nos dernières observations le suggèrent, les cellules transformées par RPC32 $\alpha$  doivent exprimer une quantité très élevée d'ARN ribosomiaux (transcrits par le Pol I), nous allons essayer d'éliminer ces ARN avant l'analyse par RNA-seq. Une détermination claire des altérations d'expression de gènes Pol II suite à la transformation de cellules par la RPC32 $\alpha$  nous donnera probablement des pistes sur les mécanismes à la base de cette transformation.

La régulation d'expression de RPC32 $\alpha$  au cours de la différenciation et de la transformation tumorale est maintenant évidente. Les modifications post-traductionnelles de RPC32 $\alpha$  devront être caractérisées avec plus de précision et mettront sûrement en lumière la régulation de la protéine. Notre étude sur les cellules hématopoïétiques démontre pour la 1<sup>ère</sup> fois l'expression de RPC32 $\alpha$  dans des cellules souches adultes, sa régulation lors de la différenciation hématopoïétique, et sa surexpression lors de cancer du sang. Nous devons continuer d'évaluer la présence de cette dérégulation dans un panel plus important de tumeurs cancéreuses dans le but de vérifier l'impact de RPC32 $\alpha$  quand au devenir des cellules

transformées. RPC32 $\alpha$  pourrait se révéler être un excellent marqueur de tumeur et pourrait devenir potentiellement une cible thérapeutique anticancéreuse.

Les travaux rapportés dans ce manuscrit, bien qu'inachevés, contribuent à une meilleure conception de la manière dont l'ARN polymérase III est régulée dans des cellules humaines. De plus, nos résultats ouvrent des voies de recherche particulièrement intéressantes. Ainsi, les investigations futures au sein du laboratoire s'annoncent passionnantes et elles devront permettre une compréhension encore plus détaillée des mécanismes par lesquels la Pol III contribue au développement embryonnaire, à la différenciation cellulaire, à la survie de la cellule, à la prolifération tumorale ou encore à la réponse immunitaire innée. Les études seront particulièrement axées sur les fonctions spécifiques de chacune des deux isoformes de la Pol III dans ces processus.

## MATERIELS ET METHODES

## 1. Souche bactérienne

XL1 blue : génotype *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*

La souche bactérienne est cultivée dans un milieu LB liquide (Lennox : 10 g/L de Bacto tryptone ; 5 g/L d'extrait de levures ; 10 g/L de NaCl ; 3mM NaOH) sous étuve à 37°C et agitation à 200 rpm. Pour la culture sur milieu solide, la composition est identique au milieu liquide mais avec l'ajout de 20g/L d'agar. L'utilisation d'antibiotique est nécessaire pour la sélection des bactéries en fonction des résistances apportées par les plasmides d'intérêts : Ampicilline (100mg/ml), chloramphénicol (33μg/ml) ou Kanamycine (25μg/ml).

## 2. Les constructions plasmidiques

Le vecteur d'expression rétroviral pBabe est dérivé du virus de la leucémie murine Moloney (MMLV). Le vecteur fournit les éléments pour la transcription et la maturation, le signal d'encapsidation et le gène d'intérêt cloné. Le gène viral *env*, qui code pour l'enveloppe protéique du virion est fourni par la lignée cellulaire Hek 293 Helper. La transfection des lignées Helper permet la production intense de virus capables d'infecter les cellules mais restent sans capacité répliquative. Grâce aux séquences 5' et 3' LTR, le vecteur pBabe s'intègre dans le génome de la cellule hôte pour l'expression du gène d'intérêt.

Les séquences codant pour les siARN contre RPC32α et RPC32β ont été clonées dans le pSiren-RetroQ-TetP (Clontech). Le pQC-tTS-IN (Clontech) a été utilisé pour produire une protéine activatrice de la transcription contrôlée par la tétracycline qui permettra d'induire l'expression des siARN.

## 3. Mutagenèse dirigée du gène PolR3G

L'ADN correspondant à la phase ouverte de lecture du gène POLR3G a été cloné dans le vecteur pBabe. Le gène POLR3G est sous le contrôle du promoteur fort PromCMV. Le plasmide résultant pBabe-PolR3G-FHM a été utilisé pour réaliser des mutagenèses dirigées de PolR3G. Les sérines 157, 167 et 171 ont été mutées en acide aspartique par la société GENEART. Les mutations portées par le gène PolR3G dans les plasmides obtenus ont été vérifiées par séquençage.

#### **4. Extraction d'ADN plasmidique**

En fonction du volume de culture de bactéries E. coli XL1 blue transformées, les kits QIAGEN miniprep (2ml de culture) ou midiprep (100ml de culture) sont utilisés. Il s'agit d'un kit d'extraction par lyse alcaline dont le protocole correspond aux recommandations fournisseur.

#### **5. Dosage d'acide nucléique**

Les acides nucléiques (ADN ou ARN) ont été dosés sur le spectromètre ND-1000 de Nanodrop à partir d'un microlitre d'échantillon.

#### **6. Lignées cellulaires**

IMR90 : Ce sont des fibroblastes pulmonaires humains, des cellules diploïdes issues de fœtus de 16 semaines.

HeLa : Ce sont des cellules épithéliales humaines provenant d'un adénocarcinome du col de l'utérus.

HEK phoenix (ou helper) : Ce sont des cellules épithéliales embryonnaires humaines exprimant les gènes Gag, Pol et Env du virus MMULV (Moloney Murine Leukemia Virus). Elles permettent la production de virions pouvant contenir un gène d'intérêt pour l'infection d'autres lignées cellulaires.

#### **7. Conditions de culture**

Les cellules sont cultivées sur boîte (Ø 150 mm BD Falcon <sup>TM</sup>) dans une atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (5%) contrôlée dans des étuves à 37°C. Les lignées cellulaires sont cultivées dans un milieu DMEM (Dubelco's Modified Eagle's Medium de Gibco) référence : 11960 pour les IMR90 ; référence : 41965 pour les cellules HeLa et Hek. Les milieux de culture sont complétés en sérum fœtal de veaux (15% pour les cellules IMR et 10% pour les cellules HeLa ou Hek), en pénicilline à 100 unités/ml et en Streptomycine [100µg/ml]. L'ajout de Glutamine [80mM] est également nécessaire pour les cellules IMR 90.

En fonction des constructions utilisées, l'ajout d'antibiotique au milieu (Puromycine [2µg/ml], Hygromycine [50µg/ml], G418 [400µg/ml]) permet la sélection des cellules intégrant le gène d'intérêt dans leur génome.

## **8. Transfections cellulaires**

Les cellules sont transfectées à l'aide d'un agent de transfection, le Jet PEI <sup>TM</sup> (PolyPlus transfection) lorsque les cellules atteignent une confluence de 30% à 50% environ en fonction des lignées. Selon les recommandations du fournisseur, 12 µg d'ADN sont resuspendus dans 900 µl de solution de NaCl à 150 mM, ainsi que 24 µl de Jet PEI dans 900 µl de NaCl à 150 mM également. Les deux solutions sont vortexées puis mélangées en versant la solution de JetPEI sur la solution d'ADN. L'ensemble est vortexé puis incubé pendant 30 min à température ambiante. La solution est enfin mélangée aux 25ml du milieu de culture cellulaire.

## **9. Infections cellulaires**

Les cellules à infecter doivent avoir une confluence entre 50 et 80% en fonction du type cellulaire et de la vitesse de croissance. Pour l'infection d'une boîte de cellules cibles le milieu de culture de deux boîtes de cellules Hek phoenix est prélevé. Ces Hek phoenix ont été préalablement transfectées (et sélectionnées par antibiotique si besoin) par la construction contenant le gène d'intérêt. Les 50ml du milieu prélevé sont filtrés sur une membrane avec des pores de 0,45 µm. On ajoute du Sequabrene [8mg/µl] (S2667 Sigma) pour favoriser la fixation des virions sur les cellules cibles. Ensuite les 50ml sont versés sur les cellules cibles et incubées 6h. La procédure est répétée 4 à 5 fois. La sélection par antibiotique peut débuter 36h après la 1<sup>ère</sup> infection.

## **10. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires**

La méthode d'extraction est adaptée de celle de Digma *et al.*, 1983. Les cellules sont décrochées de leur support par une légère digestion à la trypsine. Les cellules sont resuspendues dans 10ml de milieu de culture (le sérum inactivant la trypsine) puis centrifugées 5min à 1000rpm à 4°C. Le culot cellulaire est lavé deux fois avec du PBS froid. Les cellules sont ensuite lysées dans 2,5 volume de tampon A (1,5mM MgCl<sub>2</sub> ; 10mM KCl ; 10mM Tris HCl pH 7,9 ) plus 3mM DTT, 0,5mM PMSF et 0,1% de NP40, puis centrifugées 15min à 5000rpm à 4°C. Il est ajouté 10% de glycérol au surnageant qui est récupéré et qui est l'extrait cytoplasmique (S100). Le culot est lavé dans un volume maximum de tampon A plus DTT et PMSF. Le culot est ensuite repris dans un volume de tampon B hypotonique (1,5mM MgCl<sub>2</sub> ; 10mM KCl ; 20mM Tris HCl pH 7,9 ; 20% glycérol) plus 3mM DTT,

0,5mM PMSF. Puis est ajouté 1/3 du volume total en tampon C (1,5mM MgCl<sub>2</sub> ; 1,2mM KCl ; 20mM Tris HCl pH 7,9 ; 20% glycérol) plus 3mM DTT, 0,5mM PMSF, et le tout est homogénéisé sur roue 30min à 4°C. Enfin l'extrait est centrifugé 30min à 14 000rpm à 4°C. Le surnageant qui est l'extrait nucléaire est récupéré et stocké comme l'extrait cytoplasmique à -80°C.

### **11. Dialyse des extraits**

Les extraits obtenus ont une concentration en sel trop élevé, environ 400mM. Une dialyse est nécessaire pour en éliminer. Les extraits protéiques sont placés dans des « boyaux » dont la membrane est perméable aux petits solutés. La dialyse est réalisée à 4°C dans 500ml de tampon de dialyse (100mM KCl, 200mM HEPES, 10% glycérol, 0,4mM PMSF, 0,5 mM DTT) durant la nuit. Les solutions de protéines récupérées sont centrifugées 10 min à 4500rpm (pour éliminer les protéines précipitées), dosées puis congelées à -80°C.

### **12. Dosage de protéines**

Les protéines sont dosées par la méthode colorimétrique de Bradford. Les extraits à doser (1 à 3 µl) sont dilués dans une solution contenant 750µl d'eau et 200µl du colorant de Bradford (Bleu de Coomassie G250 0,1 g/l - 5 % EtOH - 10 % acide orthophosphorique). Une valeur pour la densité optique à 595 nm de cette solution est mesurée après incubation de quelques minutes à température ambiante. La quantité de protéines est déduite grâce à la pente d'une gamme de dilution de BSA (Albumine de sérum bovin) connue et réalisée au préalable dans les mêmes conditions.

### **13. Fractionnement sur colonne FPLC ÄKTA**

Fractionnement des extraits protéiques par chromatographie échangeuse d'ions. Les protéines injectées dans la colonne DEAE-Fractogel (Merck), se fixent puis sont éluées par un gradient salin de 60mM à 530mM KCl. Le système de chromatographie ÄKTA explorer™ (Amersham Biosciences) utilisé dispose d'une cellule spectrophotométrique pour mesurer l'absorption des rayons UV au passage des protéines sur la colonne de chromatographie et permet le suivi de la purification.



## 14. Les anticorps

Anti-Flag : Stratagene, Anti-FLAG M2 antibody # 200472. Anticorps monoclonal murin dirigé contre le peptide FLAG (DYKDDDDK). Utilisé pour l'immunodétection Western blot à une concentration de 2µg/ml dans une solution PBS-Tween 0,05%, lait écrémé 5% (w /w) (Brizzard e al., 1994)

Anti-β-actine : Santa Cruz Biotechnology, Anti-b-actine (ACTBD11B7) : sc-81178. Anticorps monoclonal murin dirigé contre la partie C-terminale de la protéine humaine. Utilisé à une dilution de 1 : 2000 pour l'immunodétection par Western blot dans une solution TBS-Tween 0,05%, 5% lait écrémé (w /w).

Anti-RPC32α : Santa Cruz Biotechnology, Pol III RPC32 (H9) : sc48365. Anticorps monoclonal murin dirigé contre les acides aminés 1 à 136 de la protéine RPC32a. Utilisé à une dilution de 1 : 500 pour l'immunodétection par Western blot dans une solution TBS-Tween 0,05%, 5% lait écrémé (w /w).

Anti-RPC39, Anti-RPC62, Anti-TFIIC102, Anti-TFIIC110. Anticorps polyclonaux obtenus par immunisation de lapin dans le laboratoire du Pr. RG Roeder. Les dilutions d'utilisation sont respectivement, 1 : 10000, 1 : 4000, 1 : 10000 et 1 : 50000 en solution TBS-Tween 0,05%, 5% lait écrémé (w /w).

Anti-p16 : Millipore, Anti-p16/INK4a #04-239. Anticorps monoclonal de lapin. Utilisation pour l'analyse Western blot à une dilution 1 : 2000 dans une solution TBS-Tween 0,05%, 5% lait écrémé (w /w).

Anti-p53 : Santa Cruz Biotechnology, p53 (DO-1) : sc-126. Anticorps monoclonal murin dirigé contre les acides aminés 11 à 25 de la protéine p53 humaine. Utilisé à une dilution de 1 : 1000 pour l'immunodétection par Western blot dans une solution TBS-Tween 0,05%, 5% lait écrémé (w /w).

Anti-HSV : Sigma, Anti-HSV #6030. Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les acides aminés 290 à 300 (QPELAPEDPED) de la glycoprotéine D de HSV.

Anticorps secondaire : anti IgG de lapin (NA934V) et anti IgG de souris (NA931V) sont couplés à la peroxydase HRP. Ils proviennent de la société GE Healthcare.

### **15. Couplage des anticorps à des billes de protéine A-sépharose**

Dans un premier temps, les anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre les protéines d'intérêt sont couplées de manière covalente aux billes. La quantité de billes (Sigma #P3391) désirée est lavée une fois avec un volume maximum de PBS (137 mM NaCl – 2,7 mM KCl – 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Les billes sont culottées par aimantation ou centrifugation (1min à 2000 rpm). Ces billes sont ensuite incubées 1 heure à température ambiante sur roue avec une solution contenant 1µg d'anticorps pour 10µl de billes. Les billes sont ensuite lavées dans 10 volumes de tampon 200 mM sodium Borate pH9 puis incubées 30 min à température ambiante dans 10ml de sodium Borate 200mM pH9 auxquels sont ajoutés 52mg Diméthyl Pimelimidate Dihydrochloride pour le couplage. Les billes sont récupérées par aimantation ou centrifugation (1min à 2000 rpm) et le surnageant éliminé, puis la réaction est arrêtée par l'ajout d'un volume d'éthanolamine sur les billes. Après incubation de 2h à température ambiante sur roue, les billes sont lavées à deux reprises avec de PBS, puis reprises dans un volume de PBS pour la conservation à 4°C.

### **16. Immunoprécipitation**

Les complexes sont immunopurifiés par incubation de 2 mg de protéines d'extrait nucléaire (soit ≈ 500 µl) avec les anticorps anti-cible liés au billes pendant 3h à 4°C sous agitation. Du Nonidet P-40 (NP40), agent surfactant évitant la formation d'agrégats de protéines, est ajouté à une concentration finale de 0,05 % ainsi qu'un mélange d'inhibiteur de protéases PMSF et DTT. Les billes sont récupérées par aimantation ou centrifugation (1min à 2000 rpm), lavées 3 fois dans du tampon BC300 (300mM Kcl, 200mM HEPES, 10% glycérol, 0,4mM PMSF), et 1 fois dans 1volume de BC60 (60mM Kcl, 200mM HEPES,10% glycérol, 0,4mM PMSF).

Pour l'élution du complexe immunopurifié, si les protéines sont étiquetées FHM (Flag, HA, Myc), elles sont éluées par incubation avec 1,5 volume de tampon d'élution contenant le peptide Flag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) purifié à une concentration de 250ng/µl. Le peptide entre en compétition avec l'étiquette portée par les protéines et l'élution est réalisée par substitution de cette étiquette par le peptide au niveau de la région de reconnaissance de l'étiquette sur l'anticorps. L'incubation est réalisée pendant 30min à 4°C.

Si les protéines ne sont pas étiquetées, elles sont éluées dans un tampon BC60 8M Urée durant 30 minutes à température ambiante. Les protéines éluées sont conservées à -80°C.

## **17. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

### **a) Préparation de l'échantillon**

Les protéines (20 ou 30µg) sont dénaturées par un chauffage de 2 min à 95°C dans 1X d'un tampon Laemmli 5X pour électrophorèse (300 mM Tris HCl pH 6.8, 10% SDS, 25% B-Mercaptoethanol, 50 % glycérol, 0,10 % bleu de bromophénol). Le β-Mercaptoethanol est utilisé pour réduire les ponts disulfures des protéines. Le SDS est chargé négativement et va permettre de recouvrir de charges négatives les protéines indépendamment de leur charge intrinsèque. Les protéines, sous l'effet d'un champ électrique, migreront toutes vers l'anode et seront séparées selon leur taille grâce à la réticulation d'un gel de polyacrylamide.

### **b) Préparation du gel**

Un gel supérieur, dit "de concentration" (4% acrylamide/bisacrylamide 29 : 1 - 125 mM Tris HCl pH 6,8 - 0,1 % SDS- 0,1% APS – 0,1% TEMED) permet de concentrer les protéines avant qu'elles ne soient séparées, en fonction de leur poids moléculaire, dans le gel inférieur dit "de résolution" ( X % acrylamide/bisacrylamide 29 : 1 – 0,375 mM Tris HCl pH 8,8 - 0,1 % SDS0,1% APS – 0,1% TEMED). Les protéines sont séparées par électrophorèse à une tension de 90 à 150 Volts dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris - 192 mM Glycine - 0,1 % SDS – pH 8,3). Pour un gel à gradient de 4 à 20 % de polyacrylamide il est utilisé un gel commercial (Novex Tris-Glycine Gel, Invitrogen). Le gradient de polyacrylamide permet une meilleure résolution par rapport à un gel de concentration en polyacrylamide constante car il permet de mieux dissocier l'ensemble des protéines malgré des poids moléculaires très différents.

### **c) Migration**

L'électrophorèse se déroule à 90 V dans le même tampon de migration (25mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% SDS, pH 8,3).

## 18. Coloration au nitrate d'argent

Utilisation du kit InVitrogen (SilverQuest™ Silver Staining) compatible pour la spectrométrie de masse. Après migration des protéines, le gel est incubé sur la nuit dans une solution de fixation (50% MeOH + 10% Ac Acétique). Après rinçage 10min dans l'eau milliQ, le gel est lavé à l'éthanol 30%. Puis le gel est préparé par la solution du kit (30mL EtOH + 10mL Sentizer + 60mL H<sub>2</sub>O milliQ) pendant 10min. Une fois rincé à l'eau milliQ, il est ensuite coloré 15min (1mL Stainer + 99 mL H<sub>2</sub>O milliQ). Après un dernier rinçage rapide à l'eau milliQ, le gel est développé grâce à la solution de révélation (10mL developer + 1 goutte developer enhancer + 89 mL H<sub>2</sub>O milliQ). La réaction de révélation est stoppée avec 10ml de solution Stop du kit. Le gel est rincé à l'eau milliQ et est conservé dans une solution d'acide acétique 5%.

## 19. Spectrométrie de masse

Les bandes de protéines ont été découpées du gel SDS-PAGE puis décolorées dans 25 mM de bicarbonate d'ammonium 50% ACN. Les morceaux de gel ont ensuite été rincés deux fois dans de l'eau ultrapure et « rétrécis » dans l'ACN pendant 10 min. Après le retrait de l'ACN, les morceaux de gel ont été séchés à température ambiante et recouverts de la solution de trypsine (10 ng/μl, dans 40 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> et 10% d'ACN), réhydratés à 4 ° C pendant 10 min, et enfin incubés une nuit à 37 ° C. Ils ont ensuite été incubés pendant 15 min dans 40 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> à 10% ACN à température ambiante sous agitation rotative. Le surnageant a été recueilli, et une solution d'extraction H<sub>2</sub>O/ACN/HCOOH (47.5:47.5:5) a été ajoutée sur les morceaux de gel pendant 15 min. L'étape d'extraction a été répétée deux fois. Les surnageants ont été regroupés et concentrés dans une centrifugeuse sous vide à un volume final de 25 μl. Les produits de digestion ont finalement été acidifiés par l'addition de 1,5 μl d'acide formique (5%, v / v) et stockés à -20 ° C.

L'analyse a été réalisée sur l'appareil MS/MS MALDI-Q-TOF premier de Waters puis sur le LTQ orbitrap XL™ (Thermo Scientific) pour la deuxième analyse. Les données ont été soumises par SEQUEST travers Bioworks 3.3.1 Interface (Thermo-Finnigan) contre un sous-ensemble de la base de données UniProt limitée à *Homo sapiens* (Uni-ProtKB, Release 2010.12, Novembre 2010, 20245 entries).

## **20. Immunodétection de protéines sur membrane (western-blot)**

### **a) Transfert des protéines**

Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, les protéines chargées négativement par le SDS, sont électrotransférées en condition semi sèche sur une membrane de nitrocellulose (Protran® ,Watman). Trois feuilles de papier Whatman imprégnées d'une solution (tampon de transfert : 25 mM Tris - 0,192 M Glycine - 20 % méthanol – pH 8,3) sont déposées sur l'appareil de transfert semi-sec (Trans-Blot, Semi-dry Transfer Cell, Biorad), recouvertes par la membrane imbibée de ce même tampon et ensuite par le gel de polyacrylamide. Trois feuilles de papier Whatman imbibées également sont déposées par dessus avant d'effectuer le transfert durant 45 minutes à voltage constant de 15V. Afin de vérifier l'efficacité du transfert, la membrane sur laquelle a été transférée les protéines, est brièvement rincée à l'eau osmosée. La membrane est ensuite rincée deux fois avec du PBS-T (137 mM NaCl – 2,7 mM KCl – 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,05% Tween20) ou du TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl – 0,05% Tween20)

### **b) Détection immunologique**

Dans le but d'empêcher une fixation non spécifique des anticorps sur la membrane, celle-ci est saturée pendant environ 30 minutes dans une solution lait écrémé dilué à 5 % dans du TBS-T (10mM Tris-HCl pH 8 - 150mM NaCl -0,05% Tween 20). La membrane saturée est incubée pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, reconnaissant la protéine d'intérêt, dilué en fonction de son efficacité (de 250 fois à 10000 fois) dans du TBS-T 5% lait. Après incubation, l'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages de 5 min dans du TBS-T. La membrane est ensuite incubée 2h à température ambiante avec une solution d'anticorps secondaire (1 :5000) anti-souris ou anti-lapin en fonction de l'anticorps primaire. Les anticorps liés aux protéines sur la membrane sont ainsi reconnus par l'anticorps secondaire (anti- IgG) lié à une peroxydase (HRP). La membrane, lavée 3 fois 5 min avec du TBS-T, est mise en contact pendant 2 min avec une solution contenant du luminol, substrat de la peroxydase (kit ECL, Amersham). L'hydrolyse par la peroxydase du substrat s'accompagne d'une émission de photons qui sont détectés par impression sur un film autoradiographique (Biomax Light Chemiluminescence film, Kodak).

## **21. Extraction ARN et vérification de leur intégrité**

L'extraction de l'ARN est réalisée à partir d'une demi-boîte de cellules (voir une boîte entière pour les cellules IMR90). Après avoir décroché les cellules par une légère digestion trypsique, les cellules sont reprises avec un peu de milieu de culture puis lavées deux fois avec du PBS froid. Le culot cellulaire est lysé par l'ajout de 1ml de Trizol (Invitrogen #15596-026) et 25µl de Glycogen à 20mg/ml (Sigma #G1767) puis la séparation de phase est effectuée avec 200µl de chloroforme. Après incubation à 4°C pendant 15 min et 10min de centrifugation à 10 000g, la phase aqueuse (supérieur) est prélevée puis une deuxième étape de Trizol/Chloroforme (1 : 1) est effectuée. Après une nouvelle incubation de 10min à 4°C puis 10min de centrifugation à 10 000g, la phase aqueuse est récupérée. Elle est alors mélangée avec un volume de chloroforme. Suite à 5min d'incubation à 4°C et une centrifugation de 5min à 10 000g, un volume d'Isopropanol est ajouté à la phase aqueuse récupérée. Après incubation 10min à température ambiante, l'ARN précipite une nuit entière à -20°C.

Le lendemain l'extrait est centrifugé 30min à 13 000g à 4°C. Le culot est ensuite rincé à l'éthanol 75% avant d'être séché. Il est repris dans 50µl d'eau DEPC.

Une étape de digestion à l'ADNase est réalisée à l'aide du Kit Turbo DNase (Ambion) selon les recommandations fournisseur.

L'intégrité de l'ARN est évaluée à l'aide du Bioanalyseur 2100 d'Agilent. Les échantillons à analyser sont préparés à une dilution entre 300 et 500 ng/µl. 1µl de chaque échantillon est déposé sur puce Agilent NANO contenant un gel polyacrylamide dénaturant. Le Bioanalyseur permet de visualiser les ARNr et d'évaluer le rapport entre la quantité d'ARNr 28S et la quantité d'ARNr 18S ce qui permet de déterminer un facteur d'intégrité des ARN (ou RIN).

## **22. Reverse transcription**

L'ADNc est synthétisé à partir de 2µg de chaque échantillon ARN. Dans un volume de 20µl, 2µg d'ARN est mis en solution avec 150ng de random primers (Fermentas) et incubé 5min à 65°C puis 5min à 4°C. 20µl de mix réactionnel, composés de 8µl de tampon 5x (Fermentas), 2µl de dNTP à 10mM (Promega), 1µl de RiboBlock RNase inhibitor (Fermentas), 1µl de RT RevertAid (Fermentas) et 8µl d'eau, sont ajoutés aux 20µl d'ARN.

La transcription reverse est alors effectuée au cours d'un seul cycle PCR avec une incubation de 10min à 25°C, 1h à 50°C et 15 min à 70°C. L'amplifia est repris dans 60µl d'eau et conservé à 20ng/µl à -80°C.

## 23. PCR quantitative

### a) Réalisation de la PCR quantitative

La PCR quantitative a été réalisée sur l'Opticon 2. Dans les plaques 96 puits, le mélange réactionnel dans chaque puits est composé de 2 µl d'ADNc (2 ng/µl), 3µl de primer sens et antisens à 10 µM (concentration finale de 500nM) (100mM) et 5µl du mix Dynamo 2X (Finzymes). Le programme d'amplification débute par une période de dénaturation de 15 minutes à 95°C suivi de 40 cycles de 20 sec à 95°C, 35 sec à 61°C. Une courbe de dénaturation est ensuite obtenue par une augmentation progressive de la température de 65°C à 95°C par palier de 0,3°C toutes les 3sec.

### b) Amorces utilisées

Target	Sequence Primer Forward	Sequence Primer Reverse	Gene Name	GenBank ID	Primer localisation
hp53	ACTGCCCAACAACACCAGCT	GAAGGGTGAATATTCTCCATCCA	TP53	NM_000546	1118-1188
hp16	GAAAGAACCAGAGAGGCTCTGAGA	TGGCCCTGTAGGACCTTCG	CDKN2A	NM_058197	956-1027
hRPC32a	CGCAGGCAAAGGCACAC	CCTCTTTTTTCCAATTCCTCCA	polR3Gorf	NM_006467	584-655
hRPC32b	CCAAGAGAGATGTGGAGCGTTATT	TCCAATCGATGGCATTGTCA	polR3GLorf	NM_032305	355-426
hTBP	GGGCATTATTTGTGCACTGAGA	GCCCAGATAGCAGCACGGT	TBP	NM_003194	1424-1495
hBRF1	TGGGATTGTGTTTCTATTCAGCA	ACACCCGGCCACATCT	BRF1	NM_001509	2558-2633
hBRF2	CCTGGGTCTGGAGTAAAGTCAG	CACACCAAGGATGGGAATCT	BRF2	NM_018310	1514-1584
hBDP1	CCACAGCCAACTGCCACTT	TGGGCTTTGTATATTCGGTATCTG	BDP1	NM_018429	639-709
hTFIIC220	GCACACCTCACATTCAGACTC	GGTGGCACCTGGGCACT	GTF3C1	NM_001520	6670-6740
hTFIIC110	ATCCTTGGAGTGAAGTCGGTCA	GGGAAGGCCCCAGTTC	GTF3C2	NM-001035521	3040-3110
hTFIIC102	CAGTGGGAATACCGGAATGG	TCTCAGTTGCGGTGCTTTATATAGA	GTF3C3	NM_012086	2697-2767
hTFIIC90	CTGACCCAACCTTAATCCGTAT	TTAAGTCTGAAGCAGGGCTGTG	GTF3C4	NM_012204	3427-3503
hTFIIC63	GTGGAAGAGTTGCAGAAGATCATT	ACCACCCATCCCGTTCTGT	GTF3C5	NM_001122823	1601-1673
hTFIIC35	AATGAAGAAGCTCAGCATGACAAG	AGCCATTCACCCACCTA	GTF3C6	NM_138408	
hTFIIIA	GTCGCTGTCCAAGAGAAGGCT	GGAGAGGATATGGCTTTGGAGAT	GTF3A	NM_002097	931-1001
hHOXA4 for	AAGGAGTTCACCTTCAATCGATACC	GCTCAGACAAACAGAGCGTGTG	HOXA4	NM_002141	741-816
hHOXB2 for	TTGCTGGACCTCACCGAAA	CTGCGTCTGCCGCTTGT	HOXB2	NM_002145	655-729
hHOXB3 for	TGCAGAAAAGCCACCTACTACGA	CATTGCTGCCAGGGTACGA	HOXB3	NM_002146	860-934
hHOXB5 for	GATGATCGCTGTATTTGAGTTTCA	GCGGCACTACCCACCT	HOXB5	NM_002147	1257-1328
hHOXB6 for	GCGTGTTCGGCGAGACA	CGAATTCATCCGCTGCATC	HOXB6	NM_018952	663-733
hHOXB7 for	GCCGAGAGTAACTTCCGGATC	GTCTGGCGGCCTCGTTT	HOXB7	NM_004502	461-531
hKDMB-6	GGCAGGGAAGAAAATCGCTTA	CATCGCACTCGTTGCAGTAGTAG	KDMB6	NM_001080424	5044-5114
hSUZ12 for	TGCAGTTCCTCTTCGTTGGA	GGCAAGAGGTTGGCAATAGG	SUZ12	NM_015355.2	1286-1356



## **24. Microarrays ou puces à ADN**

10µg d'échantillons d'ARN totaux ont été expédiés sur carbo-glace à Genome Explorations, Inc (Memphis, TN) pour vérifier de nouveau la qualité de l'ARN, la synthèse de l'ADNc, et la détermination des profils d'expression génique pour chaque échantillon d'ARN par interrogation de la biopuce Affymetrix® Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, Californie, Etats-Unis).

## **25. Collecte et analyse des données des puces à ADN**

Les profils d'expression génique ont été détectés à l'aide du logiciel GCOS (Affymetrix). Les fichiers CEL de données d'expression ont été analysés en utilisant le logiciel GeneSpring GX11 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA). Normalisation des fichiers CEL par le logiciel Genespring GX11 et transformation « baseline to mean of control samples » grâce aux gènes contrôles. Utilisation des 5 algorithmes disponibles (RMA, PLIER16, GCRMA, LIWONG, MAS5). Puis comparaison (obtention d'un foldchange) de la lignée IMR90 E6/E7 sur-exprimant FHM-RPC32 $\alpha$  Vs IMR90 E6/E7 (groupe contrôle), et la lignée IMR90 E6/E7 sur-exprimant FHM-RPC32 $\beta$  Vs , IMR90 E6/E7 (groupe contrôle) et calcul de la pvalue de variation (t-test) selon 2 types de correction : pas de correction ou FDR.

Exportation des résultats (foldchange et pvalue) pour tous les probesets des puces Affymetrix® Human Genome U133 Plus 2.0 pour chaque algorithme et pour chaque type de correction dans l'outil Gene Expression Analysis Software environment (développé au Neurocentre Magendie Centre de Recherche Inserm U862).

Les résultats exploités sont l'intersection des listes de gènes des 3 algorithmes les plus pertinents à savoir RMA PLIER et GCRMA. Enfin, modulation des cut-offs (foldchange  $\geq 2$  ou 4 et pvalue de 0,05).

ANNEXES  
**non diffusées**

## Bibliographie

- Aasland, R, Stewart, AF et Gibson, T (1996). "The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB." *Trends Biochem Sci* **21**(3): 87-8.
- Abdel-Fattah, R, Xiao, A, Bomgardner, D, *et al.* (2006). "Differential expression of HOX genes in neoplastic and non-neoplastic human astrocytes." *The Journal of Pathology* **209**(1): 15-24.
- Ablasser, A, Bauernfeind, F, Hartmann, G, *et al.* (2009). "RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate." **10**(10): 1065-1072.
- Agger, K, Cloos, PAC, Rudkj r, L, *et al.* (2009 ). "The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4/ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence" *Genes & Development* **23** (10 ): 1171-1176
- Alciato, F, Sainaghi, PP, Sola, D, *et al.* (2010 ). "TNF-a, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages" *Journal of Leukocyte Biology* **87** (5 ): 869-875
- Andersson, MG, Haasnoot, PCJ, Xu, N, *et al.* (2005). "Suppression of RNA Interference by Adenovirus Virus-Associated RNA" *J. Virol.* **79**(15): 9556-9565.
- Andrau, J-C, Sentenac, A et Werner, M (1999). "Mutagenesis of yeast TFIIB70 reveals C-terminal residues critical for interaction with TBP and C34." *Journal of Molecular Biology* **288**(4): 511-520.
- Ansari, KI, Hussain, I, Shrestha, B, *et al.* (2011). "HOXC6 Is Transcriptionally Regulated via Coordination of MLL Histone Methylase and Estrogen Receptor in an Estrogen Environment." *Journal of Molecular Biology* **411**(2): 334-349.
- Archambault, J et Friesen, JD (1993). "Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III." *Microbiol Rev* **57**(3): 703-24.
- Baker, RE, Camier, S, Sentenac, A, *et al.* (1987). "Gene size differentially affects the binding of yeast transcription factor tau to two intragenic regions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 8768-72.
- Bardeleben, C, Kassavetis, GA et Geiduschek, EP (1994). "Encounters of *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase III with its Transcription Factors during RNA Chain Elongation." *Journal of Molecular Biology* **235**(4): 1193-1205.
- Bark, C, Weller, P, Zabielski, J, *et al.* (1987). "A distant enhancer element is required for polymerase III transcription of a U6 RNA gene." **328**(6128): 356-359.
- Barski, A, Chepelev, I, Liko, D, *et al.* (2010). "Pol II and its associated epigenetic marks are present at Pol III-transcribed noncoding RNA genes." **17**(5): 629-634.

- Bartholomew, B, Meares, CF et Dahmus, ME (1990 ). "Photoaffinity labeling of RNA polymerase III transcription complexes by nascent RNA. ." *Journal of Biological Chemistry* **265** (7 ): 3731-7
- Bartholomew, B, Kassavetis, GA et Geiduschek, EP (1991). "Two components of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor III B (TFIIB) are stereospecifically located upstream of a tRNA gene and interact with the second-largest subunit of TFIIC." *Mol Cell Biol* **11**(10): 5181-9.
- Batey, RT, Rambo, RP, Lucast, L, *et al.* (2000 ). "Crystal Structure of the Ribonucleoprotein Core of the Signal Recognition Particle" *Science* **287** (5456 ): 1232-1239
- Batzer, MA et Deininger, PL (2002). "Alu repeats and human genomic diversity." **3**(5): 370-379.
- Ben-Porath, I, Thomson, MW, Carey, VJ, *et al.* (2008). "An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors." **40**(5): 499-507.
- Bernstein, BE, Mikkelsen, TS, Xie, X, *et al.* (2006). "A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells." *Cell* **125**(2): 315-326.
- Bhargava, P et Kassavetis, GA (1999). "Abortive Initiation by *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase III."
- Bodey, B, Bodey, B, Jr., Groger, AM, *et al.* (2000). "Immunocytochemical detection of homeobox B3, B4, and C6 gene product expression in lung carcinomas." *Anticancer Res* **20**(4): 2711-6.
- Boyer, LA, Lee, TI, Cole, MF, *et al.* (2005). "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells." *Cell* **122**(6): 947-956.
- Braun, BR, Bartholomew, B, Kassavetis, GA, *et al.* (1992). "Topography of transcription factor complexes on the *Saccharomyces cerevisiae* 5 S RNA gene." *Journal of Molecular Biology* **228**(4): 1063-1077.
- Brun, I, Sentenac, A et Werner, M (1997). "Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation." **16**(18): 5730-5741.
- Cabart, P et Murphy, S (2001). "BRFU, a TFIIB-like Factor, Is Directly Recruited to the TATA-box of Polymerase III Small Nuclear RNA Gene Promoters through Its Interaction with TATA-binding Protein." *Journal of Biological Chemistry* **276**(46): 43056-43064.
- Cabart, P, Lee, J et Willis, IM (2008). "Facilitated Recycling Protects Human RNA Polymerase III from Repression by Maf1 in Vitro." *Journal of Biological Chemistry* **283**(52): 36108-36117.
- Cahan, P, Rovegno, F, Mooney, D, *et al.* (2007). "Meta-analysis of microarray results: challenges, opportunities, and recommendations for standardization." *Gene* **401**(1-2): 12-18.

- Cai, T, Reilly, TR, Cerio, M, *et al.* (1999). "Mutagenesis of SNM1, Which Encodes a Protein Component of the Yeast RNase MRP, Reveals a Role for This Ribonucleoprotein Endoribonuclease in Plasmid Segregation." *Mol. Cell. Biol.* **19**(11): 7857-7869.
- Cairns, CA et White, RJ (1998). "p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription." *Genes Dev.* **12**(11): 3112-3123.
- Canella, D, Praz, V, Reina, JH, *et al.* (2010 ). "Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells" *Genome Research* **20** (6 ): 710-721
- Carbon, P, Murgo, S, Ebel, J-P, *et al.* (1987). "A common octamer motif binding protein is involved in the transcription of U6 snRNA by RNA polymerase III and U2 snRNA by RNA polymerase II." *Cell* **51**(1): 71-79.
- Carol, P (1998). "Signaling to p53: Breaking the MDM2/p53 Circuit." *Cell* **95**(1): 5-8.
- Carter, R et Drouin, G (2010 ). "The Increase in the Number of Subunits in Eukaryotic RNA Polymerase III Relative to RNA Polymerase II Is due to the Permanent Recruitment of General Transcription Factors" *Molecular Biology and Evolution* **27** (5 ): 1035-1043
- Castronovo, V, Kusaka, M, Chariot, A, *et al.* (1994). "Homeobox genes: Potential candidates for the transcriptional control of the transformed and invasive phenotype." *Biochemical Pharmacology* **47**(1): 137-143.
- Centonze, D, Rossi, S, Napoli, I, *et al.* (2007 ). "The Brain Cytoplasmic RNA BC1 Regulates Dopamine D2 Receptor-Mediated Transmission in the Striatum" *The Journal of Neuroscience* **27** (33 ): 8885-8892
- Chang, DD et Clayton, DA (1987). "A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA." *Science.* **235**(4793): 1178-84.
- Chang, HY, Chi, J-T, Dudoit, S, *et al.* (2002 ). "Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99** (20 ): 12877-12882
- Chaussivert, N, Conesa, C, Shaaban, S, *et al.* (1995 ). "Complex Interactions between Yeast TFIIB and TFIIC" *Journal of Biological Chemistry* **270** (25 ): 15353-15358
- Chen, W, Backer, W, Brosius, Jr, *et al.* (1997). "Expression of neural BC200 RNA in human tumours." *The Journal of Pathology* **183**(3): 345-351.
- Cheng, T, Rodrigues, N, Dombkowski, D, *et al.* (2000). "Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1)." *Nat Med* **6**(11): 1235-40.
- Chiu, Y-H, MacMillan, JB et Chen, ZJ (2009). "RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway." *Cell* **138**(3): 576-591.

- Chu, S, Archer, RH, Zengel, JM, *et al.* (1994 ). "The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA " *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91** (2 ): 659-663
- Chu, W-M, Wang, Z, Roeder, RG, *et al.* (1997 ). "RNA Polymerase III Transcription Repressed by Rb through Its Interactions with TFIIIB and TFIIIC2 " *Journal of Biological Chemistry* **272** (23 ): 14755-14761
- Ciesla, M et Boguta, M (2008). "Regulation of RNA polymerase III transcription by Maf1 protein." *Acta Biochim Pol* **55**(2): 215-25. Epub 2008 Jun 17.
- Clarke, PA, Schwemmler, M, Schickinger, Jr, *et al.* (1991 ). "Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 to the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI" *Nucleic Acids Research* **19** (2 ): 243-248
- Cozzarelli, NR, Gerrard, SP, Schlissel, M, *et al.* (1983). "Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5s RNA genes." *Cell* **34**(3): 829-835.
- Cramer, P, Bushnell, DA et Kornberg, RD (2001 ). "Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Å...ngstrom Resolution" *Science* **292** (5523 ): 1863-1876
- Crighton, D, Woiwode, A, Zhang, C, *et al.* (2003). "p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIIB." **22**(11): 2810-2820.
- Das, C, Hizume, K, Batta, K, *et al.* (2006). "Transcriptional Coactivator PC4, a Chromatin-Associated Protein, Induces Chromatin Condensation" *Molecular and Cellular Biology* **26**(22): 8303-8315.
- Das, G, Henning, D, Wright, D, *et al.* (1988). "Upstream regulatory elements are necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III." *Embo J.* **7**(2): 503-12.
- Dephoure, N, Zhou, C, VillÃ©n, J, *et al.* (2008 ). "A quantitative atlas of mitotic phosphorylation" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105** (31 ): 10762-10767
- Dickson, GJ, Kwasniewska, A, Mills, KI, *et al.* (2009). "Hoxa6 potentiates short-term hemopoietic cell proliferation and extended self-renewal." *Experimental Hematology* **37**(3): 322-333.e3.
- Dieci, G et Sentenac, A (1996). "Facilitated Recycling Pathway for RNA Polymerase III." *Cell* **84**(2): 245-252.
- Dieci, G, Fiorino, G, Castelnovo, M, *et al.* (2007). "The expanding RNA polymerase III transcriptome." *Trends in Genetics* **23**(12): 614-622.
- Dingermann, T, Sharp, S, Schaack, J, *et al.* (1983 ). "Stable transcription complex formation of eukaryotic tRNA genes is dependent on a limited separation of the two intragenic control regions. ." *Journal of Biological Chemistry* **258** (17 ): 10395-402



- Diribarne, G et Bensaude, O (2009). "7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor." *rnabiology* **6**(2 1547-6286): 122-128.
- Domitrovich, AM et Kunkel, GR (2003 ). "Multiple, dispersed human U6 small nuclear RNA genes with varied transcriptional efficiencies" *Nucleic Acids Research* **31** (9 ): 2344-2352
- Donze (2011). "Extra-transcriptional functions of RNA Polymerase III complexes: TFIIC as a potential global chromatin bookmark." *Gene*(0).
- Dumay-Odelot, Hln, Marck, C, Durrieu-Gaillard, Sp, *et al.* (2007 ). "Identification, Molecular Cloning, and Characterization of the Sixth Subunit of Human Transcription Factor TFIIC" *Journal of Biological Chemistry* **282** (23 ): 17179-17189
- Dumay-Odelot, Hln, Durrieu-Gaillard, Sp, Da Silva, D, *et al.* (2010). "Cell growth- and differentiation-dependent regulation of RNA polymerase III transcription." *cc* **9**(18 1538-4101): 3687-3699.
- Ebright, RH (2000). "RNA Polymerase: Structural Similarities Between Bacterial RNA Polymerase and Eukaryotic RNA Polymerase II." *Journal of Molecular Biology* **304**(5): 687-698.
- Engelke, DR, Ng, S-Y, Shastry, BS, *et al.* (1980). "Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes." *Cell* **19**(3): 717-728.
- Engels, H, Wohlleber, E, Zink, A, *et al.* (2009). "A novel microdeletion syndrome involving 5q14.3-q15: clinical and molecular cytogenetic characterization of three patients." **17**(12): 1592-1599.
- Ernst, P, Fisher, JK, Avery, W, *et al.* (2004). "Definitive Hematopoiesis Requires the Mixed-Lineage Leukemia Gene." *Developmental Cell* **6**(3): 437-443.
- Esakova, O et Krasilnikov, AS (2010). "Of proteins and RNA: The RNase P/MRP family 10.1261/rna.2214510 " *RNA* **16** (9 ): 1725-1747
- Fabrizio, P, Coppo, A, Fruscoloni, P, *et al.* (1987). "Comparative mutational analysis of wild-type and stretched tRNA<sup>3</sup>(Leu) gene promoters " *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84** (24 ): 8763-8767
- Fairley, JA, Scott, PH et White, RJ (2003). "TFIIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo." *EMBO J* **22**(21): 5841-50.
- Felici, F, Cesareni, G et Hughes, JM (1989). "The most abundant small cytoplasmic RNA of *Saccharomyces cerevisiae* has an important function required for normal cell growth." *Mol. Cell. Biol.* **9**(8): 3260-3268.
- Felton-Edkins, ZA et White, RJ (2002 ). "Multiple Mechanisms Contribute to the Activation of RNA Polymerase III Transcription in Cells Transformed by Papovaviruses" *Journal of Biological Chemistry* **277** (50 ): 48182-48191

- Felton-Edkins, ZA, Fairley, JA, Graham, EL, *et al.* (2003a). "The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB." **22**(10): 2422-2432.
- Felton-Edkins, ZA, Kenneth, NS, Brown, TRP, *et al.* (2003b). "Direct Regulation of RNA Polymerase III Transcription by RB, p53 and c-Myc." *cc* **2**(3 1538-4101): 180-183.
- Felton-Edkins, ZA, Kondrashov, A, Karali, D, *et al.* (2006). "Epstein-Barr Virus Induces Cellular Transcription Factors to Allow Active Expression of EBER Genes by RNA Polymerase III" *Journal of Biological Chemistry* **281** (45 ): 33871-33880
- Fernandez-Tornero, C, Battcher, B, Riva, M, *et al.* (2007). "Insights into Transcription Initiation and Termination from the Electron Microscopy Structure of Yeast RNA Polymerase III." *Molecular Cell* **25**(6): 813-823.
- Fernandez-Tornero, C, Battcher, B, Rashid, UJ, *et al.* (2011). "Analyzing RNA polymerase III by electron cryomicroscopy." *rnabiology* **8**(51547-6286): 0--1.
- Ferrari, R, Rivetti, C, Acker, JI, *et al.* (2004 ). "Distinct roles of transcription factors TFIIB and TFIIC in RNA polymerase III transcription reinitiation" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (37 ): 13442-13447
- Ferri, M-L, Peyroche, G, Siaut, M, *et al.* (2000). "A Novel Subunit of Yeast RNA Polymerase III Interacts with the TFIIB-Related Domain of TFIIB70" *Mol. Cell. Biol.* **20**(2): 488-495.
- Feser, J et Tyler, J (2011). "Chromatin structure as a mediator of aging." *FEBS Letters Epigenetics* **585**(13): 2041-2048.
- Galli, G, Hofstetter, H et Birnstiel, ML (1981). "Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements." *Nature.* **294**(5842): 626-31.
- Ge, H, Zhao, Y, Chait, BT, *et al.* (1994 ). "Phosphorylation negatively regulates the function of coactivator PC4 " *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91** (26 ): 12691-12695
- Geiduschek, EP et Tocchini-Valentini, GP (1988). "Transcription by RNA polymerase III." *Annu Rev Biochem.* **57**: 873-914.
- Geiduschek, EP et Kassavetis, GA (2001). "The RNA polymerase III transcription apparatus." *J Mol Biol* **310**(1): 1-26.
- Ghavidel, A et Schultz, MC (2001). "TATA Binding Protein-Associated CK2 Transduces DNA Damage Signals to the RNA Polymerase III Transcriptional Machinery." *Cell* **106**(5): 575-584.
- Gill, T, Aulds, J et Schmitt, ME (2006 ). "A specialized processing body that is temporally and asymmetrically regulated during the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae* 10.1083/jcb.200512025 " *The Journal of Cell Biology* **173** (1 ): 35-45

- Ginsberg, AM, King, BO et Roeder, RG (1984). "Xenopus 5S gene transcription factor, TFIIB: Characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development." *Cell* **39**(3, Part 2): 479-489.
- Gottesfeld, J, Johnson, D et Nyborg, J (1996). "Transcriptional activation of RNA polymerase III-dependent genes by the human T-cell leukemia virus type 1 tax protein." *Mol. Cell. Biol.* **16**(4): 1777-1785.
- Grove, A, Kassavetis, GA, Johnson, TE, *et al.* (1999). "The RNA polymerase III-recruiting factor TFIIB induces a DNA bend between the TATA box and the transcriptional start site." *Journal of Molecular Biology* **285**(4): 1429-1440.
- Guerrier-Takada, C, Gardiner, K, Marsh, T, *et al.* (1983). "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme." *Cell* **35**(3, Part 2): 849-857.
- Guffanti, E, Ferrari, R, Preti, M, *et al.* (2006 ). "A Minimal Promoter for TFIIC-dependent in Vitro Transcription of snoRNA and tRNA Genes by RNA Polymerase III" *Journal of Biological Chemistry* **281** (33 ): 23945-23957
- Hahn, WC, Counter, CM, Lundberg, AS, *et al.* (1999). "Creation of human tumour cells with defined genetic elements." *Nature* **400**(6743): 464-8.
- Hahn, WC, Dessain, SK, Brooks, MW, *et al.* (2002). "Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation." *Mol Cell Biol* **22**(7): 2111-23.
- Hanas, JS, Bogenhagen, DF et Wu, C-W (1984 ). "Binding of Xenopus transcription factor A to 5S RNA and to single stranded DNA" *Nucleic Acids Research* **12** (6 ): 2745-2758
- Haurie, Vr, Durrieu-Gaillard, Sp, Dumay-Odelot, Hln, *et al.* (2010 ). "Two isoforms of human RNA polymerase III with specific functions in cell growth and transformation 10.1073/pnas.0914980107 " *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** (9 ): 4176-4181
- Henry, NL, Bushnell, DA et Kornberg, RD (1996 ). "A Yeast Transcriptional Stimulatory Protein Similar to Human PC4" *Journal of Biological Chemistry* **271** (36 ): 21842-21847
- Henry, RW, Mittal, V, Ma, B, *et al.* (1998). "SNAP19 mediates the assembly of a functional core promoter complex (SNAPc) shared by RNA polymerases II and III." *Genes Dev* **12**(17): 2664-72.
- Ho, AD et Wagner, W (2007). "The beauty of asymmetry: asymmetric divisions and self-renewal in the haematopoietic system." *Curr Opin Hematol* **14**(4): 330-6.
- Hollstein, M, Sidransky, D, Vogelstein, B, *et al.* (1991). "p53 mutations in human cancers." *Science* **253**(5015): 49-53.
- Houmani, JL, Davis, CI et Ruf, IK (2009). "Growth-Promoting Properties of Epstein-Barr Virus EBER-1 RNA Correlate with Ribosomal Protein L22 Binding" *J. Virol.* **83**(19): 9844-9853.

- Hsieh, Y-J, Kundu, TK, Wang, Z, *et al.* (1999a). "The TFIIC90 Subunit of TFIIC Interacts with Multiple Components of the RNA Polymerase III Machinery and Contains a Histone-Specific Acetyltransferase Activity." *Mol. Cell. Biol.* **19**(11): 7697-7704.
- Hsieh, Y-J, Wang, Z, Kovelman, R, *et al.* (1999b). "Cloning and Characterization of Two Evolutionarily Conserved Subunits (TFIIC102 and TFIIC63) of Human TFIIC and Their Involvement in Functional Interactions with TFIIB and RNA Polymerase III." *Mol. Cell. Biol.* **19**(7): 4944-4952.
- Hu, P, Wu, S, Sun, Y, *et al.* (2002). "Characterization of Human RNA Polymerase III Identifies Orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase III Subunits" *Mol. Cell. Biol.* **22**(22): 8044-8055.
- Hu, P, Wu, S et Hernandez, N (2003). "A Minimal RNA Polymerase III Transcription System from Human Cells Reveals Positive and Negative Regulatory Roles for CK2." *Molecular Cell* **12**(3): 699-709.
- Hu, P, Samudre, K, Wu, S, *et al.* (2004). "CK2 Phosphorylation of Bdp1 Executes Cell Cycle-Specific RNA Polymerase III Transcription Repression." *Molecular Cell* **16**(1): 81-92.
- Huet, J et Sentenac, A (1992). "The TATA-binding protein participates in TFIIB assembly on tRNA genes." *Nucleic Acids Res* **20**(24): 6451-4.
- Iliopoulos, D, Hirsch, HA, Wang, G, *et al.* (2011 ). "Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** (4 ): 1397-1402
- Irizarry, RA, Wu, Z et Jaffee, HA (2006 ). "Comparison of Affymetrix GeneChip expression measures" *Bioinformatics* **22** (7 ): 789-794
- Ishihama, A (1981). "Subunit of assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase." *Adv Biophys* **14**: 1-35.
- Jahn, D, Wingender, E et Seifart, KH (1987). "Transcription complexes for various class III genes differ in parameters of formation and stability towards salt." *Journal of Molecular Biology* **193**(2): 303-313.
- Jarrous, N et Reiner, R (2007 ). "Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor" *Nucleic Acids Research* **35** (11 ): 3519-3524
- Jasiak, AJ, Armache, K-J, Martens, B, *et al.* (2006). "Structural Biology of RNA Polymerase III: Subcomplex C17/25 X-Ray Structure and 11 Subunit Enzyme Model." *Molecular Cell* **23**(1): 71-81.
- Joazeiro, CA, Kassavetis, GA et Geiduschek, EP (1994). "Identical components of yeast transcription factor IIIB are required and sufficient for transcription of TATA box-containing and TATA-less genes." *Mol Cell Biol* **14**(4): 2798-808.

- Johnson, SAS, Dubeau, L et Johnson, DL (2008 ). "Enhanced RNA Polymerase III-dependent Transcription Is Required for Oncogenic Transformation" *Journal of Biological Chemistry* **283** (28 ): 19184-19191
- Johnston, IM, Allison, SJ, Morton, JP, *et al.* (2002). "CK2 Forms a Stable Complex with TFIIIB and Activates RNA Polymerase III Transcription in Human Cells 10.1128/MCB.22.11.3757-3768.2002." *Mol. Cell. Biol.* **22**(11): 3757-3768.
- Kassavetis, GA, Braun, BR, Nguyen, LH, *et al.* (1990). "S. cerevisiae TFIIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors." *Cell* **60**(2): 235-245.
- Kassavetis, GA, Bartholomew, B, Blanco, JA, *et al.* (1991). "Two essential components of the Saccharomyces cerevisiae transcription factor TFIIIB: transcription and DNA-binding properties." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7308-12.
- Kassavetis, GA, Blanco, JA, Johnson, TE, *et al.* (1992a). "Formation of open and elongating transcription complexes by RNA polymerase III." *Journal of Molecular Biology* **226**(1): 47-58.
- Kassavetis, GA, Joazeiro, CAP, Pisano, M, *et al.* (1992b). "The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIIB." *Cell* **71**(6): 1055-1064.
- Kassavetis, GA, Nguyen, ST, Kobayashi, R, *et al.* (1995). "Cloning, expression, and function of TFC5, the gene encoding the B" component of the Saccharomyces cerevisiae RNA polymerase III transcription factor TFIIIB." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9786-90.
- Kassavetis, GA, Prakash, P et Shim, E (2010 ). "The C53/C37 Subcomplex of RNA Polymerase III Lies Near the Active Site and Participates in Promoter Opening" *Journal of Biological Chemistry* **285** (4 ): 2695-2706
- Keller, HJ, Romaniuk, PJ et Gottesfeld, JM (1992 ). "Interaction of Xenopus TFIIIC with the TFIIIA.5 S RNA gene complex. ." *Journal of Biological Chemistry* **267** (25 ): 18190-18198
- Kenneth, NS, Ramsbottom, BA, Gomez-Roman, N, *et al.* (2007 ). "TRRAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** (38 ): 14917-14922
- Khoo, B, Brophy, B et Jackson, SP (1994 ). "Conserved functional domains of the RNA polymerase III general transcription factor BRF." *Genes & Development* **8** (23 ): 2879-2890
- Klausen, C, Leung, PCK et Auersperg, N (2009 ). "Cell Motility and Spreading Are Suppressed by HOXA4 in Ovarian Cancer Cells: Possible Involvement of  $\beta$ 1 Integrin" *Molecular Cancer Research* **7** (9 ): 1425-1437
- Kleinschmidt, RA, LeBlanc, KE et Donze, D (2011 ). "Autoregulation of an RNA polymerase II promoter by the RNA polymerase III transcription factor III C (TFIIIC) complex" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** (20 ): 8385-8389



- Knaus, R, Pollock, R et Guarente, L (1996). "Yeast SUB1 is a suppressor of TFIIB mutations and has homology to the human co-activator PC4." *EMBO J* **15**(8): 1933-40.
- Konkel, MK et Batzer, MA (2010). "A mobile threat to genome stability: The impact of non-LTR retrotransposons upon the human genome." *Seminars in Cancer Biology Repetitive Elements and Genome Instability* **20**(4): 211-221.
- Kundu, TK, Wang, Z et Roeder, RG (1999 ). "Human TFIIC Relieves Chromatin-Mediated Repression of RNA Polymerase III Transcription and Contains an Intrinsic Histone Acetyltransferase Activity " *Molecular and Cellular Biology* **19** (2 ): 1605-1615
- Kunkel, GR, Maser, RL, Calvet, JP, *et al.* (1986 ). "U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III " *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83** (22 ): 8575-8579
- Kunkel, GR et Pederson, T (1988 ). "Upstream elements required for efficient transcription of a human U6 RNA gene resemble those of U1 and U2 genes even though a different polymerase is used." *Genes & Development* **2** (2 ): 196-204
- Lacorazza, HD, Yamada, T, Liu, Y, *et al.* (2006). "The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells." *Cancer Cell* **9**(3): 175-187.
- Landrieux, E, Alic, N, Ducrot, C, *et al.* (2006). "A subcomplex of RNA polymerase III subunits involved in transcription termination and reinitiation." **25**(1): 118-128.
- Larminie, CGC, Sutcliffe, JE, Tosh, K, *et al.* (1999). "Activation of RNA Polymerase III Transcription in Cells Transformed by Simian Virus 40." *Mol. Cell. Biol.* **19**(7): 4927-4934.
- Lefèvre, S, Dumay-Odelot, H, El-Ayoubi, L, *et al.* (2011). "Structure-function analysis of hRPC62 provides insights into RNA polymerase III transcription initiation." **18**(3): 352-358.
- Lerner, MR, Andrews, NC, Miller, G, *et al.* (1981). "Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**(2): 805-9.
- Li, Y, Moir, RD, Sethy-Coraci, IK, *et al.* (2000). "Repression of Ribosome and tRNA Synthesis in Secretion-Defective Cells Is Signaled by a Novel Branch of the Cell Integrity Pathway." *Mol. Cell. Biol.* **20**(11): 3843-3851.
- Liang, C-L, Chen, J-L, Hsu, Y-PP, *et al.* (2002). "Epstein-Barr Virus BZLF1 Gene Is Activated by Transforming Growth Factor- $\beta^2$  through Cooperativity of Smads and c-Jun/c-Fos Proteins."
- Lobo, SM et Hernandez, N (1989). "A 7 bp mutation converts a human RNA polymerase II snRNA promoter into an RNA polymerase III promoter." *Cell* **58**(1): 55-67.
- Lobo, SM, Tanaka, M, Sullivan, ML, *et al.* (1992). "A TBP complex essential for transcription from TATA-less but not TATA-containing RNA polymerase III promoters is part of the TFIIB fraction." *Cell* **71**(6): 1029-1040.

- Lorenzen, K, Vannini, A, Cramer, P, *et al.* (2007). "Structural Biology of RNA Polymerase III: Mass Spectrometry Elucidates Subcomplex Architecture." *Structure* **15**(10): 1237-1245.
- Lygerou, Z, Allmang, C, Tollervey, D, *et al.* (1996). "Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro." *Science*. **272**(5259): 268-70.
- Margottin, F, Dujardin, G, Gerard, M, *et al.* (1991). "Participation of the TATA factor in transcription of the yeast U6 gene by RNA polymerase C." *Science* **251**(4992): 424-6.
- Margueron, R et Reinberg, D (2011). "The Polycomb complex PRC2 and its mark in life." **469**(7330): 343-349.
- Marshall, L (2008). "Elevated RNA polymerase III transcription drives proliferation and oncogenic transformation." *cc* **7**(21 1538-4101): 3327-3329.
- Marshall, L, Kenneth, NS et White, RJ (2008). "Elevated tRNA<sup>i</sup>Met Synthesis Can Drive Cell Proliferation and Oncogenic Transformation." *Cell* **133**(1): 78-89.
- Marshall, L et White, RJ (2008). "Non-coding RNA production by RNA polymerase III is implicated in cancer." **8**(12): 911-914.
- Matera, AG (1999). "Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space." *Trends in Cell Biology* **9**(8): 302-309.
- Mathews, MB (1990). "Control of translation in adenovirus-infected cells." *Enzyme*. **44**(1-4): 250-64.
- Matsuzaki, H, Kassavetis, GA et Geiduschek, EP (1994). "Analysis of RNA Chain Elongation and Termination by *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase III." *Journal of Molecular Biology* **235**(4): 1173-1192.
- Mattaj, IW, Dathan, NA, Parry, HD, *et al.* (1988). "Changing the RNA polymerase specificity of U snRNA gene promoters." *Cell* **55**(3): 435-442.
- McCabe, CD, Spyropoulos, DD, Martin, D, *et al.* (2008 ). "Genome-Wide Analysis of the Homeobox C6 Transcriptional Network in Prostate Cancer" *Cancer Research* **68** (6 ): 1988-1996
- Miller, J, McLachlan, AD et Klug, A (1985). "Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*." *EMBO J* **4**(6): 1609-14.
- Mital, R, Kobayashi, R et Hernandez, N (1996). "RNA polymerase III transcription from the human U6 and adenovirus type 2 VAI promoters has different requirements for human BRF, a subunit of human TFIIIB." *Mol. Cell. Biol.* **16**(12): 7031-7042.
- Mittal, V, Ma, B et Hernandez, N (1999). "SNAP(c): a core promoter factor with a built-in DNA-binding damper that is deactivated by the Oct-1 POU domain." *Genes Dev* **13**(14): 1807-21.



- Mizuta, K et Warner, JR (1994). "Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis." *Mol. Cell. Biol.* **14**(4): 2493-2502.
- Molina, H, Horn, DM, Tang, N, *et al.* (2007). "Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** (7 ): 2199-2204
- Moqtaderi, Z et Struhl, K (2004 ). "Genome-Wide Occupancy Profile of the RNA Polymerase III Machinery in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Loci with Incomplete Transcription Complexes" *Molecular and Cellular Biology* **24** (10 ): 4118-4127
- Moqtaderi, Z, Wang, J, Raha, D, *et al.* (2010). "Genomic binding profiles of functionally distinct RNA polymerase III transcription complexes in human cells." **17**(5): 635-640.
- Mortusewicz, O, Roth, W, Li, N, *et al.* (2008 ). "Recruitment of RNA polymerase II cofactor PC4 to DNA damage sites" *The Journal of Cell Biology* **183** (5 ): 769-776
- Murphy, S, Yoon, JB, Gerster, T, *et al.* (1992). "Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes." *Mol Cell Biol* **12**(7): 3247-61.
- Myslinski, E, Krol, A et Carbon, P (1998 ). "ZNF76 and ZNF143 Are Two Human Homologs of the Transcriptional Activator Staf" *Journal of Biological Chemistry* **273** (34 ): 21998-22006
- Nagai, Y, Garrett, KP, Ohta, S, *et al.* (2006). "Toll-like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment." *Immunity* **24**(6): 801-812.
- Nanbo, A et Takada, K (2002). "The role of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in oncogenesis." *Reviews in Medical Virology* **12**(5): 321-326.
- Neurath, MF et Finotto, S (2011). "IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer." *Cytokine & Growth Factor Reviews* **22**(2): 83-89.
- Nguyen, VT, Kiss, T, Michels, AA, *et al.* (2001). "7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes." **414**(6861): 322-325.
- Nichols, M, Bell, J, Klekamp, MS, *et al.* (1989 ). "Multiple mutations of the first gene of a dimeric tRNA gene abolish in vitro tRNA gene transcription. ." *Journal of Biological Chemistry* **264** (29 ): 17084-17090
- Nierras, CR et Warner, JR (1999). "Protein Kinase C Enables the Regulatory Circuit That Connects Membrane Synthesis to Ribosome Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*."
- Nolte, RT, Conlin, RM, Harrison, SC, *et al.* (1998 ). "Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: Structure of a six-finger transcription factor IIIA complex " *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95** (6 ): 2938-2943

- Oficjalska-Pham, D, Harismendy, O, Smagowicz, WJ, *et al.* (2006). "General Repression of RNA Polymerase III Transcription Is Triggered by Protein Phosphatase Type 2A-Mediated Dephosphorylation of Maf1." *Molecular Cell* **22**(5): 623-632.
- Oler, AJ, Alla, RK, Roberts, DN, *et al.* (2010). "Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors." **17**(5): 620-628.
- Onafuwa-Nuga, AA, King, SR et Telesnitsky, A (2005). "Nonrandom Packaging of Host RNAs in Moloney Murine Leukemia Virus" *J. Virol.* **79**(21): 13528-13537.
- Orioli, A, Pascali, C, Pagano, A, *et al.* (2010). "RNA polymerase III transcription control elements: Themes and variations." *Gene In Press, Corrected Proof*.
- Paule, MR et White, RJ (2000 ). "SURVEY AND SUMMARY Transcription by RNA polymerases I and III" *Nucleic Acids Research* **28** (6 ): 1283-1298
- Pebernard, S et Iggo, RD (2004). "Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors." *Differentiation* **72**(2-3): 103-111.
- Pelham, HR et Brown, DD (1980). "A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(7): 4170-4.
- Pieler, T, Hamm, J et Roeder, RG (1987). "The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing." *Cell* **48**(1): 91-100.
- Pluta, K, Lefebvre, O, Martin, NC, *et al.* (2001). "Maf1p, a Negative Effector of RNA Polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae* 10.1128/MCB.21.15.5031-5040.2001." *Mol. Cell. Biol.* **21**(15): 5031-5040.
- Raha, D, Wang, Z, Moqtaderi, Z, *et al.* (2010 ). "Close association of RNA polymerase II and many transcription factors with Pol III genes" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** (8 ): 3639-3644
- Rajasekhar, VK et Begemann, M (2007). "Concise Review: Roles of Polycomb Group Proteins in Development and Disease: A Stem Cell Perspective." *STEM CELLS* **25**(10): 2498-2510.
- Ralf, D (2005). "Friedrich Miescher and the discovery of DNA." *Developmental Biology* **278**(2): 274-288.
- Raman, V, Martensen, SA, Reisman, D, *et al.* (2000). "Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours." **405**(6789): 974-978.
- Reddy, R, Henning, D, Das, G, *et al.* (1987 ). "The capped U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. ." *Journal of Biological Chemistry* **262** (1 ): 75-81
- Reina, JH, Azzouz, TN et Hernandez, N (2006). "Maf1, a New Player in the Regulation of Human RNA Polymerase III Transcription." *PLoS ONE* **1**(1): e134.

- Reiner, R, Ben-Asouli, Y, Krilovetzky, I, *et al.* (2006 ). "A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription" *Genes & Development* **20** (12 ): 1621-1635
- Richard, P et Manley, JL (2009). "Transcription termination by nuclear RNA polymerases." *Genes Dev* **23**(11): 1247-69.
- Roberts, DN, Wilson, B, Huff, JT, *et al.* (2006). "Dephosphorylation and Genome-Wide Association of Maf1 with Pol III-Transcribed Genes during Repression." *Molecular Cell* **22**(5): 633-644.
- Roeder, RG et Rutter, WJ (1969). "Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms." *Nature*. **224**(5216): 234-7.
- Rollins, J, Veras, I, Cabarcas, S, *et al.* (2007). "Human Maf1 negatively regulates RNA polymerase III transcription via the TFIIB family members Brf1 and Brf2." *Int J Biol Sci* **3**(5): 292-302.
- Rosa, MD, Gottlieb, E, Lerner, MR, *et al.* (1981). "Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII." *Mol. Cell. Biol.* **1**(9): 785-796.
- Rosen, JM et Jordan, CT (2009). "The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm" *Science* **324** (5935 ): 1670-1673
- Rudra, D et Warner, JR (2004). "What better measure than ribosome synthesis? 10.1101/gad.1256704 " *Genes & Development* **18** (20 ): 2431-2436
- Ruet, A, Camier, S, Smagowicz, W, *et al.* (1984). "Isolation of a class C transcription factor which forms a stable complex with tRNA genes." *EMBO J* **3**(2): 343-50.
- Ruf, IK, Rhyne, PW, Yang, C, *et al.* (2000). "Epstein-Barr Virus Small RNAs Potentiate Tumorigenicity of Burkitt Lymphoma Cells Independently of an Effect on Apoptosis 10.1128/JVI.74.21.10223-10228.2000." *J. Virol.* **74**(21): 10223-10228.
- Sadowski, CL, Henry, RW, Lobo, SM, *et al.* (1993 ). "Targeting TBP to a non-TATA box cis-regulatory element: a TBP-containing complex activates transcription from snRNA promoters through the PSE." *Genes & Development* **7** (8 ): 1535-1548
- Samanta, M, Iwakiri, D, Kanda, T, *et al.* (2006). "EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN." **25**(18): 4207-4214.
- Samuel, CE (2001 ). "Antiviral Actions of Interferons" *Clinical Microbiology Reviews* **14** (4 ): 778-809
- Santangelo, AM, de Souza, FvSJ, Franchini, LaF, *et al.* (2007). "Ancient Exaptation of a CORE-SINE Retroposon into a Highly Conserved Mammalian Neuronal Enhancer of the Proopiomelanocortin Gene." *PLoS Genet* **3**(10): e166.

- Schaub, M, Myslinski, E, Schuster, C, *et al.* (1997). "Staf, a promiscuous activator for enhanced transcription by RNA polymerases II and III." **16**(1): 173-181.
- Schlesinger, Y, Straussman, R, Keshet, I, *et al.* (2007). "Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer." **39**(2): 232-236.
- Schramm, L, Pendergrast, PS, Sun, Y, *et al.* (2000 ). "Different human TFIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters" *Genes & Development* **14** (20 ): 2650-2663
- Schuster, C, Myslinski, E, Krol, A, *et al.* (1995). "Staf, a novel zinc finger protein that activates the RNA polymerase III promoter of the selenocysteine tRNA gene." *EMBO J* **14**(15): 3777-87.
- Schwartz, LB, Sklar, VEF, Jaehning, JA, *et al.* (1974 ). "Isolation and Partial Characterization of the Multiple Forms of Deoxyribonucleic Acid-dependent Ribonucleic Acid Polymerase in the Mouse Myeloma, MOPC 315 " *Journal of Biological Chemistry* **249** (18 ): 5889-5897
- Schwartz, YB et Pirrotta, V (2007). "Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes." **8**(1): 9-22.
- Scott, PH, Cairns, CA, Sutcliffe, JE, *et al.* (2001). "Regulation of RNA Polymerase III Transcription during Cell Cycle Entry" *Journal of Biological Chemistry* **276** (2 ): 1005-1014
- Segall, J, Matsui, T et Roeder, RG (1980). "Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III. ." *Journal of Biological Chemistry* **255** (24 ): 11986-11991
- Shen, H-CJ, Rosen, JE, Yang, LM, *et al.* (2008 ). "Parathyroid tumor development involves deregulation of homeobox genes" *Endocrine-Related Cancer* **15** (1 ): 267-275
- Simms, TA, Dugas, SL, Gremillion, JC, *et al.* (2008). "TFIIIC Binding Sites Function as both Heterochromatin Barriers and Chromatin Insulators in *Saccharomyces cerevisiae*."
- Sinn, E, Wang, Z, Kovelman, R, *et al.* (1995 ). "Cloning and characterization of a TFIIC2 subunit (TFIIC beta) whose presence correlates with activation of RNA polymerase III-mediated transcription by adenovirus E1A expression and serum factors." *Genes & Development* **9** (6 ): 675-685
- Sklar, VE et Roeder, RG (1976). "Purification and subunit structure of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase III from the mouse plasmacytoma, MOPC 315." *J Biol Chem* **251**(4): 1064-73.
- Sorensen, PD et Frederiksen, S (1991). "Characterization of human 5S rRNA genes 10.1093/nar/19.15.4147." *Nucleic Acids Research* **19**(15): 4147-4151.
- Stefanovsky, VY, Pelletier, G, Hannan, R, *et al.* (2001). "An Immediate Response of Ribosomal Transcription to Growth Factor Stimulation in Mammals Is Mediated by ERK Phosphorylation of UBF." *Molecular Cell* **8**(5): 1063-1073.

- Stein, GH, Drullinger, LF, Soulard, A, *et al.* (1999 ). "Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts " *Molecular and Cellular Biology* **19** (3 ): 2109-2117
- Stelzl, U, Worm, U, Lalowski, M, *et al.* (2005). "A Human Protein-Protein Interaction Network: A Resource for Annotating the Proteome." *Cell* **122**(6): 957-968.
- Strahl, BD et Allis, CD (2000). "The language of covalent histone modifications." **403**(6765): 41-45.
- Strubin, M et Struhl, K (1992). "Yeast and human TFIID with altered DNA-binding specificity for TATA elements." *Cell* **68**(4): 721-730.
- Stunkel, W, Kober, I et Seifart, KH (1997). "A nucleosome positioned in the distal promoter region activates transcription of the human U6 gene." *Mol Cell Biol* **17**(8): 4397-405.
- Sutcliffe, JE, Brown, TRP, Allison, SJ, *et al.* (2000). "Retinoblastoma Protein Disrupts Interactions Required for RNA Polymerase III Transcription." *Mol. Cell. Biol.* **20**(24): 9192-9202.
- Talbert, PB et Henikoff, S (2010). "Histone variants [mdash] ancient wrap artists of the epigenome." **11**(4): 264-275.
- Tang, R-B, Wang, H-Y, Lu, H-Y, *et al.* (2005). "Increased level of polymerase III transcribed Alu RNA in hepatocellular carcinoma tissue." *Molecular Carcinogenesis* **42**(2): 93-96.
- Tavenet, A, Suleau, A, Dubreuil, Gr, *et al.* (2009 ). "Genome-wide location analysis reveals a role for Sub1 in RNA polymerase III transcription" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106** (34 ): 14265-14270
- Teichmann, M et Seifart, KH (1995). "Physical separation of two different forms of human TFIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro." *EMBO J* **14**(23): 5974-83.
- Teichmann, M, Wang, Z et Roeder, RG (2000). "A stable complex of a novel transcription factor IIB- related factor, human TFIIB50, and associated proteins mediate selective transcription by RNA polymerase III of genes with upstream promoter elements." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14200-5.
- Thuillier, V, Stettler, S, Sentenac, A, *et al.* (1995). "A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation." *EMBO J* **14**(2): 351-9.
- Tian, C, Wang, T, Zhang, W, *et al.* (2007 ). "Virion packaging determinants and reverse transcription of SRP RNA in HIV-1 particles" *Nucleic Acids Research* **35** (21 ): 7288-7302
- Tony, K (2007). "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* **128**(4): 693-705.



- Trinkle-Mulcahy, L, Boulon, Sv, Lam, YW, *et al.* (2008 ). "Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes" *The Journal of Cell Biology* **183** (2 ): 223-239
- Tsang, CK, Liu, H et Zheng, XFS (2010). "mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes." *cc* **9**(51538-4101): 953-957.
- Tysnes, BB (2010). "Tumor-initiating and -propagating cells: cells that we would like to identify and control." *Neoplasia* **12**(7): 506-15.
- Upadhyya, R, Lee, J et Willis, IM (2002). "Maf1 Is an Essential Mediator of Diverse Signals that Repress RNA Polymerase III Transcription." *Molecular Cell* **10**(6): 1489-1494.
- Valenzuela, P, Bell, GI, Weinberg, F, *et al.* (1976a). "Yeast DNA dependent RNA polymerases I, II and III. The existence of subunits common to the three enzymes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **71**(4): 1319-1325.
- Valenzuela, P, Hager, GL, Weinberg, F, *et al.* (1976b). "Molecular structure of yeast RNA polymerase III: demonstration of the tripartite transcriptive system in lower eukaryotes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(4): 1024-8.
- Vannini, A, Ringel, R, Kusser, AG, *et al.* (2010). "Molecular Basis of RNA Polymerase III Transcription Repression by Maf1." *Cell* **143**(1): 59-70.
- Vartanian, K, Slottke, R, Johnstone, T, *et al.* (2009). "Gene expression profiling of whole blood: Comparison of target preparation methods for accurate and reproducible microarray analysis." *BMC Genomics* **10**(1): 2.
- Venters, BJ, Wachi, S, Mavrich, TN, *et al.* (2011). "A Comprehensive Genomic Binding Map of Gene and Chromatin Regulatory Proteins in Saccharomyces." *Molecular Cell* **41**(4): 480-492.
- Waldschmidt, R, Wanandi, I et Seifart, KH (1991). "Identification of transcription factors required for the expression of mammalian U6 genes in vitro." *EMBO J* **10**(9): 2595-603.
- Walkley, CR, Fero, ML, Chien, W-M, *et al.* (2005). "Negative cell-cycle regulators cooperatively control self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells." **7**(2): 172-178.
- Wang, H, Trivedi, A et Johnson, D (1997). "Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway." *Mol. Cell. Biol.* **17**(12): 6838-6846.
- Wang, H, Iacoangeli, A, Popp, S, *et al.* (2002). "Dendritic BC1 RNA: Functional Role in Regulation of Translation Initiation " *The Journal of Neuroscience* **22** (23 ): 10232-10241
- Wang, JK, Tsai, M-C, Poulin, G, *et al.* (2010). "The histone demethylase UTX enables RB-dependent cell fate control" *Genes & Development* **24** (4 ): 327-332

- Wang, J-Y, Sarker, AH, Cooper, PK, *et al.* (2004). "The Single-Strand DNA Binding Activity of Human PC4 Prevents Mutagenesis and Killing by Oxidative DNA Damage" *Molecular and Cellular Biology* **24** (13 ): 6084-6093
- Wang, Z et Roeder, RG (1995). "Structure and function of a human transcription factor TFIIIB subunit that is evolutionarily conserved and contains both TFIIIB- and high-mobility-group protein 2-related domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 7026-30.
- Wang, Z et Roeder, RG (1996). "TFIIIC1 acts through a downstream region to stabilize TFIIIC2 binding to RNA polymerase III promoters." *Mol Cell Biol* **16**(12): 6841-50.
- Wang, Z et Roeder, RG (1997). "Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation." *Genes Dev* **11**(10): 1315-26.
- Wang, Z, Luo, T et Roeder, RG (1997). "Identification of an autonomously initiating RNA polymerase III holoenzyme containing a novel factor that is selectively inactivated during protein synthesis inhibition" *Genes & Development* **11** (18): 2371-2382
- Wang, Z et Roeder, RG (1998). "DNA Topoisomerase I and PC4 Can Interact with Human TFIIIC to Promote Both Accurate Termination and Transcription Reinitiation by RNA Polymerase III." *Molecular Cell* **1**(5): 749-757.
- Wang, Z, Bai, L, Hsieh, Y-J, *et al.* (2000). "Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple-round transcription by human RNA polymerase III." **19**(24): 6823-6832.
- Wei, Y, Tsang, CK et Zheng, XFS (2009). "Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1." **28**(15): 2220-2230.
- Weiss, SB et Gladstone, L (1959). "A MAMMALIAN SYSTEM FOR THE INCORPORATION OF CYTIDINE TRIPHOSPHATE INTO RIBONUCLEIC ACID1." *Journal of the American Chemical Society J. Am. Chem. Soc.* **81**(15): 4118-4119.
- Weissman, AM (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." **2**(3): 169-178.
- Weissman, IL, Anderson, DJ et Gage, F (2001). "STEM AND PROGENITOR CELLS: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**(1): 387-403.
- Werner, M, Hermann-Le Denmat, S, Treich, I, *et al.* (1992). "Effect of mutations in a zinc-binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association." *Mol. Cell. Biol.* **12**(3): 1087-1095.
- Werner, M, Chaussivert, N, Willis, IM, *et al.* (1993 ). "Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor IIIB. ." *Journal of Biological Chemistry* **268** (28 ): 20721-4



- Weser, S, Gruber, C, Hafner, HM, *et al.* (2004 ). "Transcription Factor (TF)-like Nuclear Regulator, the 250-kDa Form of Homo sapiens TFIIB<sup>3</sup>, Is an Essential Component of Human TFIIC1 Activity" *Journal of Biological Chemistry* **279** (26 ): 27022-27029
  - White, R, Gottlieb, T, Downes, C, *et al.* (1995). "Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription." *Mol. Cell. Biol.* **15**(12): 6653-6662.
  - White, RJ et Jackson, SP (1992). "The TATA-binding protein: a central role in transcription by RNA polymerases I, II and III." *Trends in Genetics* **8**(8): 284-288.
  - White, RJ (2005). "RNA polymerases I and III, growth control and cancer." **6**(1): 69-78.
  - White, RJ (2008). "RNA polymerases I and III, non-coding RNAs and cancer." *Trends in Genetics* **24**(12): 622-629.
  - White, RJ (2011). "Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought." **12**(7): 459-463.
  - Widschwendter, M, Fiegl, H, Egle, D, *et al.* (2007). "Epigenetic stem cell signature in cancer." **39**(2): 157-158.
  - Williamson, D, Lu, Y-J, Fang, C, *et al.* (2006). "Nascent pre-rRNA overexpression correlates with an adverse prognosis in alveolar rhabdomyosarcoma." *Genes, Chromosomes and Cancer* **45**(9): 839-845.
- Willis, IM, Desai, N et Upadhyya, R (2004). Signaling Repression of Transcription by RNA Polymerase III in Yeast  
Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. K. Moldave, Academic Press: 323-353.
- Wingender, E, Jahn, D et Seifart, KH (1986). "Association of RNA polymerase III with transcription factors in the absence of DNA. ." *Journal of Biological Chemistry* **261** (3 ): 1409-1413
  - Winter, AG, Sourvinos, G, Allison, SJ, *et al.* (2000). "RNA polymerase III transcription factor TFIIC2 is overexpressed in ovarian tumors" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** (23 ): 12619-12624
  - Woiwode, A, Johnson, SAS, Zhong, S, *et al.* (2008). "PTEN Represses RNA Polymerase III-Dependent Transcription by Targeting the TFIIB Complex" *Mol. Cell. Biol.* **28**(12): 4204-4214.
  - Wong, RC-B, Pollan, S, Fong, H, *et al.* (2011). "A Novel Role for an RNA Polymerase III Subunit POLR3G in Regulating Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells." *STEM CELLS* **29**(10): 1517-1527.
  - Yang, Z, Zhu, Q, Luo, K, *et al.* (2001). "The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription." **414**(6861): 317-322.

- Yik, JHN, Chen, R, Nishimura, R, *et al.* (2003). "Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) Kinase and RNA Polymerase II Transcription by the Coordinated Actions of HEXIM1 and 7SK snRNA." *Molecular Cell* **12**(4): 971-982.
- Yilmaz, AmH, Valdez, R, Theisen, BK, *et al.* (2006). "Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells." **441**(7092): 475-482.
- Yoshinaga, SK, Boulanger, PA et Berk, AJ (1987). "Resolution of human transcription factor TFIIC into two functional components." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(11): 3585-9.
- Zaragoza, D, Ghavidel, A, Heitman, J, *et al.* (1998). "Rapamycin Induces the G0 Program of Transcriptional Repression in Yeast by Interfering with the TOR Signaling Pathway." *Mol. Cell. Biol.* **18**(8): 4463-4470.
- Zhang, G, Campbell, EA, Minakhin, L, *et al.* (1999). "Crystal Structure of Thermus aquaticus Core RNA Polymerase at 3.3 Å Resolution." *Cell* **98**(6): 811-824.
- Zhang, J, Grindley, JC, Yin, T, *et al.* (2006). "PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention." **441**(7092): 518-522.
- Zhao, X, Pendergrast, PS et Hernandez, N (2001). "A Positioned Nucleosome on the Human U6 Promoter Allows Recruitment of SNAPc by the Oct-1 POU Domain." *Molecular Cell* **7**(3): 539-549.
- Zhao, X, Schramm, L, Hernandez, N, *et al.* (2003). "A Shared Surface of TBP Directs RNA Polymerase II and III Transcription via Association with Different TFIIB Family Members." *Molecular Cell* **11**(1): 151-161.

## PUBLICATIONS

# Two isoforms of human RNA polymerase III with specific functions in cell growth and transformation

Valérie Haurie<sup>a,1</sup>, Stéphanie Durrieu-Gaillard<sup>a,1</sup>, Hélène Dumay-Odelot<sup>a</sup>, Daniel Da Silva<sup>a</sup>, Christophe Rey<sup>a</sup>, Martina Prochazkova<sup>b</sup>, Robert G. Roeder<sup>c,2</sup>, Daniel Besser<sup>d</sup>, and Martin Teichmann<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup>Institut Européen de Chimie et Biologie/Université de Bordeaux, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U869, 33607 Pessac, France; <sup>b</sup>Institut Européen de Chimie et Biologie/Université de Bordeaux, INSERM E347, 33607 Pessac, France; <sup>c</sup>The Rockefeller University, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, New York, NY 10021; and <sup>d</sup>Max Delbrück Center, Department of Cancer Research, Laboratory for Signaling Mechanisms in Embryonic Stem Cells, D-13125 Berlin, Germany

Contributed by Robert G. Roeder, December 30, 2009 (sent for review August 6, 2009)

**Transcription in eukaryotic nuclei is carried out by DNA-dependent RNA polymerases I, II, and III. Human RNA polymerase III (Pol III) transcribes small untranslated RNAs that include tRNAs, 5S RNA, U6 RNA, and some microRNAs. Increased Pol III transcription has been reported to accompany or cause cell transformation. Here we describe a Pol III subunit (RPC32 $\beta$ ) that led to the demonstration of two human Pol III isoforms (Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$ ). RPC32 $\beta$ -containing Pol III $\beta$  is ubiquitously expressed and essential for growth of human cells. RPC32 $\alpha$ -containing Pol III $\alpha$  is dispensable for cell survival, with expression being restricted to undifferentiated ES cells and to tumor cells. In this regard, and most importantly, suppression of RPC32 $\alpha$  expression impedes anchorage-independent growth of HeLa cells, whereas ectopic expression of RPC32 $\alpha$  in IMR90 fibroblasts enhances cell transformation and dramatically changes the expression of several tumor-related mRNAs and that of a subset of Pol III RNAs. These results identify a human Pol III isoform and isoform-specific functions in the regulation of cell growth and transformation.**

RPC32 $\alpha$  | RPC32 $\beta$  | ES cells | differentiation | transcription

Transcription in eukaryotes is mediated by three nuclear DNA-dependent RNA polymerases (Pol I, Pol II, and Pol III) (1, 2). Pol III directs transcription of small noncoding RNAs that are involved in translation, splicing, and other cellular processes. Transcription by Pol III is directed by at least three distinct promoter types. Type 1 (5S RNA) and type 2 [tRNA, Alu RNA, and adenoviral viral-associated (VA) RNA] promoters are internal to the gene. Type 3 (U6 and 7SK RNA) promoters are located 5' to the transcription initiation site (3). The transcription factors that directly recognize these promoters [type 1 by gene-specific TFIIA and general initiation factor TFIIC; type 2 by TFIIC; and type 3 by gene-specific PSE-binding transcription factor/small nuclear RNA-activating protein complex (PTF/SNAPc)] have been well characterized and shown to recruit general initiation factor TFIIB to their cognate promoters (reviewed in ref. 4). Overall, the multisubunit compositions of TFIIC and TFIIB have been conserved from yeast to human (5, 6), but two distinct isoforms of TFIIB have been identified in human cells—one (TFIIB- $\beta$ ) active in transcription of type 1 and type 2 promoters and one (TFIIB- $\alpha$ ) active in transcription of type 3 promoters (7). This functional difference reflects the presence of BRF1 in TFIIB- $\beta$  and of its paralogue BRF2 in TFIIB- $\alpha$  (8, 9).

Pol III is highly conserved from yeast to humans and composed of 17 subunits. Of these subunits, five are common to all three polymerases, two are shared by Pol I and Pol III, and five are paralogous to subunits found in Pol I and Pol II. However, five subunits are specific to Pol III without a counterpart in Pol I or Pol II (reviewed in refs. 5 and 10). Three of these five Pol III-specific subunits (RPC32, RPC39, and RPC62) form a dissociable ternary subcomplex that is specifically required for transcription initiation (11). This ternary complex is evolutionary conserved from yeast to human and has been shown to interact with RPC160 and BRF1 (12, 13) and to be positioned near the transcription initiation site of

the *SUP4t RNA<sup>Tyr</sup>* gene (14). Thus far, isozymes for Pol I, II, or III have been documented only for *Arabidopsis* Pol II (15). However, the possibility of Pol III isozymes was raised by the earlier purification, from mouse myeloma cells, of two forms of Pol III that were identical in subunit composition except for the presence of a 32-kDa (Pol III<sub>A</sub>) vs. a 33-kDa (Pol III<sub>B</sub>) subunit (16, 17). However, no further characterization of these enzymes was reported.

Transcription by Pol III is tightly regulated in normal cells, but this regulation is lost during tumorigenesis. Thus, Pol III transcription is negatively regulated in normal cells by tumor suppressor gene products (e.g., Rb, p53, or PTEN) or other factors (MAF1) and activated via signal transduction cascades such as the MAP kinase or the PI3 kinase pathways (reviewed in ref. 18). The loss of tumor suppressor protein activity or deregulated activation of signal transduction cascades leads to enhanced Pol III transcription. Interestingly, recent studies have indicated that enhanced Pol III transcription is required for cell transformation by the *MYC* oncogene (19) and that ectopic expression of the TFIIB- $\beta$  subunit BRF1 or the initiator tRNA<sup>Met</sup> gene leads to transformation of mouse 3T3 fibroblasts (20). However, despite the knowledge that increased Pol III transcription is correlated with tumor development, only limited information is available regarding the underlying molecular mechanisms. Here, after identification of a unique human Pol III subunit, we demonstrate that human cells contain two Pol III isoforms with at least partially distinct functions and, importantly, that one isoform selectively contributes to transformation of human cells.

## Results

**Identification of RPC32 Paralogues RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  and Functional Characterization of the Corresponding Polymerase Isoforms Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$ .** A database search initially identified a paralogue, RPC32 $\beta$ , of the previously described human Pol III subunit RPC32 (10, 11) that is hereafter referred to as RPC32 $\alpha$  (Fig. S1). We then established cell lines that stably express epitope-tagged RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  and, from derived nuclear extracts, affinity-purified Pol III $\alpha$ , containing RPC32 $\alpha$ , and Pol III $\beta$ , containing RPC32 $\beta$  (Fig. 1A). The two Pol III preparations show very similar polypeptide patterns after SDS/PAGE and silver staining and probably differ only in the presence of RPC32 $\alpha$  vs. RPC32 $\beta$ . Both

Author contributions: V.H., S.D.-G., R.G.R., D.B., and M.T. designed research; V.H., S.D.-G., H.D.-O., D.D.S., C.R., M.P., D.B., and M.T. performed research; S.D.-G., R.G.R., and M.T. contributed new reagents/analytic tools; V.H., S.D.-G., H.D.-O., D.D.S., R.G.R., D.B., and M.T. analyzed data; and R.G.R. and M.T. wrote the paper.

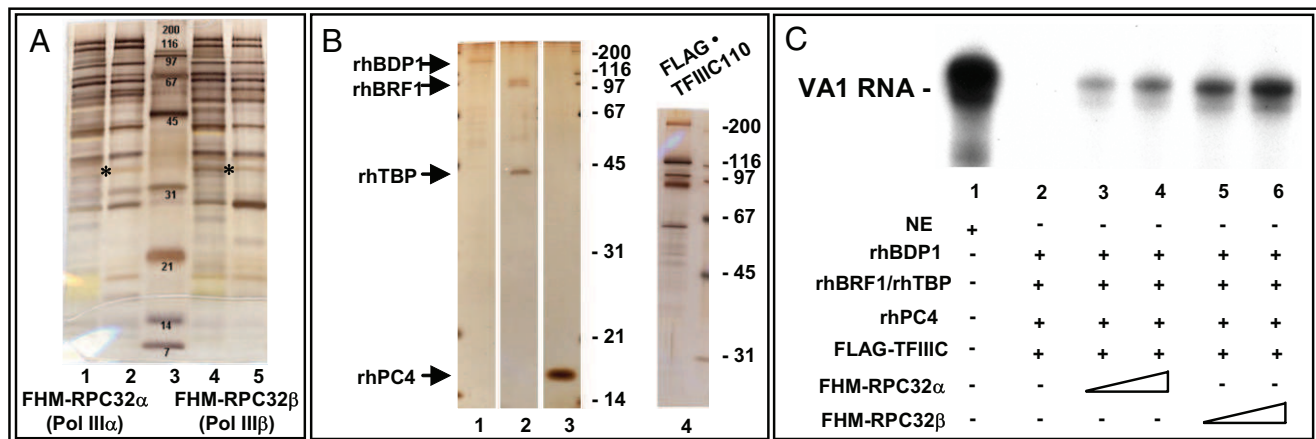
The authors declare no conflict of interest.

Data deposition: The RPC32 $\beta$  cDNA and protein sequences reported in this article have been submitted to GenBank (accession no. DQ418461).

<sup>1</sup>V.H. and S.D.-G. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: roeder@rockefeller.edu or Martin.Teichmann@inserm.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0914980107/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0914980107/DCSupplemental).



**Fig. 1.** RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  assemble into distinct isoforms of human Pol III active in transcription of class III genes. (A) SDS/PAGE (4–20%) analysis of affinity-purified human Pol III $\alpha$  and III $\beta$  preparations. Purification of FLAG-HA-Myc (FHM)-RPC32 $\alpha$ -associated Pol III $\alpha$  in the presence of 0.5% Nonidet P-40 and either 100 (lane 4) or 300 mM KCl (lane 5). The migration of FHM-RPC32 $\alpha$  (lanes 1 and 2) or FHM-RPC32 $\beta$  (lanes 4 and 5) is indicated by an asterisk. Lane 3: Molecular weight standards with indicated masses. (B) SDS/PAGE (4–20%) analysis of purified Pol III transcription factors. Lane 1: 10 ng recombinant human (rh) BDP1 (TFIIB150; ref 9). Lane 2: 12 ng rhBRF1 and 8 ng rhTBP. Lane 3: 50 ng rhPC4. Lane 4: 3  $\mu$ L affinity-purified TFIIC (Flag-TFIIC110 cell line). (C) Transcription of the *VAI* gene in a system reconstituted from highly purified transcription factors (shown in B). Lanes 2–6: 1  $\mu$ L TFIIC, 150 ng rhPC4, 6 ng rhBDP1 (TFIIB150), 4 ng rhTBP, and 6 ng rhBRF1. Lanes 3 and 4: 10 and 20 ng Pol III $\alpha$  (A, lane 2). Lanes 5 and 6: 10 and 20 ng of Pol III $\beta$  (A, lane 5). Lane 1: 10  $\mu$ g HeLa S3 nuclear extract.

forms of Pol III localize primarily to the nucleus (Fig. S2), and both are active in transcription of all known Pol III promoter types in vitro, as evidenced by transcription of *7SK*, *5S*, *VAI*, and *tRNA* genes in reconstituted Pol III-depleted nuclear extracts (Fig. S3) and by transcription of the *VAI* gene in a system reconstituted with recombinant and highly purified components (Figs. 1A–C).

**RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  Display Distinct Expression Patterns During Embryonic Stem Cell Differentiation and Cellular Transformation.** In a further search for possible differences between Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$ , we found that RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  mRNAs are both expressed in human H1 ES cells. Notably, however, there is a strong decline in the level of RPC32 $\alpha$  mRNA, which parallels the decline in ES cell marker mRNAs, during ES cell differentiation (Fig. 2A). In contrast, the level of RPC32 $\beta$  mRNA does not change substantially during ES cell differentiation (Fig. 2A).

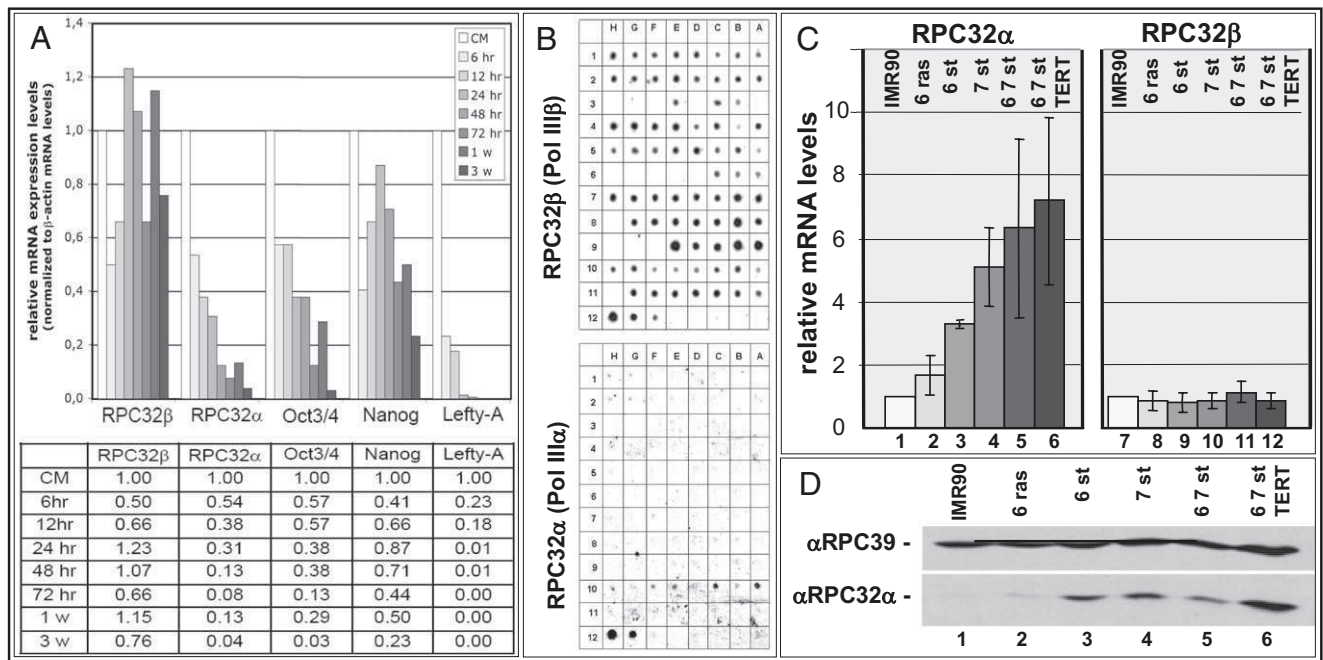
We next analyzed expression levels of RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  mRNAs in differentiated human tissues. RPC32 $\alpha$  mRNA was barely detectable in differentiated tissues and could only be detected in some tumor cell lines (Fig. 2B, Bottom). In contrast, RPC32 $\beta$  mRNA was found in all tissues analyzed, with slightly lower expression levels in certain tumor cell lines (Fig. 2B, Top). To determine in more detail whether expression of RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  mRNA changes during cell transformation, we analyzed IMR90 cells displaying increasingly transformed phenotypes in response to retrovirus vector-mediated expression of combinations of G12V-HRAS, HPV E6, E7, SV40 small T-antigen, and TERT (21, 22). We observed a dramatic increase of RPC32 $\alpha$  mRNA (Fig. 2C) and protein levels (Fig. 2D and Fig. S4A) upon cellular transformation, whereas the levels of RPC32 $\beta$  mRNA remained unchanged (Fig. 2C). As a consequence, relative RPC32 $\alpha$ :RPC32 $\beta$  mRNA levels changed from 1:4 in IMR90 cells to 2:1 in IMR90/E6/E7/st/TERT cells (Fig. S4B). To analyze whether altered RPC32 $\alpha$  expression levels during cellular transformation simply reflect changes in proliferation rates, we arrested IMR90 cells in G0 phase of the cell cycle by serum starvation and released them from arrest thereafter by splitting cells into serum-containing growth media. Surprisingly, RPC32 $\alpha$  expression levels increased 2.6-fold upon arrest in G0 and a further 5.6-fold upon return to midlog phase proliferation (Fig. S5, Bottom), demonstrating that RPC32 $\alpha$  expression, although being influenced by proliferation, does not

strictly correlate with proliferation rate. The mRNA expression of RPC32 $\beta$  did not significantly change during growth arrest and return to midlog phase growth (Fig. S5, Top).

**Suppression of RPC32 $\beta$  by siRNAs Inhibits General Cell Growth, Whereas Suppression of RPC32 $\alpha$  by siRNAs Inhibits Anchorage-Independent Growth.** We next asked whether the expression of RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  is essential for the survival of human cells and whether either influences tumor growth properties. For this purpose, we identified siRNAs that specifically suppress either RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  expression in transiently transfected Huh7 human hepatocarcinoma cells (Fig. S6A). Further analyses showed that reduction of RPC32 $\beta$  mRNA by a cognate siRNA, but not a control siRNA, substantially reduced growth of these cells and increased the number of floating dead cells (Fig. S6B). Seven independent attempts to establish HeLa cell lines that stably express an RPC32 $\beta$  siRNA yielded one extremely slow-growing line that still expressed RPC32 $\beta$  mRNA at approximately half the normal level but none that lacked RPC32 $\beta$ —thus indicating that RPC32 $\beta$  may be essential for cell viability and cannot be compensated by RPC32 $\alpha$ . Importantly, analysis of mRNA expression levels showed an approximately 2.6-fold higher level of RPC32 $\alpha$  mRNA than RPC32 $\beta$  mRNA in HeLa cells that stably express FLAG-RPC53 (Fig. S7, lane 1), suggesting that the suppression of RPC32 $\beta$  does not lead to a general lack of Pol III activity in these cells. Western blot analyses of purified Pol III preparations confirmed that Pol III $\alpha$  is present in at least equivalent quantities as Pol III $\beta$  in HeLa cells (Fig. S8C). In contrast to siRNA-mediated suppression of RPC32 $\beta$ , siRNA-mediated suppression of RPC32 $\alpha$  in Huh7 cells was readily tolerated, and the cells did not show slowed growth (Fig. S6B). Furthermore, suppression of RPC32 $\alpha$  in HeLa cells by a stably expressed RPC32 $\alpha$  siRNA (Fig. 3A and Fig. S7) did not affect growth on Petri dishes. Surprisingly, however, stable suppression of RPC32 $\alpha$  by siRNAs dramatically reduced the formation of colonies in soft-agar assays (Fig. 3B).

**Ectopic Expression of RPC32 $\alpha$  Induces Anchorage-Independent Growth in Partially Transformed Human IMR90 Fibroblasts.** Because suppression of RPC32 $\alpha$  inhibited colony formation in soft-agar assays, we asked whether ectopic expression of RPC32 $\alpha$  would induce colony formation in such assays. For this purpose, we used IMR90





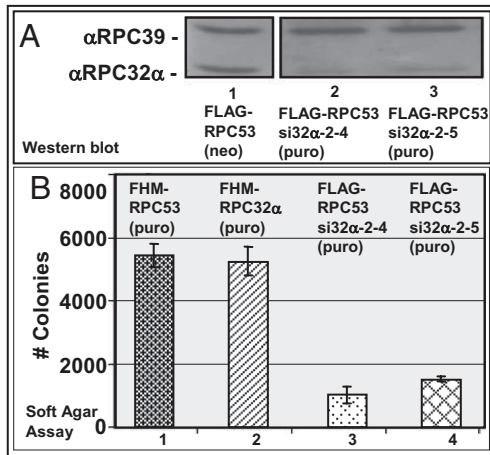
**Fig. 2.** RPC32 $\alpha$  mRNA expression is down-regulated during human stem cell differentiation and up-regulated during cell transformation. (A) Relative mRNA levels determined by RT-qPCR (*Materials and Methods*) before induction of differentiation and at specific time points during 3 weeks of differentiation of human H1 ES cells. mRNAs analyzed are indicated below the respective diagrams. (B) Dot blot analysis (*Materials and Methods*) of RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  mRNA levels in 73 different human tissues or cell lines. Representation of RNAs from different tissues is shown in Table S1. (C) Schematic representation of relative mRNA levels of RPC32 $\alpha$  (Left) or RPC32 $\beta$  (Right) in human IMR90 fibroblasts (lanes 1 and 7) and IMR90 fibroblasts that stably express the proteins indicated at the top: E6 and ras (lanes 2 and 8), E6 and st (lanes 3 and 9), E7 and st (lanes 4 and 10), E6/E7/st (lanes 5 and 11), or E6/E7/st and TERT (lanes 6 and 12). 6, HPV E6; 7, HPV E7; st, SV40 small t; TERT, catalytic subunit of telomerase. Relative mRNA levels determined by RT-qPCR (*Materials and Methods*) are depicted on the left. (D) Western blot analysis of nuclear extracts derived from IMR90 cells (lane 1) or derivatives of IMR90 cells expressing E6 and ras (lane 2), E6 and st (lane 3), E7 and st (lane 4), E6/E7/st (lane 5), or E6/E7/st/TERT (lane 6). The same blot was probed with anti-RPC39 antibodies (Top) or affinity-purified anti-RPC32 $\alpha$  antibodies (Bottom; the specificity of the anti-RPC32 $\alpha$  antibodies is shown in Fig. S8 A and B).

fibroblasts and established partially transformed IMR90 derivatives (expressing HPV E6 and E7 proteins) (21, 22) that stably express epitope-tagged forms of either RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  (at least three independent clones for each cell line). Expression levels of ectopic RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  were monitored by Western blot (Fig. S9). The partially transformed IMR90 cell lines expressing ectopic RPC32 $\alpha$  showed enhanced growth properties at  $\approx$ 10–15 doubling times after selection by puromycin. Importantly, ectopic expression of RPC32 $\alpha$  also enhanced the colony formation capability of the partially transformed IMR90 fibroblasts, whereas ectopic expression of RPC32 $\beta$ , by contrast, slightly inhibited the colony formation capability of these cells (Fig. 4A and Fig. S10).

**Ectopic Expression of RPC32 $\alpha$  Strongly Influences the Expression of Tumor- and Invasion-Related mRNAs.** To investigate the molecular basis for the observed differences between ectopically expressed RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  effects on the growth of transformed IMR90 fibroblasts, RNAs from the three cell lines were subjected to Atlas Cancer 1.2 microarray analyses (Fig. 4B). Strikingly, ectopic expression of RPC32 $\alpha$  in the partially transformed IMR90 cell lines increased the expression of genes, including *S100A4* (23), replication factor C subunit *RFC40* (24), *EZRIN* (25) and *RAC1* (26), that previously have been associated with cell survival, tumor growth and metastasis. Furthermore, ectopic expression of RPC32 $\alpha$  reduced expression of genes with reported tumor suppressor activity, such as *PREFOLDIN 5 (MM-1)* (27) or *KLF6* (28), when compared either with partially transformed IMR90 cells or with partially transformed IMR90 cells with ectopically expressed RPC32 $\beta$  (Fig. 4B and Table S2). These data led us to analyze (by Western blot) whether the expression of other tumor-related proteins was altered upon ectopic expression of RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  in partially transformed cells. In this regard, cyclin E,

aurora A, and P27KIP1 levels were increased by ectopic RPC32 $\alpha$  expression but remained unchanged by ectopic RPC32 $\beta$  expression (Fig. 4C). In contrast, the levels of p53 and lamin A/C were dramatically down-regulated by ectopic RPC32 $\alpha$  expression, but either unchanged (lamin A/C) or moderately increased (p53) by ectopic RPC32 $\beta$  expression (Fig. 4C). It should be noted that lamin A/C is not expressed in mouse cells before day 9 of development (29) and is thus absent in ES cells that contain high levels of Pol III $\alpha$ , consistent with the possibility that RPC32 $\alpha$  may be involved in the regulation of lamin A/C expression. Along with the above-described effects of ectopically expressed RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  on the growth properties of cells, these gene expression results suggest that RPC32 $\alpha$  exhibits oncogenic potential, whereas RPC32 $\beta$  instead may show tumor-suppressive activity under our experimental procedures.

Even though we did not detect clear differences in the transcriptional activities of Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  in our DNA-templated in vitro assays (Fig. 1C and Fig. S3 B–E), where normal constraints may be missing, we used RT-quantitative PCR (qPCR) to analyze the expression of several Pol III-transcribed genes in partially transformed IMR90 cells and in derivative cell lines that ectopically express either RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$ . As shown in Fig. 4D, expression of 5S RNA, U6 RNA, and 7SK RNA was strongly enhanced (lanes 5–7), and that of initiator tRNA<sup>Met</sup> and of BC200 RNA moderately enhanced (lanes 3 and 4), upon stable ectopic expression of RPC32 $\alpha$ . In contrast, tRNA<sup>Glu</sup> expression remained unaffected, and vault1 RNA expression decreased upon ectopic expression of RPC32 $\alpha$  (lanes 1 and 2). Remarkably, ectopic expression of RPC32 $\beta$  did not change considerably the expression of any of these Pol III genes (Fig. 4D). These data indicate that the observed dramatic changes in 5S RNA, U6 RNA, and 7SK RNA expression are specifically caused



**Fig. 3.** siRNA-mediated suppression of RPC32 $\alpha$  impedes colony formation of HeLa cells in soft-agar assays. (A) Western blot. HeLa cells (BN51) that stably express FLAG-RPC53/neo (11) were transfected with pSuper-si32 $\alpha$ -2/puro, and individual clones were selected after addition of 2  $\mu$ g/mL puromycin. Nuclear extracts were used for affinity purification of Pol III (via FLAG-RPC53), and the eluates were analyzed with anti-RPC39 or anti-RPC32 $\alpha$  antibodies. Purifications from 500  $\mu$ g nuclear extract of FLAG-RPC53/neo HeLa cells (lane 1), FLAG-RPC53-si32 $\alpha$ -2 clone 4 (lane 2), or clone 5 (lane 3) HeLa cells. (B) Soft agar assay, in the presence of 2  $\mu$ g/mL puromycin, of HeLa cells stably expressing FHM-RPC53/puro (lane 1), FHM-RPC32 $\alpha$ /puro (lane 2), FLAG-RPC53/neo (lanes 3 and 4), and RPC32 $\alpha$  siRNA 32 $\alpha$ -2 (lane 3, clone 4 and lane 4, clone 5). The numbers of colonies formed are indicated to the left.

by ectopic expression of RPC32 $\alpha$  and not due to a general deregulation of transcription.

## Discussion

In this report we describe a human Pol III isoform that contains the newly identified RPC32 $\beta$  subunit instead of the paralogue RPC32 $\alpha$  subunit and further compare the expression and function of RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  and the corresponding isozymes. RPC32 $\beta$  is widely expressed in all tissues analyzed and seems to be indispensable for cell survival, leading to the conclusion that RPC32 $\beta$ -containing Pol III $\beta$  represents the general form of human Pol III. In contrast, RPC32 $\alpha$  shows a restricted expression pattern and is predominantly found in undifferentiated human ES cells and in transformed cells. Furthermore, and most importantly, ectopic expression of RPC32 $\alpha$  in partially transformed cells enhances transformation in association with gene-specific transcription events, whereas its suppression in tumor cells impedes tumor cell growth, underscoring an important function of RPC32 $\alpha$  in the establishment and maintenance of tumor cell growth.

**Isoform-Specific Functions of Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$ .** On the basis of our findings that the distinguishing subunit, RPC32 $\beta$ , is expressed in all tissues tested and in both undifferentiated and differentiated human ES cells, Pol III $\beta$  seems to be ubiquitous. These results suggest that Pol III $\beta$  may be critical for transcription of class III genes that are essential for the growth and homeostasis of both undifferentiated and differentiated cells. This hypothesis is further supported by the apparently lethal phenotype of siRNA-mediated suppression of RPC32 $\beta$ , which also indicates that Pol III $\alpha$  cannot replace all Pol III $\beta$  functions in vivo. Hence, and given the dispensability of Pol III $\alpha$  for cell viability, Pol III $\beta$  seems to be the more general form of Pol III.

In contrast to Pol III $\beta$ , the originally identified form of human Pol III (Pol III $\alpha$ ) does not seem to be essential for the survival of all cells, but it may exert important functions in only a subset of cells. The elevated expression of RPC32 $\alpha$  mRNA—and thus Pol

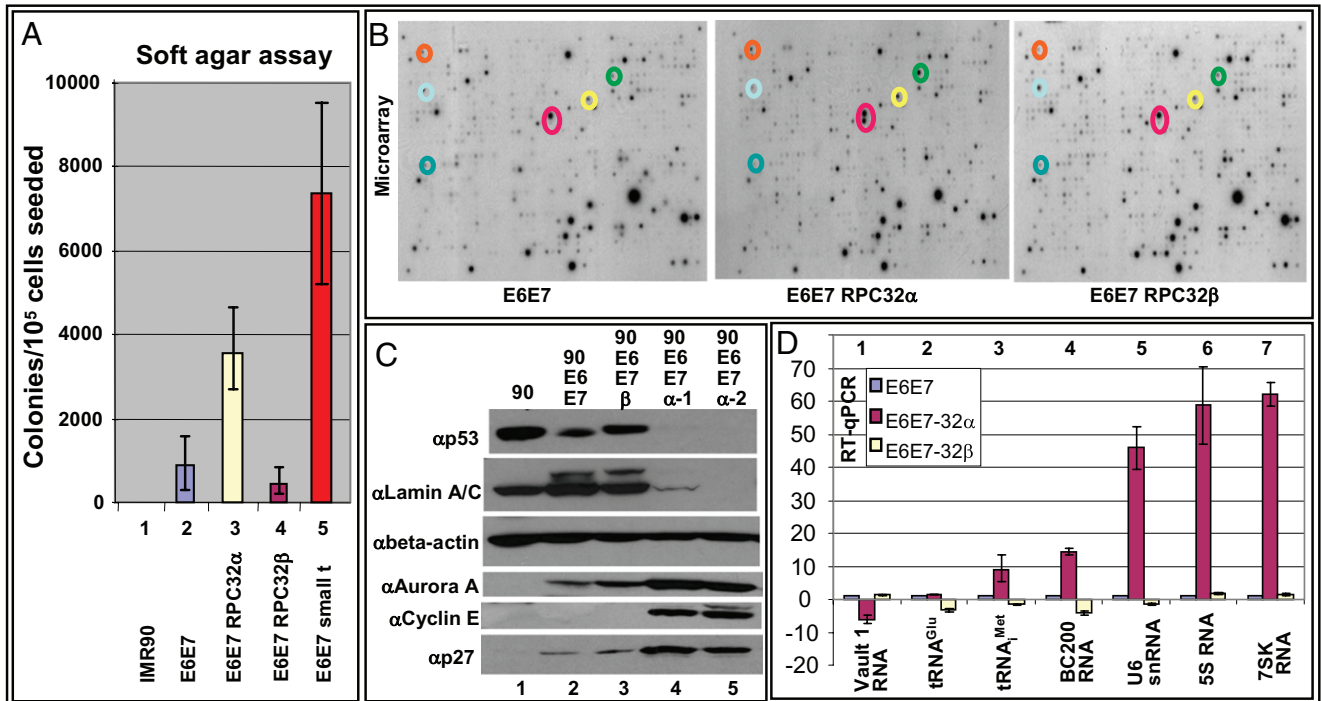
III $\alpha$ —in undifferentiated human H1 ES cells and in tumor cells, as well as a clear increase in RPC32 $\alpha$  mRNA levels during transformation of IMR90 fibroblasts with defined genetic elements, indicate that RPC32 $\alpha$  mRNA expression may be related to the differentiation status of a cell. Although siRNA-mediated knockdown of RPC32 $\alpha$  is not lethal for HeLa cells, suggesting that Pol III $\beta$  can provide all essential Pol III functions in these tumor cells, it does result in loss of colony formation in soft-agar assays, underscoring an important function for RPC32 $\alpha$  in sustaining anchorage-independent growth of transformed cells. Because RPC32 $\alpha$ , and thus Pol III $\alpha$ , is predominantly found in undifferentiated or transformed cells, the functions of Pol III $\alpha$  may include the transcription of noncoding genes that help keep these cells in an undifferentiated or transformed state.

**Target Gene Specificity of Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  In Vitro and In Vivo.** In vitro transcription assays with naked DNA templates and either Pol III-depleted nuclear extract or purified initiation factors have shown nearly comparable abilities of purified Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  to accurately transcribe 5S RNA, tRNA, VAI RNA, and 7SK RNA genes (Fig. 1C and Fig. S3). Thus, in conjunction with general transcription initiation factors, Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  both have intrinsic abilities for accurate transcription directed by each of the three class III promoter types. Although target gene specificity for Pol III $\alpha$  vs. Pol III $\beta$  was not evident from the limited number of class III genes tested in vitro, ectopic expression of RPC32 $\alpha$  in partially transformed human fibroblasts resulted in enhanced levels of some, but not all, of the analyzed Pol III transcripts in vivo (Fig. 4D).

Isoform-specific effects on different class III genes in vivo clearly suggest isoform-specific interactions with accessory transcription factors or other gene regulatory proteins. In this regard, the differential effects of ectopically expressed Pol III $\alpha$  on transcription of two distinct type 2 genes (tRNA<sup>Met</sup> and tRNA<sup>Glu</sup>) that commonly involve promoter recognition by TFIIC and TFIIB are most intriguing, because they also imply the existence of additional, hitherto unsuspected regulatory transcription factors for these genes. Regulatory factors could counteract intracellular constraints to transcription that may include (i) repressive chromatin structures that impose requirements for chromatin remodeling factors that are directly recruited or stabilized by the Pol III transcription machinery (30), (ii) limiting concentrations of general initiation or gene-specific Pol III factors, or (iii) various general repressors of Pol III transcription, such as p53, Rb, ARF, PTEN, and MAF-1 (18). Alternatively, such regulatory factors could be involved in the assembly of subnuclear architectures, as may be evidenced by perinuclear compartments that depend on Pol III transcription and are predominant in certain cancer cells (31).

Some of the Pol III genes that are differentially regulated in vivo, most notably initiator tRNA<sup>Met</sup>, have been reported to be associated with cell proliferation and transformation. Specifically, it was shown that initiator tRNA<sup>Met</sup> expression increases, whereas elongator tRNA<sup>Met</sup> expression decreases, during cell cycle progression in proliferating liver cells (32). This is consistent with our observation of a selective effect of ectopic RPC32 $\alpha$  expression on tRNA<sup>Met</sup> synthesis relative to tRNA<sup>Glu</sup> synthesis. Furthermore, enhanced initiator tRNA<sup>Met</sup> levels were reported to accompany or cause cell proliferation and transformation in experimental systems (19, 20). Although we observed the highest increases in 7SK, U6, and 5S RNA expression, rather than in initiator tRNA<sup>Met</sup> expression, it remains to be determined whether these ubiquitously expressed RNAs actively intervene in cell transformation or whether their ectopic expression simply accompanies this process. It also remains to be determined whether, as seems likely, there are other, hitherto unknown Pol III-transcribed genes that contribute to the regulation of ES cell differentiation or to cell transformation and that are differentially transcribed by Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$ .





**Fig. 4.** RPC32 $\alpha$  contributes to transformation of IMR90 fibroblasts and changes the expression of several transformation-associated Pol II genes. (A) Soft-agar assay of human IMR90 fibroblasts (lane 1) and IMR90 fibroblasts that stably express the proteins indicated at the bottom (lanes 2–5). The numbers of colonies formed are indicated on the left. (B) Atlas Cancer 1.2 microarray (Clontech). Membranes were incubated with radioactively labeled cDNAs from IMR90 cells expressing E6 and E7 (Left), E6, E7, and RPC32 $\alpha$  (Middle), or E6, E7, and RPC32 $\beta$  (Right). Table S2 summarizes quantitative results obtained by using the Image Quant program. Some of the regulated RNAs are encircled (S100A4: lower dot in the red oval; circles: RFC40/green; ezrin/orange; rac1/yellow; prefoldin/light blue; KLF6/turquoise). (C) Western blot. Twenty micrograms of nuclear extract, derived from IMR90 fibroblasts (lane 1) or IMR90 fibroblasts expressing E6 and E7 (lane 2), E6, E7, and RPC32 $\beta$  (lane 3), or E6, E7, and RPC32 $\alpha$  (lanes 4 and 5; two distinct clones) were separated by SDS-10% PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with the antibodies indicated on the left. (D) RT-qPCR. Expression of individual RNAs was determined in IMR90 fibroblasts expressing E6 and E7 (blue bars), E6, E7, and RPC32 $\alpha$  (purple bars), or E6, E7, and RPC32 $\beta$  (light yellow bars). The following Pol III-transcribed genes were analyzed: Vault 1 RNA (lane 1); tRNA<sup>Glu</sup> (lane 2); Initiator tRNA<sup>Met</sup> (lane 3); BC200 RNA (lane 4); U6 RNA (lane 5); 5S RNA (lane 6); and 7SK RNA (lane 7). The height of the bars indicates the relative expression level compared with the expression in IMR90, E6, and E7, which was set as 1.

Interestingly, ectopic RPC32 $\alpha$  expression in partially transformed fibroblasts also increased the expression of several Pol II-transcribed genes associated with cell survival, tumor growth, and metastasis, while reducing expression of several genes with tumor suppressor activity. These effects were also specific for ectopically expressed RPC32 $\alpha$  relative to RPC32 $\beta$  and must result from indirect effects of Pol III $\alpha$  transcription events on the corresponding Pol II-transcribed genes. Because it was recently reported that Pol III is involved in transcription of several human micro RNAs (33, 34), it is conceivable that Pol III $\alpha$  mediates transcription of certain miRNAs or other types of regulatory RNAs that target genes contributing to the induction of differentiation or to the inhibition of cell transformation-related events. Given our identification of profound effects of Pol III $\alpha$  on cell differentiation and transformation, future studies must be directed toward identification of the direct Pol III $\alpha$  target genes involved in these effects and the mechanisms involved in their activation and function.

## Materials and Methods

**Plasmids and Protein Purification.** Plasmids ph7SK, pTRNA, pVA1, and pH5S8544, in vitro transcription conditions, purification of recombinant proteins, establishment of cell lines that stably express epitope-tagged proteins and their purification, SDS/PAGE, Western blot, and silver staining procedures were as previously described (refs. 7, 9, 35; *SI Materials and Methods*).

**Suppression of RPC32 $\alpha$  and of RPC32 $\beta$  by siRNAs.** Transfection of Huh7 and of HeLa cells was performed with jetSI-ENDO (Eurogentec). The establishment of cell lines stably expressing siRNAs from pSuper vectors was performed as

described for the stable expression of epitope-tagged proteins (9). The siRNA sequences are available on request.

**Cell Culture.** The growth of HeLa cells was as previously described (7). Conditions for growth and differentiation of human H1 ES cells were as previously described (36). IMR90 cells were grown in the presence of 15% FBS. Nuclear extracts were obtained from cells in midlog phase growth at maximally 70% confluence. pBabe-ras (37), pBabe-TERT (21), and pZIPSV40 (38) were kindly provided, respectively, by Scott Lowe, Robert Weinberg, and Parmjit Jat. The gene encoding SV40 small t was amplified by PCR from pZIPSV40 and cloned into the pBabe-puro vector. Growth of cells in soft agar was as previously described (21).

**Dot Blot Analyses.** The BD MTE (multiple tissue expression) Array was sequentially hybridized with radioactive RPC32 $\beta$  and RPC32 $\alpha$  probes. The probes were amplified by PCR with appropriate cDNAs as template and with primers specific for RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$ , respectively (sequences are available on request). PCR products (25 ng) were radio-labeled with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP by random priming labeling (Invitrogen Random Primer DNA Labeling System). The probes were incubated with the MTE Array for 16 h at 42 °C in 50% formamide, 5 $\times$  standard saline phosphate/EDTA (SSPE) buffer, 5 $\times$  Denhardt's solution, and 0.5% SDS. Subsequent washes were performed as recommended by the supplier (Clontech).

**RT Quantitative Real-Time PCR.** For each sample, 2  $\mu$ g of total RNA were reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamer primers (Roche). Reverse transcribed RNA (5 ng) was analyzed by SYBR Green PCR analysis using the Mx4000 Multiplex Quantitative PCR System and Mx4000 software, version 4.2 (Stratagene). Results were normalized as previously described (39).

**ACKNOWLEDGMENTS.** Supported by a start-up grant from the Conseil Régional d'Aquitaine and the European Regional Development Fund for (to M.T.); and by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) "REGPOLSTRESS" (to M.T.), the Ligue Contre le Cancer-Comités Gironde

and Dordogne (to M.T. and M.P.), and the National Institutes of Health (to R.G.R.). V.H. was supported by a postdoctoral fellowship from the Conseil Régional d'Aquitaine. D.B. was supported by Grant BE3257/1-1 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

1. Roeder RG, Rutter WJ (1969) Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* 224:234–237.
2. Roeder RG (2003) Lasker Basic Medical Research Award. The eukaryotic transcriptional machinery: Complexities and mechanisms unforeseen. *Nat Med* 9:1239–1244.
3. Dieci G, Fiorino G, Castelnuovo M, Teichmann M, Pagano A (2007) The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet* 23:614–622.
4. Schramm L, Hernandez N (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 16:2593–2620.
5. Huang Y, Marais RJ (2001) Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res* 29:2675–2690.
6. Dumay-Odelot H, et al. (2007) Identification, molecular cloning, and characterization of the sixth subunit of human transcription factor TFIIIC. *J Biol Chem* 282:17179–17189.
7. Teichmann M, Seifart KH (1995) Physical separation of two different forms of human TFIIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro. *EMBO J* 14:5974–5983.
8. Schramm L, Pendergrast PS, Sun Y, Hernandez N (2000) Different human TFIIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes Dev* 14:2650–2663.
9. Teichmann M, Wang Z, Roeder RG (2000) A stable complex of a novel transcription factor IIB-related factor, human TFIIIB50, and associated proteins mediate selective transcription by RNA polymerase III of genes with upstream promoter elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14200–14205.
10. Hu P, et al. (2002) Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol Cell Biol* 22:8044–8055.
11. Wang Z, Roeder RG (1997) Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev* 11:1315–1326.
12. Thuillier V, Stettler S, Sentenac A, Thuriaux P, Werner M (1995) A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *EMBO J* 14:351–359.
13. Werner M, Chaussivert N, Willis IM, Sentenac A (1993) Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor IIIB. *J Biol Chem* 268:20721–20724.
14. Bartholomew B, Durkovich D, Kassavetis GA, Geiduschek EP (1993) Orientation and topography of RNA polymerase III in transcription complexes. *Mol Cell Biol* 13:942–952.
15. Ream TS, et al. (2009) Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol Cell* 33:192–203.
16. Sklar VE, Schwartz LB, Roeder RG (1975) Distinct molecular structures of nuclear class I, II, and III DNA-dependent RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:348–352.
17. Sklar VE, Roeder RG (1976) Purification and subunit structure of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase III from the mouse plasmacytoma, MOPC 315. *J Biol Chem* 251:1064–1073.
18. Marshall L, White RJ (2008) Non-coding RNA production by RNA polymerase III is implicated in cancer. *Nat Rev Cancer* 8:911–914.
19. Johnson SA, Dubeau L, Johnson DL (2008) Enhanced RNA polymerase III-dependent transcription is required for oncogenic transformation. *J Biol Chem* 283:19184–19191.
20. Marshall L, Kenneth NS, White RJ (2008) Elevated tRNA(iMet) synthesis can drive cell proliferation and oncogenic transformation. *Cell* 133:78–89.
21. Hahn WC, et al. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400:464–468.
22. Hahn WC, et al. (2002) Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol* 22:2111–2123.
23. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR (2006) S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 281:677–680.
24. Gupte RS, Weng Y, Liu L, Lee MY (2005) The second subunit of the replication factor C complex (RFC40) and the regulatory subunit (R1alpha) of protein kinase A form a protein complex promoting cell survival. *Cell Cycle* 4:323–329.
25. Fais S (2007) Cannibalism: A way to feed on metastatic tumors. *Cancer Lett* 258:155–164.
26. Bauer NN, Chen YW, Samant RS, Shevde LA, Fodstad O (2007) Rac1 activity regulates proliferation of aggressive metastatic melanoma. *Exp Cell Res* 313:3832–3839.
27. Fujioka Y, et al. (2001) MM-1, a c-Myc-binding protein, is a candidate for a tumor suppressor in leukemia/lymphoma and tongue cancer. *J Biol Chem* 276:45137–45144.
28. Camacho-Vanegas O, et al. (2007) Functional inactivation of the KLF6 tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma. *Int J Cancer* 121:1390–1395.
29. Constantinescu D, Gray HL, Sammak PJ, Schatten GP, Csoka AB (2006) Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* 24:177–185.
30. Mertens C, Roeder RG (2008) Different functional modes of p300 in activation of RNA polymerase III transcription from chromatin templates. *Mol Cell Biol* 28:5764–5776.
31. Pollock C, Huang S (2009) The perinucleolar compartment. *J Cell Biochem* 107:189–193.
32. Kanduc D (1997) Changes of tRNA population during compensatory cell proliferation: Differential expression of methionine-tRNA species. *Arch Biochem Biophys* 342:1–5.
33. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:1097–1101.
34. Oszolac F, et al. (2008) Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 22:3172–3183.
35. Wang Z, Luo T, Roeder RG (1997) Identification of an autonomously initiating RNA polymerase III holoenzyme containing a novel factor that is selectively inactivated during protein synthesis inhibition. *Genes Dev* 11:2371–2382.
36. Besser D (2004) Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3. *J Biol Chem* 279:45076–45084.
37. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88:593–602.
38. Jat PS, Cepko CL, Mulligan RC, Sharp PA (1986) Recombinant retroviruses encoding simian virus 40 large T antigen and polyomavirus large and middle T antigens. *Mol Cell Biol* 6:1204–1217.
39. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.

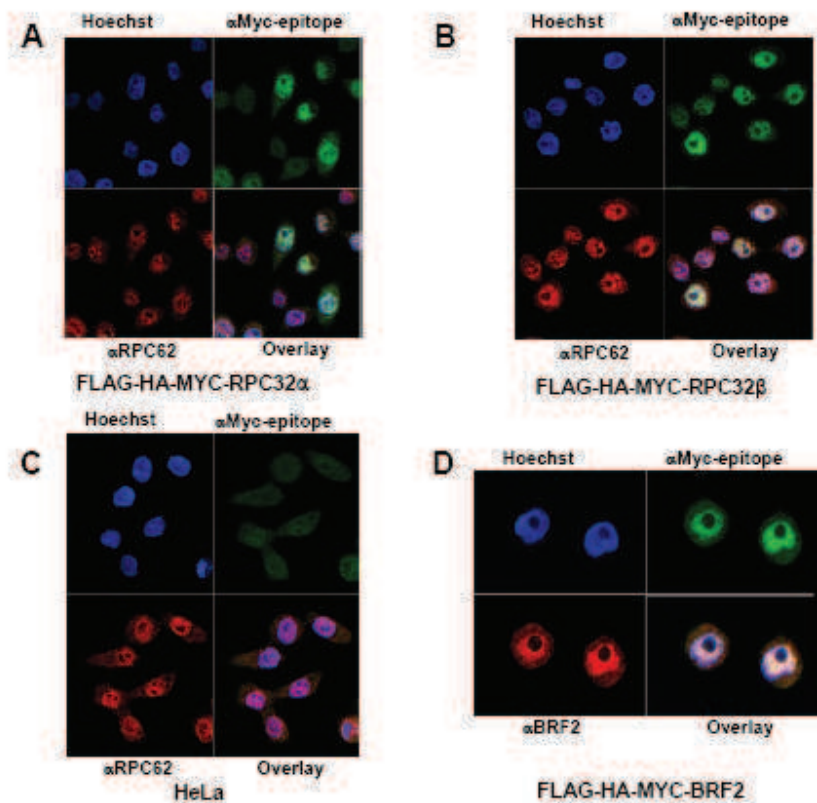
## SUPPORTING APPENDIX

### Supp. Appendix Figures:

<b>RPC32<math>\alpha</math></b>	1	MA---GNKGRGRAAYTFNIEAVGFSKGEKLPDVVLKPPPLFPD TDYKVPV	47
		MA G +GRGR TFN+EAVG KG+ LP L+P PLFP +++PVP	
<b>RPC32<math>\beta</math></b>	1	MASRGGGRGRGRGQLTFNVEAVGIGKGDALPPPTLQPSPLFPPLFRPVP	50
<b>RPC32<math>\alpha</math></b>	48	LKTGEGEEYMLALKQELRETMKRMPYFIETPEERQDIERYSKRYMKV---	94
		L +GE EY+LALKQELR M+++PYFI ++D+ERYS +Y	
<b>RPC32<math>\beta</math></b>	51	LPSGEEGEYVLALKQELRGAMRQLPYFIRPAVPKRDVERYSDKYQMSGPI	100
<b>RPC32<math>\alpha</math></b>	95	-YKEEWIPDWRRLPREMMPR-NKCKKAGPKPKKAKDAGKGTPLTNTEDVL	142
		+W PDWRRLPRE+ R K +K K K T + E+ +	
<b>RPC32<math>\beta</math></b>	101	DNAIDWNPDWRRLPRELKIRVRKLQKERITILLPKRPPKTT--EDKEETI	148
<b>RPC32<math>\alpha</math></b>	143	KKMEELEKRGDGEKSDEENEEKEGSKEKSKEGDDDDDDDAAEQEEYDEEE	192
		+K+E+LEK+ + E + EE+EEKE +EK +E E+EEYDEEE	
<b>RPC32<math>\beta</math></b>	149	QKLETLEKK-EEEVTSEEDEEKEEEEEKEEE-----EEEEYDEEE	187

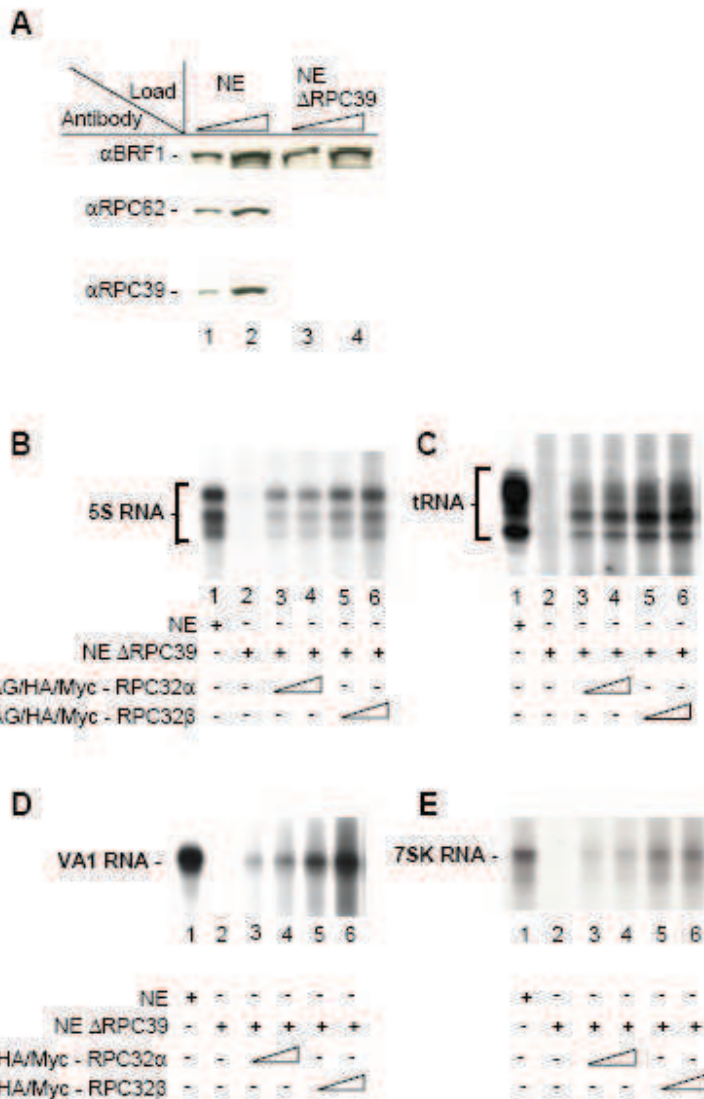
### Supp. Appendix Fig. 1. Amino acid comparison of human Pol III subunits RPC32 $\alpha$ and RPC32 $\beta$ .

A TblastN search (National Center for Biotechnology Information) of the human expressed sequence tag (EST) data base was performed using the RPC32 protein sequence as query [Altschul SF, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402]. This search identified a cDNA encoding a protein of 218 amino acids, RPC32 $\beta$ , that exhibited 51% amino acid identity and 67% homology over the entire amino acid sequence with the previously cloned RPC32 subunit [Wang Z, Roeder RG (1997) Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev* 11:1315-1326] that is now designated RPC32 $\alpha$ .



**Supp. Appendix Fig. 2. RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  predominantly localize to the nucleus of HeLa cells.**

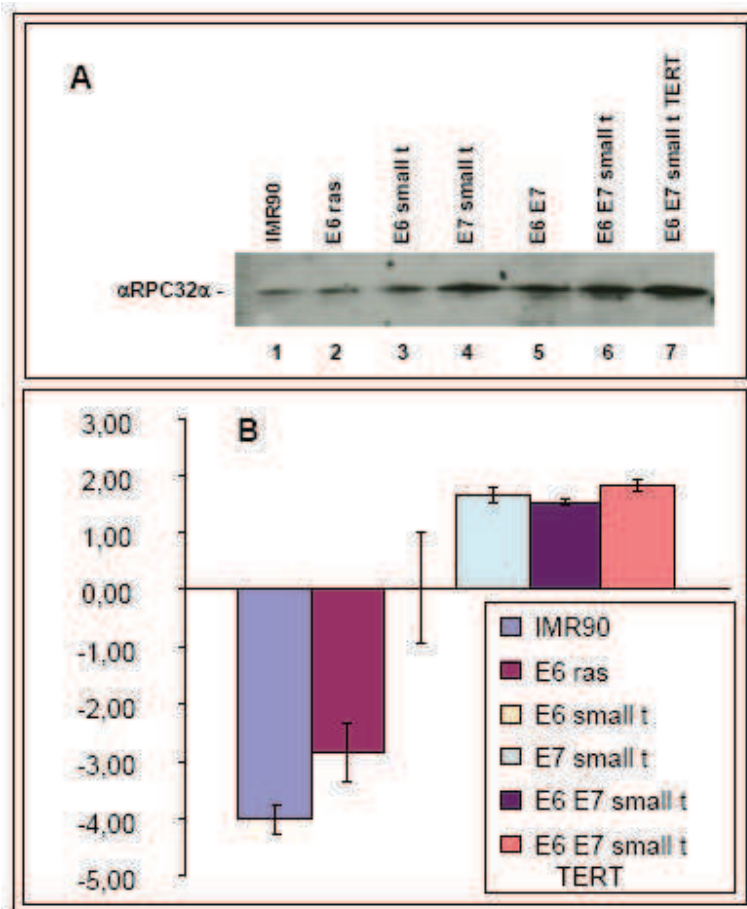
Detection of FLAG-HA-Myc-RPC32 $\alpha$  or FLAG-HA-Myc-RPC32 $\beta$  in HeLa cells by immunofluorescence. FLAG-HA-Myc-RPC32 $\alpha$  (**A**) or FLAG-HA-Myc-RPC32 $\beta$  (**B**) were visualised by incubation with monoclonal anti-Myc antibodies and anti-mouse AlexaFluor 488-conjugated secondary antibody (green fluorescence). The localization of epitope-tagged and untagged Pol III was controlled by employing anti-RPC62 antibodies and anti-rabbit AlexaFluor 594-conjugated secondary antibodies (red fluorescence). HeLa cells that did not express any epitope-tagged protein (**C**) were used as negative control for the anti-Myc antibody. HeLa cells that stably express FLAG-HA-Myc-tagged BRF2 (**D**) were used to control the specificity of the anti-Myc antibody. Double-staining with anti-Myc (green) and anti-BRF2 antibodies (red) revealed a perfect overlay of green and red colours, appearing yellow in the overlay image. In each experiment, nuclei were counterstained with Hoechst 33528 (blue fluorescence). An overlay of all three colour channels is shown in the lower right panel of each Figure.



**Supp. Appendix Fig. 3. Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  reconstitute *in vitro* transcription in RNA polymerase III-depleted nuclear extracts.**

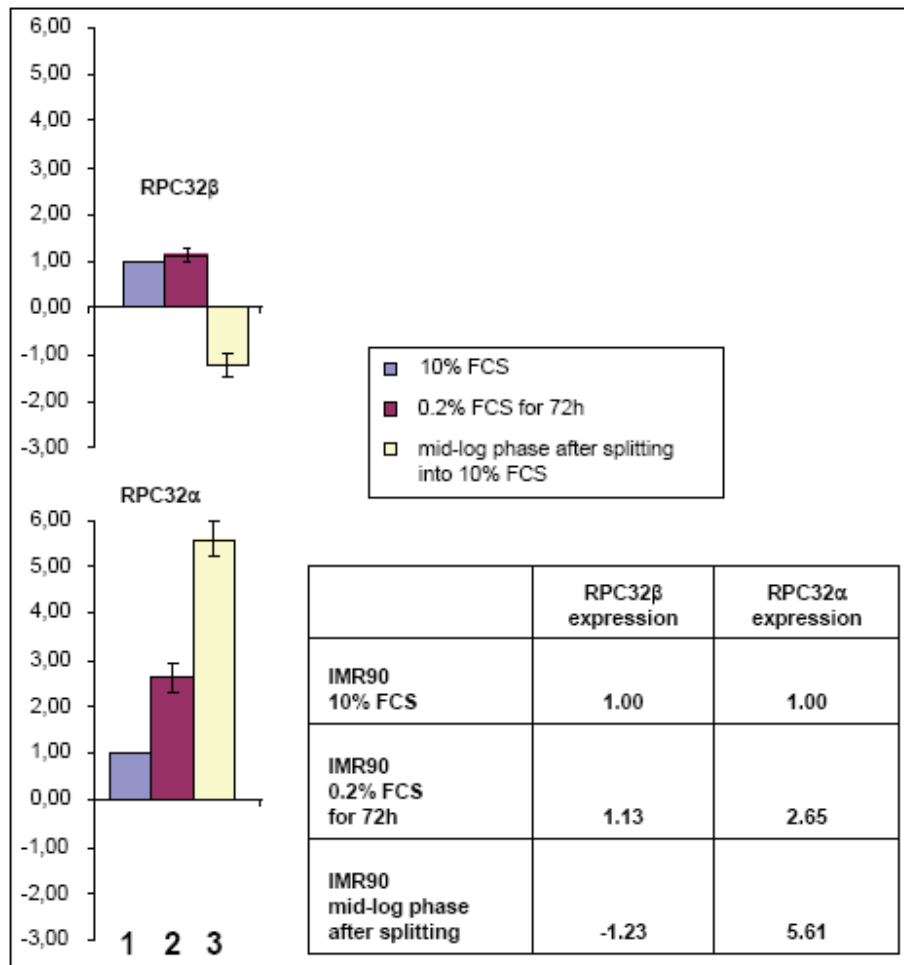
(A) Depletion of Pol III from HeLa nuclear extracts. Western blot analyses with anti-RPC62, anti-RPC39 or anti-BRF1 antibodies, as indicated at the left. Lanes 1 and 2: 25 and 50  $\mu$ g of HeLa S3 nuclear extract. Lanes 3 and 4: 25 and 50  $\mu$ g of HeLa S3 nuclear extract that was depleted of Pol III by employing anti-RPC39 antibodies. (B-E) *In vitro* transcription of the 5S RNA gene (B), the tRNA-Met gene (C), the VA1 gene (D) and the 7SK gene (E). Transcription reactions in panels B to E were reconstituted with the following extracts and purified Pol III preparations: Lane 1: 10  $\mu$ g HeLa S3 nuclear extract; lanes 2-6: 10  $\mu$ g of HeLa S3 nuclear extract that was depleted of Pol III; lanes 3 and 4: 10 and 20 ng of Pol III $\alpha$  (FLAG-HA-Myc-RPC32 $\alpha$ -affinity-purified); lanes 5 and 6: 10 and 20 ng of Pol III $\beta$  (FLAG-HA-Myc-RPC32 $\beta$ -affinity-purified).





**Supp. Appendix Fig. 4. RPC32 $\alpha$  mRNA and protein levels increase during transformation of IMR90 cells.**

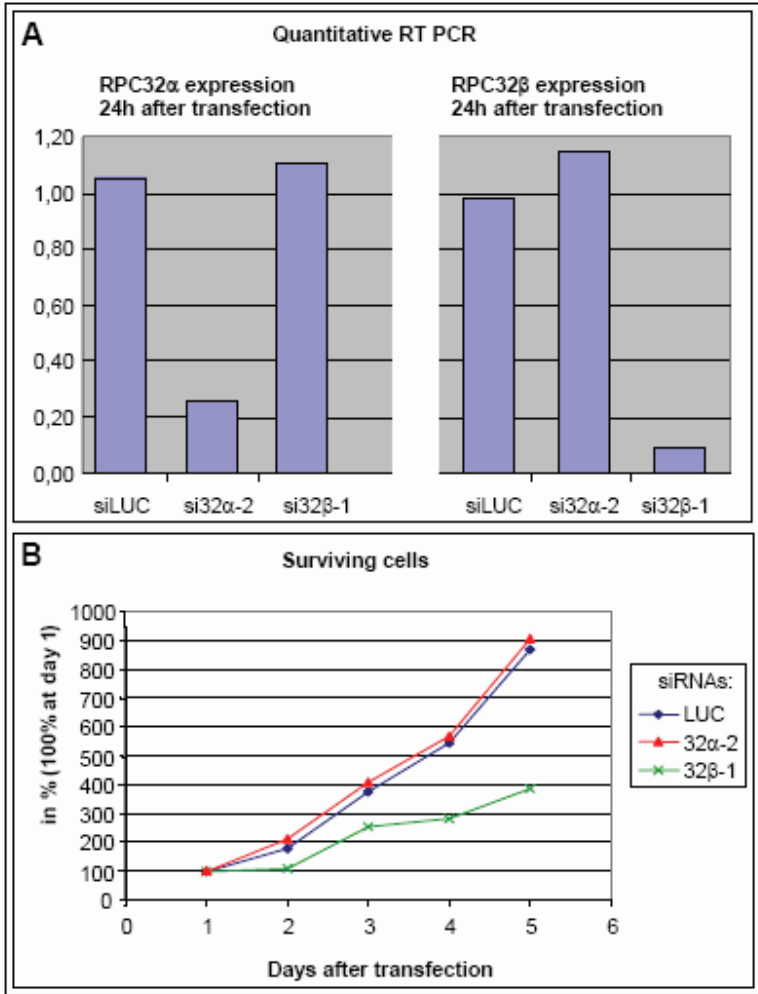
(A) Relative RPC32 $\alpha$  protein levels. RNA polymerase III (Pol III) was immunopurified from 4 mg nuclear extracts derived from each individual cell line by employing protein A-sepharose coupled anti-RPC39 antibodies. RPC32 $\alpha$  was detected by western blot with affinity-purified anti-RPC32 $\alpha$  antibodies. The specificity of these antibodies for RPC32 $\alpha$  is shown in Supp. Appendix Fig. 8A. Eluates of immunopurifications from the following cell lines were loaded: IMR90 (lane 1); IMR90/E6/ras (lane 2); IMR90/E6/small t (lane 3); IMR90/E7/small t (lane 4); IMR90/E6/E7 (lane 5); IMR90/E6/E7/small t (lane 6); IMR90/E6/E7/small t/TERT (lane 7). (B) Relative mRNA levels of RPC32 $\alpha$  versus RPC32 $\beta$  determined by RT-qPCR. In IMR90 cells RPC32 $\beta$  mRNA is 4 times more abundant than RPC32 $\alpha$  mRNA (lane 1), whereas RPC32 $\alpha$  mRNA is 2-fold in excess of RPC32 $\beta$  mRNA in IMR90 cells that stably express E6/E7/small t and TERT (lane 6). Relative RPC32 $\alpha$ :RPC32 $\beta$  mRNA levels of the following cell lines were determined: IMR90 (lane 1); IMR90/E6/ras (lane 2); IMR90/E6/small t (lane 3); IMR90/E7/small t (lane 4); IMR90/E6/E7/small t (lane 5); IMR90/E6/E7/small t/TERT (lane 6).



**Supp. Appendix Fig. 5. The expression of RPC32 $\alpha$  mRNA, but not of RPC32 $\beta$  mRNA, is enhanced in IMR90 cells upon serum withdrawal and return to mid-log phase growth.**

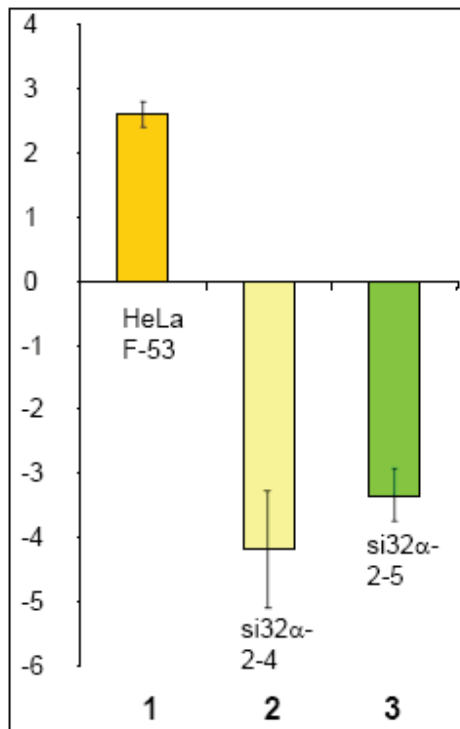
RT-qPCR analysis of RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  mRNA levels in exponentially growing IMR90 cells (lane 1), after having been arrested in G0 by 72 hours of serum withdrawal (0.2% fetal calf serum (FCS); lane 2) and after having been split into 15% FCS containing serum and having reached mid-log phase growth (lane 3). RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  mRNA expression levels were set as 1 in exponentially growing IMR90 cells (lane 1) and relative mRNA expression levels were determined for cells in G0 and in mid-log phase (lanes 2 and 3).





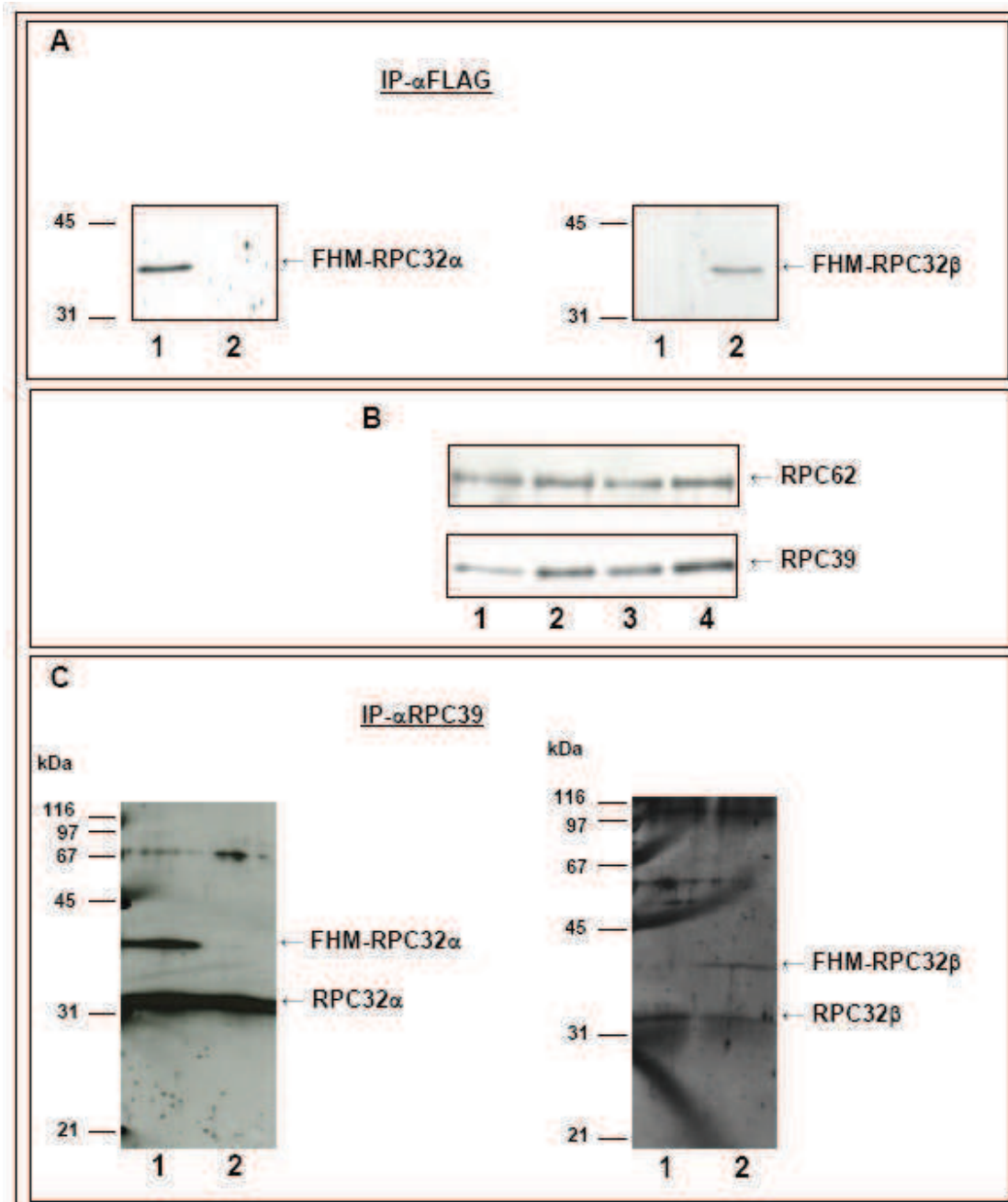
**Supp. Appendix Fig. 6. siRNAs targeting RPC32 $\beta$ , but not those targeting RPC32 $\alpha$ , suppress cell growth.**

(A) Quantitative RT PCR. Huh7 cells were transiently transfected with luciferase-, RPC32 $\alpha$ - (si32 $\alpha$ -2) or RPC32 $\beta$ - (si32 $\beta$ -1) siRNAs. Levels of RPC32 $\alpha$  mRNA (left) and RPC32 $\beta$  mRNA (right) were determined by qRT PCR 24 hours post-transfection (Materials and Methods). (B) Huh7 cells were transfected with siRNAs on day one and the surviving cells were counted on days 2 to 5. Cell number on day 1 was set as 100%. siLuciferase: rhomb; si32 $\alpha$ -2: triangle; si32 $\beta$ : cross.



**Supp. Appendix Fig. 7. RPC32 $\alpha$  mRNA levels are in excess of RPC32 $\beta$  mRNA levels in HeLa cells.**

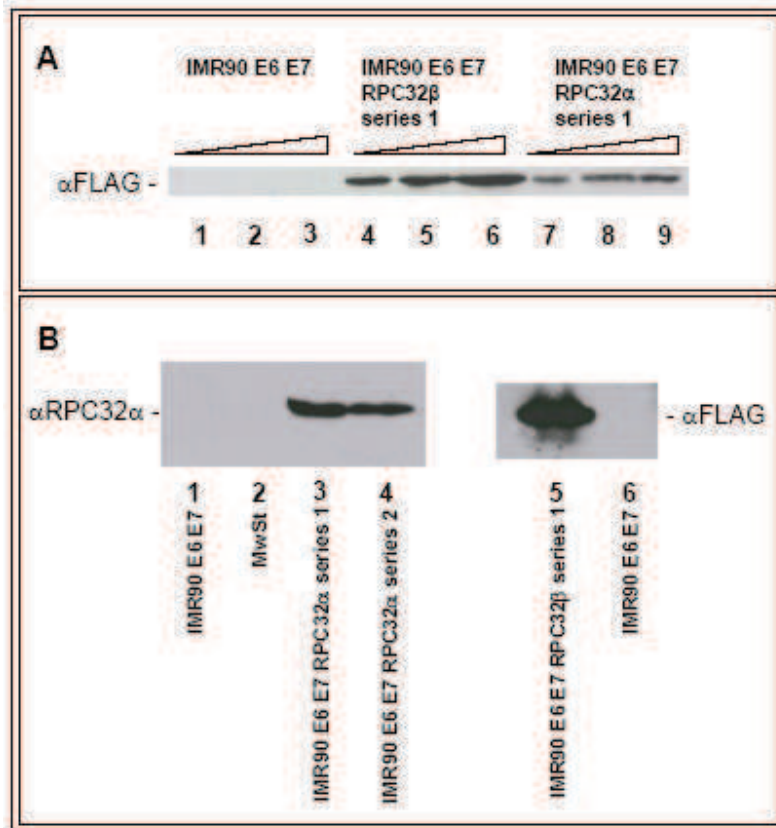
Relative RPC32 $\alpha$  versus RPC32 $\beta$  mRNA levels were determined in HeLa cells that stably express FLAG-RPC53 (lane 1), as well as in derivatives thereof that also express siRNAs directed against RPC32 $\alpha$  mRNA (lanes 2 and 3). Relative mRNA levels were determined by RT-qPCR that was normalized with  $\beta$ -actin mRNA. HeLa cells stably expressing FLAG-RPC53 contain 2.6-fold more RPC32 $\alpha$  than RPC32 $\beta$  mRNA (lane 1). After siRNA-mediated suppression of RPC32 $\alpha$  mRNA, HeLa cells stably expressing FLAG-RPC53 and si32 $\alpha$ -2-4 (si32 $\alpha$ -2-5) contain a 4-fold (3.5-fold) excess of RPC32 $\beta$  mRNA relative to RPC32 $\alpha$  mRNA (lanes 2 and 3).



**Supp. Appendix Fig. 8. Analysis of RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  protein levels in HeLa cells.**

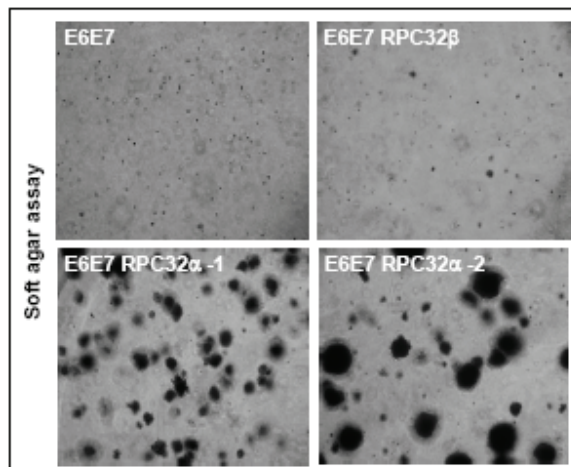
(A) Characterization of affinity purified anti-RPC32 $\alpha$  and anti-RPC32 $\beta$  antibodies. Pol III $\alpha$  was purified on M2 agarose from HeLa cells that stably express FLAG-HA-Myc-RPC32 $\alpha$  and Pol III $\beta$  from HeLa cells that stably express FLAG-HA-Myc-RPC32 $\beta$ . Western blot analysis of 150 ng Pol III $\alpha$  (lanes 1) or Pol III $\beta$  (lanes 2) with affinity-purified anti-RPC32 $\alpha$  (left panel) or anti-RPC32 $\beta$  antibodies (right panel). Generation of the cell lines, production of antibodies, and affinity-purification of antibodies were as described in Supporting Appendix Materials and Methods. (B) Normalization of immunopurified Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  preparations shown in (A). 75ng (lanes 1 and 3) or 150 ng (lanes 2 and 4) of immunopurified Pol III $\alpha$  (lanes 1 and 2) or Pol III $\beta$  (lanes 3 and 4) were analyzed by Western blotting with anti-RPC62 and anti-RPC39 antibodies. (C) Western blot analysis of 150 ng Pol III $\alpha$  (lanes 1) or Pol III $\beta$  (lanes 2) with affinity-purified anti-RPC39 antibodies. Generation of the cell lines, production of antibodies, and affinity-purification of antibodies were as described in Supporting Appendix Materials and Methods.

and 4) were probed with anti-RPC62 (upper panel) or anti-RPC39 antibodies (lower panel). (C) Relative levels of Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$ . Antibodies directed against RPC39 ( $\alpha$ RPC39) were used to immunopurify Pol III (Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$ ) from nuclear extracts (4 mg protein) derived from HeLa cells that stably express either FLAG-HA-Myc-RPC32 $\alpha$  (lane 1) or FLAG-HA-Myc-RPC32 $\beta$  (lane 2). Equivalent amounts (250 ng) of immunopurified Pol III preparations were probed with affinity-purified anti-RPC32 $\alpha$  (left panel) or anti-RPC32 $\beta$  antibodies (right panel). Purified Pol III preparations from the FLAG-HA-Myc-tagged RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  cell lines contained FLAG-HA-Myc-tagged RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$ , respectively, (lane 1, left panel for RPC32 $\alpha$  and lane 2, right panel for RPC32 $\beta$ ) in addition to the endogenous untagged RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  present in preparations from both cell lines (lanes 1 and 2, left and right panels). In Panel A, for equivalent amounts of Pol III (normalized in Panel B), the intensity of the RPC32 $\alpha$  protein band detected by the affinity-purified anti-RPC32 $\alpha$  antibody is stronger than that of the RPC32 $\beta$  protein band detected by the affinity-purified anti-RPC32 $\beta$  antibody. In Panel C, for equivalent amounts of total Pol III, the intensity of the endogenous RPC32 $\alpha$  band that is detected by the affinity-purified anti-RPC32 $\alpha$  antibody (left panel) is clearly stronger than that of the endogenous RPC32 $\beta$  band that is detected by the affinity-purified anti-RPC32 $\beta$  antibody (right panel). By comparing the intensity of RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  signals in Panel C with those shown in Panel A, it can be concluded that HeLa cells contain at least as much or even more RPC32 $\alpha$  protein than RPC32 $\beta$  protein.



**Supp. Appendix Fig. 9. Western blot analysis of ectopic expression of RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$  in partially transformed IMR90 fibroblasts.**

(A) Western blot of nuclear extracts derived from IMR90 cells that stably express E6 and E7 (lanes 1-3), E6, E7 and FLAG-HA-Myc-RPC32 $\beta$  (lanes 4-6) or E6, E7 and FLAG-HA-Myc-RPC32 $\alpha$  (lanes 7-9). 10  $\mu$ g (lanes 1, 4 and 7), 20  $\mu$ g (lanes 2, 5 and 8) or 40  $\mu$ g (lanes 3, 6 and 9) of nuclear extracts were separated by SDS-12.5% PAGE. The blot was probed with anti-FLAG antibodies. (B) Western blot following immuno-affinity purification on M2 agarose (Supporting Appendix Materials and Methods) of Pol III $\alpha$  from IMR90 cells expressing E6, E7 and FLAG-HA-Myc-RPC32 $\alpha$  (lanes 3 and 4) and Pol III $\beta$  from IMR90 cells expressing E6, E7 and FLAG-HA-Myc-RPC32 $\beta$  (lane 5). IMR90 cells expressing E6 and E7 (lanes 1 and 6) served as negative controls. Individual eluates were probed with anti-RPC32 $\alpha$  (left panel) or anti-Flag antibodies (right panel). Lane 2. Molecular weight standard.



**Supp. Appendix Fig. 10. Ectopic expression of RPC32 $\alpha$  induces colony formation in IMR90/E6/E7 cells.**

Representative light microscopic images (40-fold magnification) of colonies formed in soft agar assays. IMR90/E6/E7 cells are shown in the upper left image, IMR90/E6/E7/RPC32 $\beta$  cells in the upper right and IMR90/E6/E7/RPC32 $\alpha$  cells (two distinct cell lines) in the lower two images. Growth of cells in soft agar was as described (Hahn WC, et al. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. Nature 400: 464-468.).

**Supp. Appendix Tables:**

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	pons	paracentral gyrus of the cerebral cortex	temporal lobe	occipital lobe	parietal lobe	frontal lobe	cerebral cortex	whole brain
2	putamen	medulla oblongata	hippocampus	nucleus caudatus	amygdala	corpus callosum	cerebellum right	cerebellum left
3				spinal cord		thalamus	nucleus accumbens	
4	apex of the heart	interventricular septum	ventricle, right	ventricle left	atrium right	atrium left	aorta	heart
5	colon ascendens	appendix	ileoecum	ileum	jejunum	duodenum	stomach	esophagus
6						rectum	colon descendens	colon transversum
7	trachea	bone marrow	lymph node	peripheral blood leukocyte	thymus	spleen	skeletal muscle	kidney
8		ovary	testis	prostate	uterus	bladder	placenta	lung
9				salivary gland	thyroid gland	adrenal gland	pancreas	liver
10	lung carcinoma, A549	colorectal adenocarcinoma, SW480	Burkitt's lymphoma, Daudi	Burkitt's lymphoma, Raji	leukaemia, MOLT-4	leukaemia, K-562	HeLa S3	leukemia, HL-60
11		fetal lung	fetal thymus	fetal spleen	fetal liver	fetal kidney	fetal heart	fetal brain
12	human genomic DNA (500ng)	human genomic DNA (100ng)	human C0t-1 DNA	Poly r(A)	E.coli DNA	E.coli rRNA	yeast tRNA	yeast total RNA

**Supp. Appendix Table 1. Tissue representation on the CLONTECH MTE Multiple Tissue Expression Array.**

Hybridization with radioactively labelled RPC32 $\alpha$ - or RPC32 $\beta$  probes is shown in Figure 2B.



**Supp. Appendix Table 2A**

GENEBANK	Gene name	IMR90 /E6/E7	IMR90/E6/E7/ RPC32 $\alpha$	IMR90/E6/E7/ RPC32 $\beta$
J04164	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	0	652.967	0
X51521	villin 2 (ezrin)	233.349	1.010.721	72.223
V00568	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	762.153	1.280.502	506.554
U40343	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	0	209.519	72.107
L05624	mitogen-activated protein kinase kinase 1	0	411.521	0
AF036905	linker for activation of T cells	1.028	865.368	57.394
U72511	repressor of estrogen receptor activity/ Prohibitin B	8.476	485.451	68.808
M80563	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)	0	3.087.712	24.843
M29870	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	692.873	1.773.861	732.098
Y09392	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12 (translocating chain-association membrane protein)	422.952	1.091.650	394.248
M87338	replication factor C (activator 1) 2 (40kD)	246.668	3.078.914	458.822
U56390	caspase 9, apoptosis-related cysteine protease	0	179.944	38.744
M94151	catenin (cadherin-associated protein), alpha 2	0	509.139	135.658
U72661	ninjurin 1	0	672.384	138.946
U31628	interleukin 15 receptor, alpha	95.827	984.481	323.792
AF019770	prostate differentiation factor/ GDF15 / MIC-1	0	978.706	79.512
X04602	interleukin 6 (interferon, beta 2)	722.661	2.290.800	968.328
M19154	transforming growth factor, beta 2	0	512.287	57.592
S74678	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	1.905.400	3.436.456	1.502.764

**Supp. Appendix Table 2B**

GENEBANK	Gene name	IMR90/E6/E7	IMR90/E6/E7/ RPC32 $\alpha$	IMR90/E6/E7/ RPC32 $\beta$
D89667	prefoldin 5	857.273	267.138	1.955.301
L16785	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in	631.177	342.749	866.922
U51004	histidine triad nucleotide binding protein 1	116.415	222.281	831.004
AF013263	apoptotic protease activating factor	4.031.454	2.124.402	4.055.366
U44975	core promoter element binding protein; KLF6	175.986	87.697	307.372
M14219	decorin	0	2.572	477.066
X55525	collagen, type I, alpha 2	455.232	517.546	2.421.349
X14420	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	487.742	470.047	3.352.984
U39487	xanthine dehydrogenase	361.556	33.952	1.600.937
Y00711	lactate dehydrogenase B	1.527.793	1.118.663	3.234.119

**Supp. Appendix Table 2. Ectopic expression of RPC32 $\alpha$  changes mRNA levels of several tumor-related genes.**

Quantitative results (Image Quant) of the hybridization of Atlas Cancer 1.2 microarray membranes with cDNA probes that were obtained from IMR90/E6/E7 expressing cells or of cells that express in addition RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  (Fig. 4B). Selected genes that show enhanced (A) or reduced mRNA expression (B) in response to ectopic expression of RPC32 $\alpha$ . The genes were selected by comparing their mRNA expression levels in IMR90/E6/E7 cells that ectopically express RPC32 $\alpha$  with those in IMR90/E6/E7 cells or IMR90/E6/E7 cells that ectopically express RPC32 $\beta$ .

## Supporting Appendix Materials and Methods:

### Generation and affinity-purification of antibodies.

New Zealand rabbits were immunized according to a protocol established by the company Eurogentec S.A. (Seraing; Belgium) with either two RPC32 $\alpha$ -specific peptides (DAGKGTPLNTEDVL and KKMVELEKRGDGEKSD) or with two RPC32 $\beta$ -specific peptides (ERITILLPKRPPKTT and EDKEETIQKLETLEK) that had been coupled to KLH. For affinity-purification of the antibodies, KLH-coupled peptides were separated by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membranes, stained with Ponceau Red, and recovered by excision of the stained bands with a scalpel. After three 20 minute incubations with PBS-0.05% Tween20 and one 20 minute incubation with PBS-0.05% Tween20-5% skim milk powder, followed by one additional wash with PBS-0.05% Tween20, serum from the rabbit producing anti-RPC32 $\alpha$  antibodies was incubated for 2 hours at 4°C with the nitrocellulose-immobilized antigen. After washing with PBS-0.05% Tween20, bound antibodies were eluted with 10 mM Tris/HCl, pH 2.5. The eluate was directly neutralized by addition of 1 volume 100 mM Tris/HCl pH 8.0. Anti-RPC32 $\beta$  antibodies were purified the same way by employing RPC32 $\beta$ -specific antigen.

### Generation of HeLa and IMR90 cell lines stably expressing epitope-tagged RPC32 $\alpha$ or RPC32 $\beta$ .

cDNAs encoding either RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  were amplified by PCR and cloned into EcoRI (5') and BamHI sites (3') of a modified pBabe-puro vector. This vector was constructed by introducing DNA sequences encoding the FLAG-HA-Myc (FHM)-tag in between BamHI (5') and EcoRI sites (3') of pBabe-puro. This cloning led to the deletion of the BamHI site 5' of the expressed sequence and introduced novel EcoRI and BamHI sites downstream the FHM-tag. The resulting pBabe-FHM-RPC32 $\alpha$ (puro) or pBabe-FHM-RPC32 $\beta$ (puro) vectors were subsequently transfected into HEK cells and clones stably expressing epitope-tagged proteins from these vectors were selected by addition of 2 $\mu$ g/ml puromycin. The production of retroviral particles was induced in these cells by transient transfection of the pCL-10A1 plasmid (IMGENEX). Two days after transfection of the pCL-10A1 plasmid, the retrovirus-containing medium was collected, passed through 0.45 $\mu$ m filters and supplemented with 8 $\mu$ g/ml Sequabrene (SIGMA). HeLa or IMR90/E6/E7 cells were then overlaid with this filtered medium. The procedure was repeated 4 times in 3 hours intervals. 24 hours after incubation with the filtered medium, HeLa or IMR90/E6/E7 cells that had been infected by retrovirus were selected by addition of 2 $\mu$ g/ml puromycin.

### Purification of Pol III $\alpha$ or Pol III $\beta$ from HeLa or IMR90 cells stably expressing epitope-tagged RPC32 $\alpha$ or RPC32 $\beta$ .

Nuclear extracts were derived from HeLa-FHM-RPC32 $\alpha$  (or -RPC32 $\beta$ ) or IMR90/E6/E7/FHM-RPC32 $\alpha$  (or -RPC32 $\beta$ ) cells as described (Teichmann M, et al. (1999) Human TATA-binding protein-related factor-2 (hTRF2) stably associates with hTFIIA in HeLa cells. Proc Natl Acad Sci U S A 96:13720-13725.). Epitope-tagged Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  were purified by incubating M2 agarose (SIGMA) with a 100-1000-fold excess of nuclear extract for 3 hours at 4°C with overhead rotating. The mixture of M2 agarose and nuclear extract was subsequently centrifuged at 500 X g for 1 minute and the supernatant was discarded. The agarose-containing pellet was subsequently washed three times with buffer A (20mM HEPES/KOH, pH7.9; 20% glycerol; 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5 mM PMSF and 3 mM DTT) containing the molarity of KCl that was used for binding of proteins to M2 agarose. Bound proteins were eluted by incubation of the agarose with buffer A containing 60 mM KCl and 250 ng/ $\mu$ l FLAG peptide for 15 minutes on ice. The supernatant obtained following centrifugation (500 X g for 1 minute) represented the eluate. Holoenzyme Pol III was purified by employing nuclear extract that was dialyzed against buffer A containing 100 mM KCl. Core-Pol III was purified by employing nuclear extracts that contained 300-400 mM KCl.

# Cell growth- and differentiation-dependent regulation of RNA polymerase III transcription

Hélène Dumay-Odelot,<sup>1</sup> Stéphanie Durrieu-Gaillard,<sup>1</sup> Daniel Da Silva,<sup>1</sup> Robert G. Roeder<sup>2</sup> and Martin Teichmann<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut Européen de Chimie et Biologie (I.E.C.B.); Université de Bordeaux; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U869; Pessac, France; <sup>2</sup>The Rockefeller University; Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology; New York, NY USA

**Key words:** RNA polymerase III, cell growth, cell cycle, differentiation, embryonic carcinoma cell, embryonic stem cell, cell transformation

RNA polymerase III transcribes small untranslated RNAs that fulfill essential cellular functions in regulating transcription, RNA processing, translation and protein translocation. RNA polymerase III transcription activity is tightly regulated during the cell cycle and coupled to growth control mechanisms. Furthermore, there are reports of changes in RNA polymerase III transcription activity during cellular differentiation, including the discovery of a novel isoform of human RNA polymerase III that has been shown to be specifically expressed in undifferentiated human H1 embryonic stem cells. Here, we review major regulatory mechanisms of RNA polymerase III transcription during the cell cycle, cell growth and cell differentiation.

Eukaryotes contain three distinct DNA-dependent RNA polymerases (Pol I, Pol II and Pol III)<sup>1</sup> that share the task of transcribing the information contained in genes into mobile RNA entities. In humans, Pol I transcribes the precursor of the large ribosomal 45S RNA, Pol II transcribes all messenger RNAs, most snRNAs, snoRNAs and micro RNAs and Pol III transcribes a diverse group of small untranslated RNAs that participate in the regulation of transcription, splicing and translation. After transcription, Pol III transcripts are either directly degraded or modified for participation in the regulation and execution of processes in the nucleus and cytoplasm (transcription regulation; RNA processing; ribosome assembly; translation) that ultimately lead to protein synthesis. In the past few years, in part due to the discovery of novel classes of regulatory RNAs such as micro (mi) RNAs and small interfering (si)RNAs, it has become clear that the three classical eukaryotic RNA polymerases have acquired additional layers of complexity during evolution from unicellular to multicellular eukaryotes. For instance, derivatives of Pol II that fulfill specific functions in transcription of siRNAs (Pol IV) or of noncoding RNAs at target loci (Pol V) have been found in *Arabidopsis*.<sup>2,3</sup> More recently, an isoform of human Pol III has

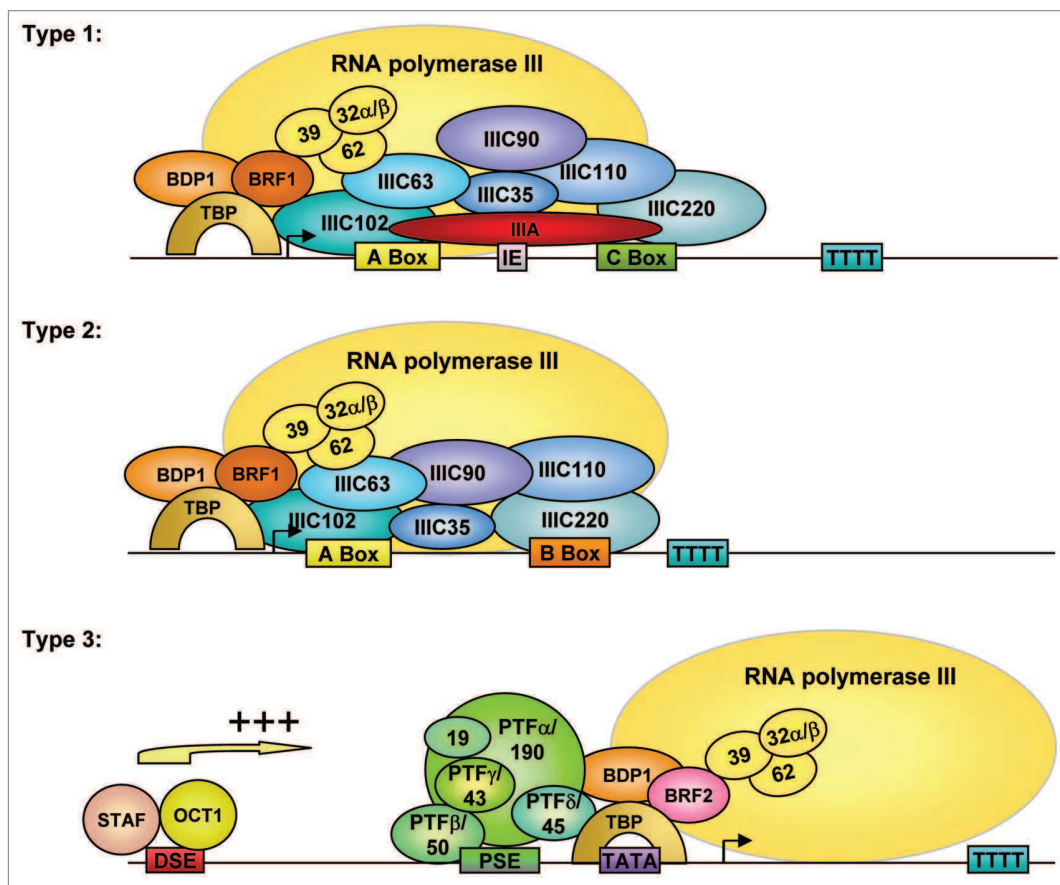
been described that is specifically expressed in embryonic stem cells and in certain tumor cell lines. This isoform of Pol III is able to contribute to cell transformation under tissue culture conditions.<sup>4</sup> In this review, we will describe our current understanding of how Pol III transcription is regulated during growth and differentiation, with emphasis on the mammalian Pol III system where appropriate.

## Introduction to Pol III Transcription

**Promoters.** Three types of promoters are recognized by RNA polymerase III in higher eukaryotes (Fig. 1). Type 1 and type 2 promoters are internal to the gene, whereas type 3 promoters are located entirely upstream of the transcription initiation site.<sup>5</sup> Type 1 (5S ribosomal RNA gene) and type 2 promoters [e.g., those in tRNA, VA1 RNA and VA2 RNA genes and in short interspersed nuclear elements (SINEs)] are composed of A- and C- or A- and B-boxes, respectively (Fig. 1). Transcription of type 1 and 2 genes is initiated about 8 to 50 nucleotides upstream of the 5'-end of Box A and terminates as soon as Pol III encounters four or more consecutive thymidines. Type 3 promoters (U6 RNA, 7SK RNA, RNase P RNA, RNase MRP RNA and Y RNA genes) are comprised of a distal sequence element (DSE) that is typically located about 200–250 nt upstream of the transcription initiation site, a proximal sequence element (PSE) at around -50 and a TATA box at -30. Type 3 promoters arose during evolution from unicellular to multicellular eukaryotes and are found in plants and animals, but not in yeast, which instead utilize a type 2 promoter for transcription of the U6 gene. Pol III-transcribed genes that contain both gene-internal and gene-external promoter elements have also been described and include the 7SL RNA, vault RNA, BC1 RNA, BC200 RNA, EBER1 RNA and EBER2 RNA genes.<sup>5</sup>

**Transcription factors.** The yeast and human transcription factors that recognize these promoters have been identified by genetic or biochemical means and their cognate subunits have been cloned (Fig. 1). The primary DNA-binding transcription factors that are required for the recognition of the evolutionary conserved type 1 and type 2 promoters have likewise been conserved from yeast to human. Type 2 genes are directly recognized by the six subunit transcription factor TFIIC.<sup>6,7</sup> The type 1 promoter of the 5S gene requires prior binding of TFIIA, the prototype gene-specific transcriptional activator in eukaryotes,<sup>8</sup> for recruitment of TFIIC to the gene.<sup>6,9</sup> The type 3 promoters of

\*Correspondence to: Martin Teichmann; Email: Martin.Teichmann@inserm.fr  
Submitted: 06/16/10; Revised: 07/28/10; Accepted: 08/01/10  
Previously published online:  
[www.landesbioscience.com/journals/cc/article/13203](http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/13203)  
DOI: 10.4161/cc.9.18.13203



**Figure 1.** Mammalian RNA Polymerase III promoters and transcription factors. Promoter types 1–3. IIIA = TFIIIA. TFIIB subunits are TBP, BDP1, BRF1 and BRF2; TFIIC subunits are indicated as C35, C63, C90, C102, C110 and C220. PTF $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  subunits are also denoted according to the molecular weight of the respective SNAPc subunits (190, 50, 43 and 45). In addition, SNAP19 is shown, which has not been described in PTF. The ternary complexes composed of RPC39, RPC62 and RPC32 $\alpha$  or RPC32 $\beta$  are high lightened within the symbolic representation of RNA polymerase III.

U6 and 7SK genes appeared during the evolution of multicellular eukaryotes, along with transcription factors required for their expression. Type 3 promoters are directly bound by the multi-subunit PSE-binding transcription factor (PTF; also referred to as SNAPc or PBP),<sup>10–12</sup> for which no ortholog has been identified in yeast. The interaction of PTF/SNAPc/PBP with the PSE is reinforced by DSE binding proteins such as Oct-1,<sup>13–16</sup> and Staf (ZNF143).<sup>17</sup> For transcription activation of type 3 promoter-containing genes, DSE and PSE sequences may be juxtaposed by a positioned nucleosome.<sup>18,19</sup>

In the model of a stepwise assembly of preinitiation complexes (PIC) on Pol III promoters, the DNA-binding proteins, once bound to their promoters, recruit the initiation factor TFIIB to their respective genes. After its recruitment to the promoter, TFIIB alone is able to direct multiple rounds of transcription in the absence of TFIIC and TFIIIA,<sup>20</sup> demonstrating that interactions of Pol III with TFIIC and TFIIIA are not essential for transcription initiation, at least in vitro, but rather serve for the recruitment of TFIIB. Only a single isoform of TFIIB has been described in yeast.<sup>6</sup> In contrast, human cells contain two isoforms of TFIIB (TFIIB- $\alpha$  and TFIIB- $\beta$ )<sup>21</sup> that are specifically recruited either to gene-internal type 1 and 2 (TFIIB- $\beta$ )

promoters or to type 3 promoters (TFIIB- $\alpha$ ). As for the evolution of PTF/SNAPc/PBP, the appearance of a second isoform of TFIIB may again have been necessary for allowing promoter type- or gene-specific regulation of Pol III transcription in higher eukaryotes. Human TFIIB- $\alpha$  and TFIIB- $\beta$  both contain TATA-binding protein (TBP) and BDP1 but differ with respect to the presence of the TFIIB-related factors BRF1 (TFIIB- $\beta$ ) and BRF2 (TFIIB- $\alpha$ ).<sup>22,23</sup> Interestingly, it was demonstrated that purified *S. cerevisiae* BDP1 could replace its human ortholog in transcription of the human U6 gene reconstituted with human transcription factors, indicating that essential protein-protein interactions with other components of the PIC at type 3 promoters could be established by *S. cerevisiae* BDP1.<sup>24</sup> An alternative model to the stepwise recruitment of the Pol III transcription machinery to promoters has been suggested by the discovery of an RNA polymerase III holoenzyme that contains TFIIC and TFIIB- $\beta$  subunits in addition to Pol III.<sup>25</sup> This holoenzyme as an entity may directly recognize Pol III promoters and direct multiple rounds of transcription by mechanisms involving facilitated reinitiation of transcription.<sup>26,27</sup>

**Accessory factors.** A variety of proteins have been described that, while not necessarily essential, are highly stimulatory for



Pol III transcription in vitro. Complementation assays coupled with purification of factors from HeLa nuclear extracts showed that topoisomerase 1 and positive cofactor 4 (PC4) co-fractionate with TFIIC (holo-TFIIC) and that they activate Pol III transcription in a system reconstituted with highly purified components.<sup>28</sup> Similarly, NF1 was found to stimulate Pol III transcription from type 2 promoters and to extend the TFIIC footprint over the transcription termination site.<sup>29</sup> A function similar to that of human PC4 was recently demonstrated for the *S. cerevisiae* ortholog Sub1.<sup>30,31</sup> Although the mode of action for PC4 or Sub1 in Pol III transcription has remained a puzzle owing to the high (50–100 fold) molar excess of PC4 (relative to other Pol III transcription factors) required for in vitro transcription activation, it has been speculated that DNA-binding properties of PC4 may help to structure DNA for facilitating Pol III transcription in vitro. Furthermore, the transcription termination and recycling factor La<sup>32</sup> co-purified with holo-TFIIC preparations.<sup>28</sup> Although not absolutely required for in vitro transcription,<sup>33</sup> La was shown to associate with Pol III promoters in yeast<sup>34</sup> and human cells.<sup>35</sup> Moreover, the HMG-box-containing proteins NHP6A and NHP6B have been implicated in the activation of Pol III transcription in *S. cerevisiae*.<sup>36,37</sup> Up to now, there has been no identification of a mammalian NHP6A or NHP6B ortholog that might fulfill a similar function Pol III transcription.

**RNA polymerase III.** Along with the DNA-binding transcription factors, the distinct isoforms of human TFIIB are necessary and sufficient to recruit Pol III to the transcription initiation site. Pol III is highly conserved from yeast to humans and is composed of 17 subunits (Table 1). Of these subunits, five (RPB5/POLR2E, RPB6/POLR2F, RPB8/POLR2H, RPB10/POLR2L and RPB12/POLR2K) are common to all three polymerases, two (RPAC40/POLR1C and RPAC19/POLR1D) are shared by Pol I and Pol III (with paralogous subunits in Pol II) and five (RPC1/POLR3A, RPC2/POLR3B, RPC8/POLR3H, RPC9 and RPC11/POLR3K) are paralogous to subunits found in Pol I and Pol II. The remaining five subunits (RPC5/POLR3E, RPC4/BN51/POLR3D, RPC3/RPC62/POLR3C, RPC6/RPC39/POLR3F and RPC7/RPC32/POLR3G) are specific to RNA polymerase III and no structural or functional counterparts have been identified in Pol I or Pol II.<sup>38,39</sup> However, it has been suggested that some of these subunits may share structural homologies to basal transcription factors of the Pol II system.<sup>40,41</sup>

Three of the five Pol III-specific subunits (POLR3C, POLR3F, POLR3G) form a stable subcomplex (Fig. 1). Thus, it was shown in the yeast *S. cerevisiae* (Sc) that the ScRPC31, ScRPC34 and ScRPC82 subunits (orthologous to human (Hs) RPC32, HsRPC39 and HsRPC62, respectively) could be separated from the other subunits of Pol III by native gel electrophoresis.<sup>42</sup> In addition, a mutation in the zinc-binding domain of the largest subunit of Pol III (ScRPC160) led to an increased dissociation of subunits ScRPC31, ScRPC34 and ScRPC82 from the remainder of the enzyme,<sup>43</sup> indicating that ScRPC31, ScRPC34 and ScRPC82 may form a Pol III sub-complex that is less stably associated with the residual enzyme. The association of this sub-complex with the rest of Pol III may involve a direct ScRPC160-ScRPC31-interaction, since overexpression

**Table 1.** The subunits of human RNA polymerase III

Gene symbol	Protein name	Calculated mass [kDa]	Amino acids
POLR3A	RPC160	155.641	1390
POLR3B	RPC128	127.785	1133
POLR3C	RPC62	60.612	534
POLR3D	RPC53	44.396	398
POLR3E	RPC80	79.898	708
POLR3F	RPC39	35.684	316
POLR3G	RPC32 $\alpha$	25.914	223
POLR3GL	RPC32 $\beta$	25.334	218
POLR3H	RPC25	22.918	204
-	RPC17	16.871	148
POLR3K	RPC11	12.336	108
POLR1C	RPAC40	39.250	346
POLR1D	RPAC19	15.237	133
POLR2E	RPB5	24.551	210
POLR2F	RPB6	14.478	127
POLR2H	RPB8	17.143	150
POLR2L	RPB10	7.645	67
POLR2K	RPB12	7.004	58

of ScRPC160 is able to suppress a conditional growth phenotype of a mutation in the C-terminal part of ScRPC31.<sup>44</sup> It was further shown that ScRPC31, ScRPC34 and ScRPC82 interact with each other in two hybrid assays.<sup>45</sup> The latter and subsequent experiments also revealed an interaction between ScRPC34 and ScBRF1.<sup>45,46</sup> Altogether these results indicate that this sub-complex serves as a bridge between the enzymatic core of Pol III and its initiation factors. As a consequence, in pre-initiation complex formation, this subcomplex likely acts in a central position close to the transcription initiation site. Such a role was also supported by cross-linking experiments that projected ScRPC34 and ScRPC31 upstream of, and ScRPC82 also downstream of, the transcription initiation site.<sup>47</sup> By using the short distance crosslinker 4-S-dTMP, Bartholomew and colleagues<sup>47</sup> further showed that photoaffinity labeling of ScRPC82 and ScRPC31 by 4-S-dTMP, but not by the 9 Å-crosslinker N<sub>3</sub>RdUMP, occurs in transcription bubbles of initiation complexes and stalled elongation complexes, indicating that these two subunits of Pol III may be in contact with single-stranded DNA.

Complementary data supporting a model in which HsRPC62, HsRPC39 and HsRPC32 likewise form a ternary complex were obtained with human Pol III. It was shown that the ternary complex can be removed from the other 14 subunits of Pol III by ultracentrifugation or by treatment with mild denaturants (2 M urea).<sup>48</sup> Human Pol III that was stripped of HsRPC32, HsRPC39 and HsRPC62 was capable of transcription elongation (following non-specific initiation), but was incapable of specifically initiating transcription from Pol III promoters, again indicating that this ternary sub-complex may be especially important for polymerase-transcription factor interactions during initiation. However, the residual elongation activity of the 14-subunit

core Pol III complex, while significant, was nonetheless reduced, suggesting that the ternary complex may also function during transcription elongation.<sup>48</sup> Studies with recombinant proteins further showed that HsTFIIIC63 and HsRPC62, HsTFIIIC90 and HsRPC62 as well as HsTFIIIC90 and HsRPC39 interact in vitro,<sup>49,50</sup> reinforcing the hypothesis that the ternary sub-complex of RNA polymerase III fulfills important functions for establishing protein-protein-contacts with transcription factors on the one hand and with Pol III on the other.

Purification of Pol III from mouse myeloma cells (MOPC 315) led to the identification of two chromatographically distinct enzymes (Pol IIIA and Pol IIIB) that were both active in transcription of class III genes.<sup>51</sup> Determination of the subunit compositions of these enzymes revealed that they are highly related and differ only in the presence of either a 32 kDa (IIIA) or a 33 kDa (IIIB) polypeptide.<sup>52</sup> Recently, we have been able to isolate two distinct isoforms of Pol III from human cells. The major physical difference in between these two isozymes is the presence of either HsRPC32 $\alpha$ /POLR3G in Pol III $\alpha$  or of HsRPC32 $\beta$ /POLR3GL in Pol III $\beta$ .<sup>4</sup> Taking into account the migration of these two subunits on SDS-PAGE, it is very likely that the two isoforms isolated from human cells are orthologous to the previously reported isoforms of Pol III in mouse myeloma cells.

### Regulation of Pol III Transcription— Lessons Learned from Yeast

Many factors and mechanisms that underlie the regulation of RNA polymerase III transcription have been identified by studying yeast cells. These unicellular organisms adapt their gene expression programs by all three RNA polymerases to environmental conditions. Favorable growth conditions lead to higher rates of transcription, whereas deprivation in nutrients results in the repression of transcription. Importantly, transcription of components of the translational apparatus, including rRNAs, tRNAs and mRNAs encoding ribosomal proteins consume about 75–80% of cellular nucleotides, mainly through transcription by Pals I and III,<sup>53,54</sup> and this high energetic cost is restricted under unfavorable growth conditions.<sup>55</sup> Multiple pathways have been implicated in the regulation of Pol III transcription in *S. cerevisiae*. These include the secretory signaling pathway,<sup>54</sup> the TOR pathway,<sup>56–58</sup> the DNA damage pathway<sup>59</sup> and the PKA pathway (as a downstream effector of RAS).<sup>60</sup> Defects in the secretory pathway lead to the repression of 5S RNA and tRNA transcription. Temperature-sensitive mutations in two genes that function either in endoplasmic reticulum (ER) to Golgi complex transport (*YPT6*) or in protein and vesicle trafficking between ER and Golgi (*SLY1*) lead to repression of Pol III transcription at the non-permissive temperature. This repression can be partially rescued by deletion of protein kinase C (*PKC1*), the central effector kinase of the cell integrity pathway. Furthermore, deletions of either *WSC1* or *WSC2* genes, the farthest upstream components of the cell integrity pathway, also strongly reduce repression of Pol III transcription that is induced by secretory mutations.<sup>54,55</sup> Deletion of *MAF1* blocks the repression of Pol III transcription caused by defects in the secretory pathway,<sup>59</sup> possibly placing

*MAF1* as a downstream effector of PKC. Likewise, *MAF1* was identified as a downstream effector of the repression of Pol III transcription by TOR,<sup>61</sup> suggesting that many, if not all, repressive signals for Pol III transcription in yeast converge on *MAF1*.

*MAF1* was originally identified in a genetic screen that decreased the nonsense suppressor efficiency of SUP11 tRNA<sup>62</sup> and the link to Pol III transcription was established by the isolation of fragments of the largest subunit of Pol III as multi-suppressor copies of the conditional growth phenotype of the *maf1-1* mutation.<sup>63,64</sup> *MAF1* was shown to inhibit *S. cerevisiae* Pol III transcription as a downstream effector of several nutrition and stress signaling pathways. Starvation, rapamycin treatment and oxidative or endoplasmic reticulum stress were shown to be dependent on *MAF1* for the repression of Pol III transcription.<sup>61</sup> Under repressive growth conditions, *MAF1* is dephosphorylated by protein phosphatase 2A (PP2A), leading to its translocation into the nucleus where it inhibits Pol III transcription mainly through interactions with BRF1 and Pol III itself.<sup>65,66</sup> Favorable growth conditions lead to phosphorylation of *MAF1* by SCH9 and PKA kinases, resulting in its retention in the cytoplasm.<sup>60,67–69</sup> Repression of Pol III transcription by *MAF1*, *MAF1* regulation by phosphorylation and *MAF1* interactions with BRF1 and Pol III have been conserved from yeast to humans.<sup>70–72</sup> It was demonstrated that facilitated recycling of Pol III transcription prevents repression by *MAF1* in HeLa cell extracts, suggesting that the regulation of Pol III recruitment to preinitiation complexes represents an important mechanistic component of *MAF1* function.<sup>27</sup> Interestingly, overexpression of *MAF1* in human glioblastoma cells led to the inhibition of colony formation in soft agar assays, thus demonstrating functional aspects that are usually attributed to tumor suppressor proteins.<sup>73</sup> Possibly, direct inhibition of TATA-binding protein expression and its effects on Pol I and Pol III transcription may contribute to tumor-suppressive activities of *MAF1*.<sup>73</sup> However, no *MAF1* mutation causative for the development of tumors has hitherto been described in higher eukaryotes.

### Regulation of Pol III Transcription in Higher Eukaryotes

**Gene-specific cellular factor TFIIIA.** The prototypical example of Pol III-mediated transcriptional regulation in vertebrates is the regulation of 5S RNA transcription by TFIIIA during *Xenopus laevis* development. TFIIIA was the first eukaryotic transcription factor to be identified and purified to homogeneity,<sup>8</sup> allowing molecular cloning of the cognate cDNA encoding TFIIIA<sup>74</sup> and deduction of zinc-finger motifs.<sup>75</sup> It was shown that TFIIIA regulates 5S RNA transcription through site-specific binding to the 5S gene promoter<sup>8</sup> and that it also binds to 5S RNA, forming a 7S ribonucleoprotein storage particle.<sup>76</sup> Two types of 5S RNA genes have been described in *X. laevis*, an oocyte-specific gene that is present in about 20,000 copies per haploid genome and a somatic gene present in about 400 copies per haploid genome.<sup>77</sup> The somatic 5S gene is expressed in both oocytes and in adult animals, whereas expression of the oocyte-specific 5S genes decreases dramatically after oogenesis. The reduction of oocyte 5S gene transcription has been attributed to multiple mechanisms

involving both chromatin modifications<sup>78,79</sup> and regulation of the expression of TFIIIA itself.<sup>74,77,80</sup> Regarding the latter mechanism, there are high levels of TFIIIA mRNA and protein per cell during early oogenesis but dramatically reduced levels per cell during embryogenesis. Thus, the expression pattern of *X. laevis* TFIIIA suggests a regulatory role for TFIIIA in the developmental changes in 5S gene transcription. Differential expression of TFIIIA in oocyte and somatic cells has been attributed to the usage of distinct promoters. Interestingly, it has been reported that Pol III initiates transcription within the oocyte-specific promoter of TFIIIA, suggesting a Pol III-mediated downregulation of the oocyte-specific TFIIIA promoter in *Xenopus laevis* somatic cells.<sup>81</sup>

**Viral proteins.** In the late seventies and the eighties of the last millennium, after the discovery and partial characterization of general transcription initiation factors for Pol III,<sup>82</sup> Pol II,<sup>83</sup> and Pol I,<sup>84</sup> the focus of transcription research advanced to the identification of mechanisms that contribute to the regulation of the three transcription systems. The contribution of viral proteins in the process of transcription regulation was explored and, in particular, viral proteins with oncogenic functions were analyzed for their ability to enhance or repress transcription. We will restrict the description in this review to the regulation of mammalian Pol III transcription and refer to excellent publications that review the regulation of RNA polymerases I and II.<sup>85-87</sup> Major breakthrough discoveries with respect to the regulation of Pol III transcription by viral proteins were obtained with the adenovirus E1A protein that activates transcription of immediate early viral genes. Transfection of cDNAs encoding E1A stimulated transcription of co-transfected VA1 and tRNA genes.<sup>88-90</sup> The activation was attributed to indirect mechanisms that acted on the activity of TFIIC, since depletion of E1A from HEK cell extracts did not abolish transcription activation.<sup>91</sup> The molecular cloning of TFIIC110<sup>92</sup> showed that its expression could be regulated by transfection of adenoviral E1A or by serum stimulation of HeLa cells. However, it was also shown that recombinant E1A that was produced in baculoviral expression systems could likewise stimulate Pol III transcription,<sup>93</sup> pointing to the possibility that E1A may exert its function through alternative mechanisms. In addition to the regulation of Pol III transcription by E1A, it was demonstrated that the SV40 small t antigen also stimulates Pol III transcription.<sup>94</sup> The hepatitis B virus X (Hep B X) protein also was shown to activate transcription by Pol III.<sup>95</sup> It later was shown that the Hep B X protein acts, at least in part, through enhanced expression of the TATA-binding protein.<sup>96</sup>

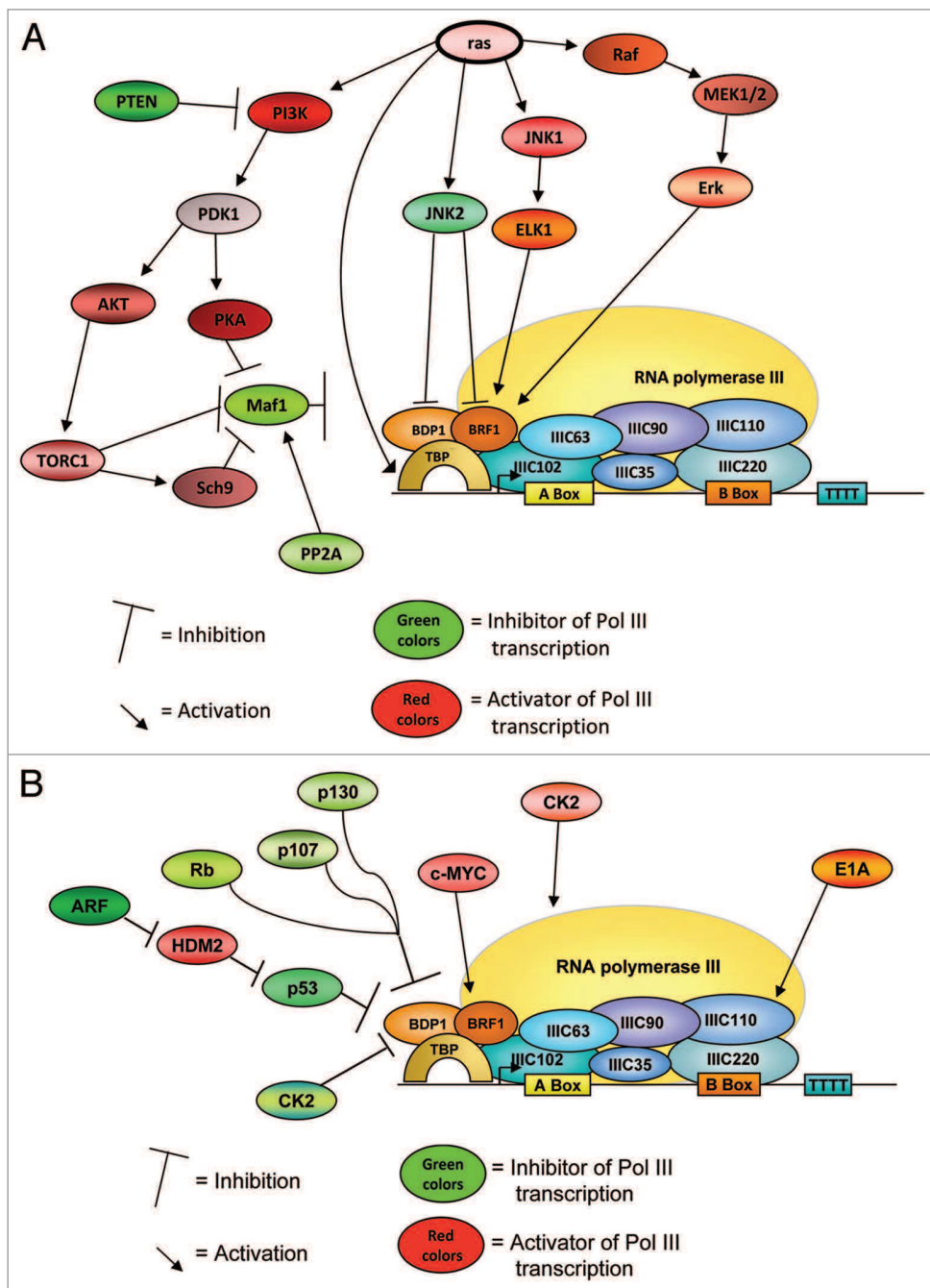
**Link to cell cycle control.** Important mechanistic aspects of Pol III transcription regulation by viral proteins were revealed by the identification of cellular proteins that are regulated by these viral proteins. In particular, it was demonstrated that adenoviral E1A and E1B proteins, papillomaviral E6 and E7 proteins and SV40 large T antigen interacted with and inactivated p53 and pRb, thereby severely impacting on the regulation of the host cell's cell cycle.<sup>97,98</sup> These findings led subsequently to the discoveries that major tumor suppressor proteins, such as pRb,<sup>99,100</sup> p53,<sup>101,102</sup> ARF,<sup>103</sup> PTEN<sup>104</sup> and BRCA1,<sup>105</sup> negatively regulate Pol III transcription. For Rb it was demonstrated that only

hypophosphorylated Rb was able to efficiently repress Pol III transcription.<sup>99</sup> The regulation of Pol III transcription by tumor suppressor proteins was shown to be exerted either through direct interactions with TFIIB<sup>102,106</sup> or PTF/SNAPc/PBP<sup>107</sup> subunits or by the activation of signal transduction cascades that ultimately lead to the phosphorylation and inactivation of TFIIB subunits.<sup>104</sup> However, indirect effects of p53 on the stability of BRF1 have also been described. In this case, it was necessary to maintain ectopic expression of p53 in p53<sup>-/-</sup> Li-Fraumeni cells for at least 4 days in order to reveal an inhibitory effect on Pol III transcription activity; and this effect proved to be mediated by the disappearance of a hyperphosphorylated form of BRF1, which was degraded in a proteasome-dependent manner.<sup>108</sup> Moreover, pRb family members p107 and p130 were also reported to repress Pol III transcription through direct interaction with BRF1.<sup>109,110</sup>

It was further reported that Pol III transcription is repressed in mitosis and that the repression is conferred by a kinase that phosphorylates subunits of TFIIB. In *X. laevis* it was shown that a 92 kDa protein in fractions with TFIIB activity becomes phosphorylated by p34<sup>cdc2</sup> (CDK1).<sup>111,112</sup> In HeLa cells, TBP-associated subunits of TFIIB (presumably corresponding to BRF1 or BRF1 and BDP1) that were purified from cycling cells were shown to reconstitute transcription in mitotic extracts, suggesting that these components represent the target proteins of repression.<sup>113</sup> Subsequently, it was shown that BRF1 is phosphorylated and inactivated during mitosis by a kinase different from CDK1.<sup>114</sup> In addition, BDP1 within TFIIB- $\alpha$  was shown to be phosphorylated by CK2 during mitosis, leading to the repression of Pol III transcription.<sup>115</sup> Apart from this inhibitory role of CK2, it was also reported that CK2 is able to stimulate transcription of the human U6 gene via phosphorylation of Pol III.<sup>116</sup> Regulatory roles for CK2 in Pol III transcription were also reported in the yeast *S. cerevisiae*.<sup>117,118</sup> The phosphorylation of BRF1 and of BDP1 during mitosis has been confirmed by quantitative analysis of protein phosphorylation in HeLa cells.<sup>119</sup> This report also showed that subunits of Pol III (POLR3C, POLR3E and POLR3G), TFIIB- $\alpha$  (BRF2), TFIIC (TFIIC220, TFIIC110) and PTF (PTF $\alpha$ /SNAPc190) are likewise phosphorylated during mitosis, which could possibly contribute to mitotic repression of Pol III transcription in human cells. Repression of PTF $\alpha$ /SNAPc190 activity was shown to be mediated by CK2,<sup>120</sup> but it remains to be shown whether CK2 or another kinase is responsible for PTF $\alpha$ /SNAPc190 phosphorylation during mitosis.

**Link to growth control.** In contrast to the repression exerted by tumor suppressor proteins, the proto-oncogene c-MYC<sup>121</sup> and components of the MAP kinase signal transduction pathway (ERK; JNK1)<sup>122,123</sup> were found to activate Pol III transcription. c-Myc, ERK and JNK1, respectively, were shown to function through recruitment of TFIIB to Pol III promoters (c-Myc), through phosphorylation of the BRF1 subunit of TFIIB (ERK) or through enhanced expression of BRF1 (JNK1). Subsequently, it was shown that c-Myc induces the association of GCN5 and TRRAP with Pol III promoters (tRNA<sup>Leu</sup>; 5S), resulting in acetylation of histone H3.<sup>124</sup> The association of c-Myc with TRRAP and GCN5, as well as Pol III transcription activation is negatively





**Figure 2.** (A) Schematic representation of several regulatory pathways of mammalian RNA polymerase III transcription: Ras-dependent pathways. (B) Schematic representation of several regulatory pathways of mammalian RNA polymerase III transcription: Regulation of Pol III transcription by tumor suppressor and oncogene proteins.

regulated upon nucleolar stress (induced by actinomycin D or serum starvation) by the ribosomal protein L11.<sup>125</sup> Myc functions in regulating Pol III transcription were demonstrated to be independent of its heterodimerization partner Max in *Drosophila melanogaster*.<sup>126</sup> Moreover, in an independent link of Myc to the Pol III transcription apparatus, it was shown that c-Myc activates transcription of the RPC53 (BN51) gene,<sup>127</sup> which encodes a Pol III subunit that has been reported to suppress the

temperature-sensitive G<sub>1</sub> cell cycle arrest in the hamster BHK-21 cell line.<sup>128,129</sup> Interestingly, mutation of the gene encoding RPC53 in yeast also induced cell cycle arrest predominantly in G<sub>1</sub>, although no Myc ortholog has been described in this organism.<sup>130</sup> Collectively, these results strongly indicate that the regulation of growth and cell cycle control are intimately connected to the activity of Pol III transcription. Some of the regulatory mechanisms have been summarized in **Figures 2A and 2B**.

**Link to tumor development.** The above described discoveries that linked Pol III transcription to cellular processes such as cell cycle or growth suggested that Pol III transcription may be deregulated during cell transformation. In addition it was shown that the expression of five TFIIC subunits (the sixth was not yet identified) is increased in ovarian carcinomas.<sup>131</sup> Importantly, the samples analyzed in this study were obtained from patients in clinics and not from cell lines grown under tissue culture conditions, demonstrating that the expression of Pol III transcription components is deregulated in tumors that have not been produced by experimental manipulations. It was nevertheless a surprise that the inducible overexpression of the BRF1 subunit of TFIIB or of the tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> gene in mouse 3T3 fibroblasts was sufficient for transformation of these cells.<sup>132</sup> These data suggested that enhanced transcription from type 3 promoters was not required for tumor formation, but that only transcription by BRF1-containing TFIIB-β, and in particular that of the tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> gene, was crucial in this process. However, overexpression of BRF1 or tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> in rat1a fibroblasts proved insufficient for cellular transformation, indicating that cell type-specific differences may exist between these two model systems.<sup>133</sup> The analysis in rat1a cells has further shown that enhanced Pol III transcription is required for oncogenic transformation by c-Myc.<sup>133</sup> In summary, and even if the model of BRF1- or tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-mediated cell transformation may not be applicable to all types of cells, these two studies clearly demonstrate the importance of Pol III transcription for cell transformation.

### Regulation of Pol III Transcription during Cellular Differentiation

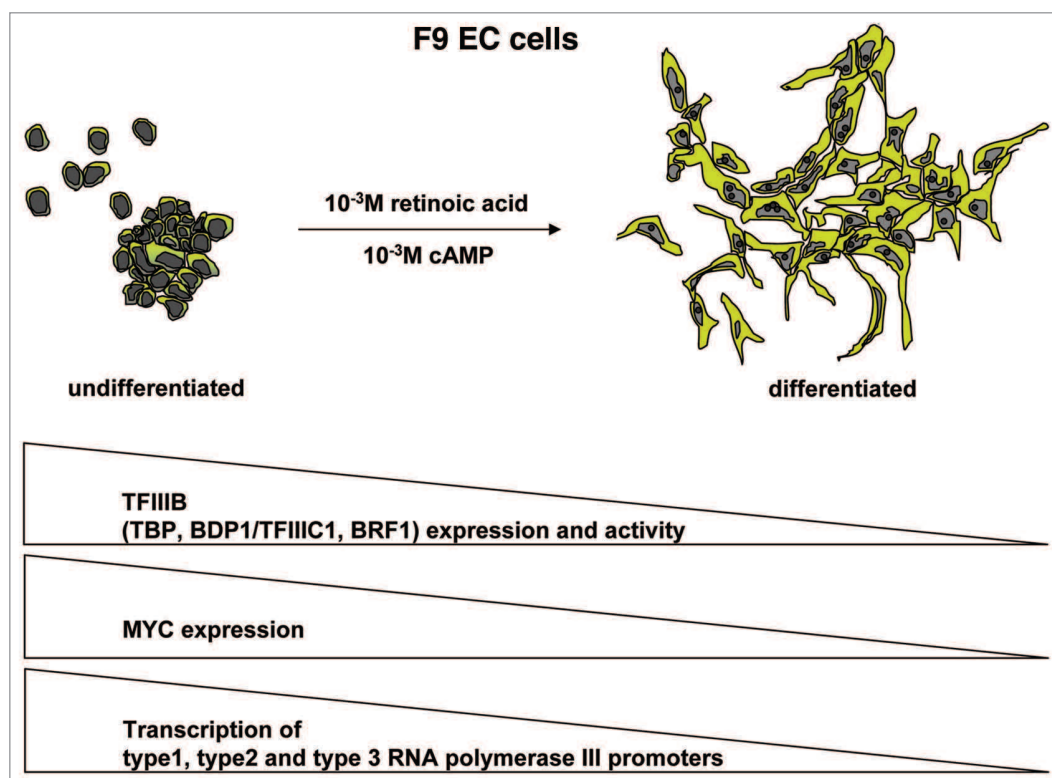
In addition to the mechanisms that coordinate the regulation of growth and Pol III transcription activity, multicellular organisms must have evolved the means to regulate transcription during differentiation in order to ensure that cells with high protein synthesis rates are capable of producing the components necessary for translation (i.e., ribosomal RNAs and proteins, as well as tRNAs)—even if they are resting and thus in the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle. Some tissues such as the exocrine<sup>134</sup> or endocrine<sup>135</sup> pancreas probably circumvent this problem in part by balancing cell growth and apoptosis, resulting in stable cell numbers whilst allowing cell growth and division. In these tissues, the required protein synthesis and thus active Pol III transcription, may presumably occur predominantly in dividing cells, although the presence of high amounts of endoplasmic reticulum suggests high protein synthesis rates in both dividing and resting cells. Other cells, including Schwann cells that induce myelin gene transcription after cell cycle exit,<sup>136</sup> require transcription of ribosomal components after entering the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle.

Only one study addresses the regulation of Pol III transcription in cells that have entered the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle. The model system for this study is the hypertrophic growth of cardiomyocytes that is induced by serum, endothelin-1 or phenylephrine. Even if these cells are in the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle, they are still able to increase cell mass (hypertrophy) upon serum stimulation and to a lesser extent by endothelin-1 or

phenylephrine stimulation. Induction of hypertrophy is accompanied by enhanced BRF1 and c-Myc expression and by elevated rates of phosphorylated ERK, as well as phosphorylated Rb.<sup>137</sup> As a result, Pol III transcription is enhanced in cardiomyocytes by these stimuli. Except for this particular case, there is no detailed information on how mammalian Pol III transcription is regulated during differentiation and in terminally differentiated cells and tissues.

Little is known about the regulation of Pol III transcription during differentiation of mammalian cells. In particular, analyses of Pol III transcription at the level of protein expression and/or modification during early steps of differentiation (e.g., in undifferentiated embryonic stem cells and in the course of their differentiation) are limited by the amounts of cells and extracts that can be derived from these cells. To overcome these limits, embryonic carcinoma (EC) cells have been employed for analyzing the regulation of Pol III transcription during early steps of differentiation. Mouse F9 or human NTERA2 EC cells are tumor cell lines with certain stem cell-like features.<sup>138</sup> Suspension cultures of F9 EC cells can be differentiated into embryoid bodies by the addition of retinoic acid and monolayer cultures of F9 cells differentiate into parietal endoderm (PE) upon the addition of retinoic acid and cAMP (Fig. 3). This cell system has been employed for analyzing the activity of the Pol III transcription system during differentiation. It was shown that Pol III activity decreased for transcription of gene-internal promoters as well as of type 3 promoters. The reduced transcriptional activity at gene-internal promoters was attributed to altered TFIIB activity<sup>139</sup> or to a decrease in TFIIC1 activity.<sup>140</sup> The decrease in TFIIB activity was shown to result from the combined reduction of the abundance of TFIIB subunits (TBP, BRF1 and BDP1).<sup>141,142</sup> Furthermore, the protein levels of c-MYC were also dramatically downregulated during differentiation of EC into PE cells, which may account in parts for the reduction of Pol III transcription.<sup>142</sup> Impaired transcription of type 3 genes was correlated with a decrease in binding of PTF/SNAPc/PBP to the PSE<sup>143</sup> (Fig. 3).

These results, indicating that TFIIB-, TFIIC1- and PTF/SNAPs/PBP-activities are regulated during differentiation of F9 EC cells could be functionally linked to each other by the finding that the TFIIB subunit BDP1 is essential for TFIIC1-activity.<sup>144</sup> Originally, TFIIC was separated by B-Box-based affinity purification or by chromatography over Mono Q into the TFIIC1 and DNA-binding TFIIC2 components, which were both required for Pol III transcription.<sup>145,146</sup> TFIIC1 was shown to stimulate binding of the six-subunit TFIIC2 complex to gene-internal type 2 promoters,<sup>145</sup> as well as PTF/SNAPc/PBP binding to the PSE.<sup>147</sup> Extensive purification of TFIIC1 in conjunction with analyses of recombinant TFIIB150 (corresponding to amino acids 1–846 of BDP1) revealed that BDP1 and TFIIC1 were functionally replaceable in complementation assays of transcription with extracts that were derived from differentiated F9 cells (and thus contained limiting amounts of TFIIC1) or in transcription systems that were reconstituted with partially purified transcription factors.<sup>144</sup> Together, these data indicate that the activity of BDP1 is negatively regulated during differentiation of F9 teratocarcinoma cells.



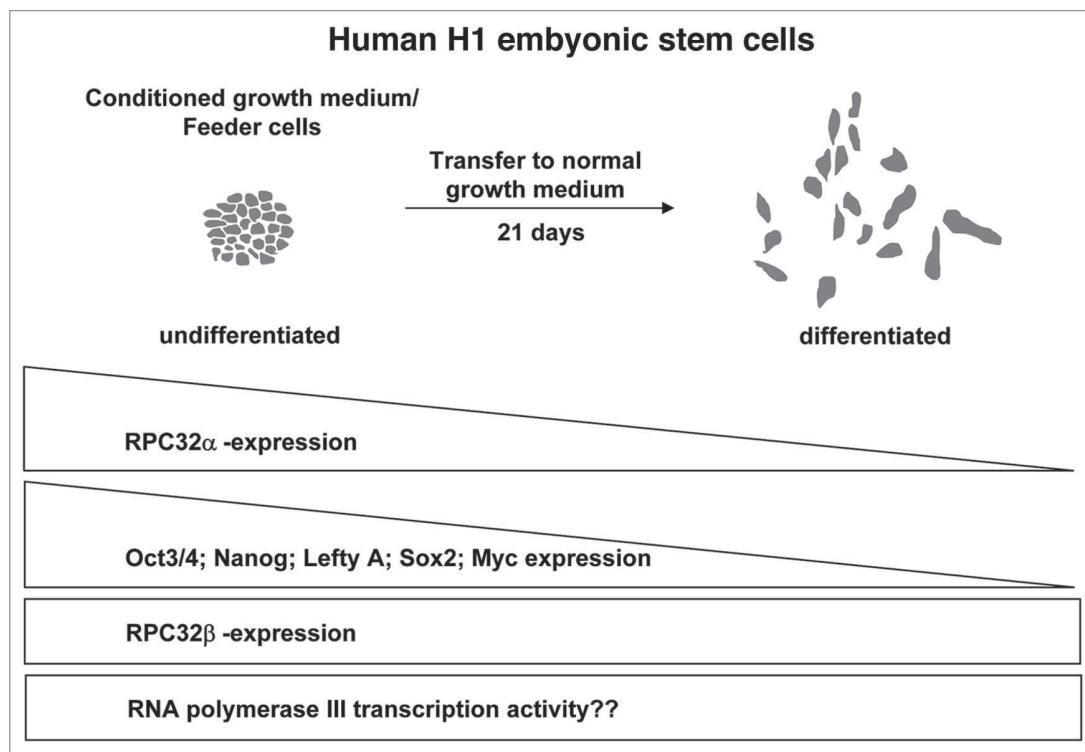
**Figure 3.** Regulation of RNA polymerase III transcription during differentiation of mouse F9 embryonic carcinoma cells.

The importance of Pol III transcription for proliferation and differentiation and thus for organ development, was further demonstrated in *Danio rerio*. Expression of a splice mutant of the second largest subunit of Pol III (POLR3B  $\Delta$ 239-279; *slim jim*) in zebrafish led to disruption of the development of digestive organs and to size reductions in the exocrine pancreas, liver, retina and terminal branchial arches. Although the strongest expression of POLR3B was reported in the nervous system 24 hours post fertilization, no neuronal phenotype other than that of the retina was reported for the *slim jim* mutant.<sup>148</sup> These data suggest that normal Pol III transcription rates may be crucial for the development of rapidly growing cells. In support of this notion, it was proposed that tissue-specific expression of tRNAs may be coordinated with the codon usage of individual cells, which may in turn be crucial for tissue or cell type-specific translation regulation.<sup>149</sup>

Recent data indicate that expression of a subunit of Pol III itself is also subject to regulation during the process of differentiation. It was shown that RPC32 $\alpha$  mRNA expression is negatively regulated during differentiation of human H1 embryonic stem cells and that RPC32 $\alpha$  mRNA could not be detected in RNA blots from differentiated tissues (Fig. 4). In addition, RPC32 $\alpha$  mRNA and protein expression were found to increase during transformation of human embryonic lung IMR90 fibroblasts by defined genetic elements.<sup>4</sup> These data collectively suggested that RPC32 $\alpha$  mRNA and protein expression is negatively regulated during differentiation and upregulated during the malignant transformation of human cells. Furthermore, by employing siRNAs that specifically suppress RPC32 $\alpha$ -expression, it was

demonstrated that RPC32 $\alpha$  is important for anchorage-independent growth of a HeLa S3 carcinoma cell line. Most importantly, overexpression of RPC32 $\alpha$  in IMR90 human embryonic lung fibroblasts with altered functions of p53 and pRb (through the expression of papillomaviral E6 and E7 proteins) led to full transformation and immortalization of these cells. Altogether, these data indicated that the changes in expression of RPC32 $\alpha$  were not only coincident with differentiation or cell transformation, but that RPC32 $\alpha$  may play an active role in these processes.<sup>4</sup>

In view of these results it is relevant to ask why studies that examined Pol III transcription during the differentiation of F9 teratocarcinoma cells did not identify the stem cell-specific isoform of RNA polymerase III. A possible explanation is that the genes analyzed in these studies were the well-known Pol III genes (transfer-, 5S-, U6- or VA1-RNA genes), that can be transcribed in vitro either by Pol III $\alpha$  or by Pol III $\beta$ .<sup>4</sup> As a consequence, the expression of these genes presumably does not change during the process of stem cell differentiation. If this supposition holds true, the downregulation of RPC32 $\alpha$  during differentiation may affect the transcription of genes other than the 5S and tRNA genes—and these hypothetical yet-to-be-identified genes may turn out to be important for maintaining cells in an undifferentiated state. The possible existence of such Pol III $\alpha$ -specific genes also implies that the phenotypes observed in the zebrafish (which according to BLAST analyses contains orthologs of RPC32 $\alpha$  and RPC32 $\beta$ ) expressing the *slim jim* mutant may, at least in part, be attributable to a dysfunction of Pol III $\alpha$ . Thus, the identification of genes that are specifically transcribed by Pol



**Figure 4.** Regulation of RNA polymerase III transcription during differentiation of human H1 embryonic stem cells.

III $\alpha$  and that cannot be transcribed by Pol III $\beta$  will be important for understanding the roles of Pol III $\alpha$  and Pol III $\beta$  in growth and development. A first step towards the identification of such genes that may fulfil important functions in growth and differentiation has been made by establishing a genome-wide map of RNA polymerase III DNA interactions.

### The Human Pol III Transcriptome

Recently, the results from five independent genome-wide chromatin immunoprecipitation (ChIP) sequencing projects in human cells have been published.<sup>150-154</sup> Antibodies against several distinct subunits of Pol III (RPC155/POLR3A; RPC53/POLR3D; RPC32/POLR3G) and its transcription factors (BRF1; BRF2; BDP1; TFIIC220; TFIIC110; TFIIC63; PTF8/SNAPc2/SNAP45) were employed for determining the genes that are in contact with these proteins and presumably transcribed in a variety of untransformed, immortalized or transformed cell lines (IMR90 fibroblasts/TERT; human foreskin fibroblasts/TERT; Jurkat; HEK; HeLa; K562; CD4<sup>+</sup> cells). As expected, at least one copy of each multicopy gene (individual tRNA, 5S, 7SL and U6 genes) is associated with Pol III and BRF1 (TFIIIB- $\beta$ ) or BRF2 (TFIIIB- $\alpha$ ).<sup>151-154</sup> Single-copy Pol III-transcribed genes include the 7SK, RNase MRP, RNase P, BC200, U6atac and vault-1, -2 and -3 genes). Of these, the 7SK, U6atac, RNase MRP, RNase P and vault genes were reported to be associated with Pol III in each of the studies. BC200 was crosslinked to Pol III and identified in the ChIP-seq (K562 cells)<sup>152</sup> and microarray

(HeLa cells)<sup>153</sup> analyses, but was not identified by the other studies. The differential detection of the BC200 gene in individual studies may be attributable to distinct cut-off values that were used to distinguish positive and negative results and/or a cell type-specific expression pattern of the BC200 gene.<sup>155</sup> A greater discrepancy between the different studies and distinct cell types was observed with respect to the occupancy of tRNA genes by Pol III and/or subunits of TFIIC and TFIIB. This variation may be attributable to the copy number of individual tRNA genes and cell type-specific nuclear organization of the genome. In general, the ChIP-sequencing results do not support earlier reports<sup>156,157</sup> indicating that micro RNAs may be transcribed by Pol III. In fact, the only miRNA loci that were found to be associated with Pol III are hsa-mir565 (a tRNA fragment),<sup>150</sup> hsa-mir-1975 (overlaps with the hy5 gene)<sup>151,152</sup> and hsa-mir-886 (overlaps with a vault gene).<sup>151-154</sup> Thus, all these micro RNA genes overlap genes that possess classical Pol III promoters. One single microRNA gene (has-mir-498) has been described to associate with Pol III in CD4<sup>+</sup> cells but not in HeLa cells.<sup>150</sup> The number of novel Pol III genes is difficult to assess, although tens to hundreds of candidate genes, depending on the study, have been identified. These genes include SINEs, snR loci, sn/snoRNA loci and unannotated genes.

Interestingly, two of the five studies employed antibodies directed against RPC32 $\alpha$  for ChIPs.<sup>153,154</sup> Some of the genes identified in these studies may represent Pol III $\alpha$ -specific genes, although the specificity of the antibodies for Pol III $\alpha$  versus Pol III $\beta$  in immunoprecipitation assays remains to be proven. At present, it cannot be excluded that the genomic loci



identified in these studies also contain Pol III $\beta$ -transcribed genes, such that Pol III $\alpha$ -specific genes remain unequivocally to be determined.

### Pol III, Chromatin and Higher Order Genome Organization

Chromatin modifications found near Pol III-bound genes share features with the histone modifications found at actively transcribed Pol II genes, including histone H3K4me3 or H3K9Ac.<sup>150,152,153</sup> However, other positively acting histone modifications described at Pol II transcribed genes, namely the RPB1 CTD-dependent, Set2-mediated H3K36me3 or H3K79me2 were absent at transcribed Pol III genes. Furthermore, H3K27me3 was rarely found at actively transcribed Pol III promoters.<sup>150</sup>

In addition to the discovery of novel genes that may be transcribed by Pol III, two of the publications also described sites within the genome that are occupied by TFIIC, but not by Pol III (extra TFIIC [ETC] loci).<sup>152,153</sup> These sites are often found in close vicinity to genes transcribed by Pol II and may represent boundary or insulator elements, similar to what was reported in yeast.<sup>158</sup> TFIIC may bind to ETCs via a novel DNA recognition sequence<sup>152</sup> and might also directly recruit histone modifying factors.<sup>159</sup> CCCTC-binding factor (CTFC) also was detected at these ETC sites<sup>152</sup> and at a subset of tDNAs with the highest enrichment of Pol III.<sup>153</sup> The association of the cohesin-interacting protein CTCF with TFIIC-bound ETCs or tDNA genes is reminiscent of a situation described in yeast wherein tDNAs and Pol III-associated proteins have been reported to contribute to the establishment of sister chromatid cohesion at the HMR locus.<sup>160</sup>

c-Myc was crosslinked close to Pol III promoters, in support of a role for c-Myc in activating Pol III transcription.<sup>154</sup> Surprisingly, in addition to associations with Pol III transcription factors, c-Myc and Pol III itself, many of the transcribed Pol III genes were also in close proximity to Pol II transcription activators such as Fos and Jun<sup>154</sup> or Ets1 and STAT1.<sup>153</sup> Moreover, basal Pol II transcription factors and the cyclin T1 subunit of elongation factor PTEFb could be crosslinked close to sites occupied by Pol III.<sup>150</sup> Most importantly, Pol II was similarly enriched at Pol III-transcribed genes,<sup>151-154</sup> often upstream of the transcription initiation site and sometimes attributable to the presence of Pol II promoters within a distance of 2 kb.<sup>153</sup> Notably, in about two-thirds of the cases these Pol II promoters directed transcription by Pol II in the opposite direction of that of Pol III. The co-occupation of these sites by Pol II and Pol III has been interpreted as being advantageous for Pol III-mediated transcription as a result of Pol II-dependent chromatin modifications. However, this assumption has not been experimentally validated and alternative scenarios can be envisaged. In favor of direct interactions of Pol III components with chromatin-modifying enzymes, it has been shown that Pol III transcription of a chromatin template is

facilitated by a direct TFIIC-mediated recruitment of the histone acetyl transferase p300,<sup>159</sup> which could contribute to the histone acetylation<sup>161</sup> observed at these promoters in cells.

In addition to local chromatin modifications that are important for Pol III transcription, tRNA-induced and condensin-mediated organization of chromatin domains results in the recruitment of tRNA genes to the nucleolus in *S. cerevisiae*.<sup>162,163</sup> This could result in the co-recruitment of Pol II genes to these sites and placement of the tRNA genes into a chromatin context that may be favorable for their expression or repression. Moreover, perinucleolar domains (PNC) have been shown to form in tumor cells in a Pol III-dependent manner<sup>164</sup> and may represent sites that are favorable for gene expression. With respect to PNCs, it remains to be established whether Pol III $\alpha$  contributes to the formation of these subcellular structures. If so, the ability of Pol III $\alpha$  to contribute to cell transformation may be attributable to repositioning Pol II genes involved in cell transformation or tumor suppression into actively transcribed or repressed domains, respectively. In summary, the genome-wide determination of Pol III-DNA associations provides important information about the genes that are in contact with Pol III in several distinct cell lines and a closer analysis of these genes may reveal the ones that contribute to essential functions of Pol III in cell growth and differentiation.

### Conclusion

Research in recent years has contributed to an improved understanding of how RNA polymerase III-mediated transcription is regulated in yeast and mammals. There has been considerable progress with respect to an understanding of the molecular mechanisms that link cell growth and cell cycle control to Pol III transcription in lower and higher eukaryotes. This understanding has also allowed an appreciation of the importance of Pol III transcription for cell transformation and for sustaining tumor growth. Recent data have linked Pol III-mediated transcription to the differentiation of EC and of ES cells, indicating that the transcription of small untranslated RNAs by Pol III is essential not only for the regulation of growth, but also for the regulation of differentiation. Future research will provide a more detailed understanding of how Pol III contributes to these processes, including the specific functions of the two Pol III isoforms.

### Acknowledgements

We thank Giorgio Dieci for critically reading the manuscript. This work has been supported by grants from the Conseil Régional d'Aquitaine and the European Regional Development Fund (to M.T.), from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) "REGPOLSTRESS" (to M.T.) and from the Ligue Contre le Cancer-Comités Gironde and Dordogne (to M.T). R.G.R. was supported by grants (CA113872, DK071900 and CA113872) from the National Institutes of Health.

## References

- Roeder RG, Rutter WJ. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* 1969; 224:234-7.
- Ream TS, Haag JR, Wierzbicki AT, Nicora CD, Norbeck AD, Zhu JK, et al. Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol Cell* 2009; 33:192-203.
- Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS. Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* 2008; 135:635-48.
- Haurie V, Durrieu-Gaillard S, Dumay-Odelot H, Da Silva D, Rey C, Prochazkova M, et al. Two isoforms of human RNA polymerase III with specific functions in cell growth and transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:4176-81.
- Dieci G, Fiorino G, Castelnovo M, Teichmann M, Pagano A. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet* 2007; 23:614-22.
- Huang Y, Maraia RJ. Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:2675-90.
- Dumay-Odelot H, Marck C, Durrieu-Gaillard S, Lefebvre O, Jourdain S, Prochazkova M, et al. Identification, molecular cloning and characterization of the sixth subunit of human transcription factor TFIIC. *J Biol Chem* 2007; 282:17179-89.
- Engelke DR, Ng SY, Shastri BS, Roeder RG. Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell* 1980; 19:717-28.
- Geiduschek EP, Kassavetis GA. The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol* 2001; 310:1-26.
- Waldschmidt R, Wanandi I, Seifart KH. Identification of transcription factors required for the expression of mammalian U6 genes in vitro. *EMBO J* 1991; 10:2595-603.
- Murphy S, Yoon JB, Gerster T, Roeder RG. Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes. *Mol Cell Biol* 1992; 12:3247-61.
- Sadowski CL, Henry RW, Lobo SM, Hernandez N. Targeting TBP to a non-TATA box cis-regulatory element: a TBP-containing complex activates transcription from snRNA promoters through the PSE. *Genes Dev* 1993; 7:1535-48.
- Carbon P, Murgo S, Ebel JP, Krol A, Tebb G, Mattaj LW. A common octamer motif binding protein is involved in the transcription of U6 snRNA by RNA polymerase III and U2 snRNA by RNA polymerase II. *Cell* 1987; 51:71-9.
- Bark C, Weller P, Zabielski J, Janson L, Pettersson U. A distant enhancer element is required for polymerase III transcription of a U6 RNA gene. *Nature* 1987; 328:356-9.
- Murphy S, Pierani A, Scheidereit C, Melli M, Roeder RG. Purified octamer binding transcription factors stimulate RNA polymerase III-mediated transcription of the 7SK RNA gene. *Cell* 1989; 59:1071-80.
- Tanaka M, Lai JS, Herr W. Promoter-selective activation domains in Oct-1 and Oct-2 direct differential activation of an snRNA and mRNA promoter. *Cell* 1992; 68:755-67.
- Schaub M, Myslinski E, Schuster C, Krol A, Carbon P, Staf, a promiscuous activator for enhanced transcription by RNA polymerases II and III. *EMBO J* 1997; 16:173-81.
- Stümel W, Kober I, Seifart KH. A nucleosome positioned in the distal promoter region activates transcription of the human U6 gene. *Mol Cell Biol* 1997; 17:4397-405.
- Zhao X, Pendergrast PS, Hernandez N. A positioned nucleosome on the human U6 promoter allows recruitment of SNAPc by the Oct-1 POU domain. *Mol Cell* 2001; 7:539-49.
- Kassavetis GA, Braun BR, Nguyen LH, Geiduschek EP. *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIA and TFIIC are assembly factors. *Cell* 1990; 60:235-45.
- Teichmann M, Seifart KH. Physical separation of two different forms of human TFIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro. *EMBO J* 1995; 14:5974-83.
- Schramm L, Pendergrast PS, Sun Y, Hernandez N. Different human TFIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes Dev* 2000; 14:2650-63.
- Teichmann M, Wang Z, Roeder RG. A stable complex of a novel transcription factor IIB-related factor, human TFIIB50 and associated proteins mediate selective transcription by RNA polymerase III of genes with upstream promoter elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:14200-5.
- Teichmann M, Dieci G, Huet J, Rütth J, Sentenac A, Seifart KH. Functional interchangeability of TFIIB components from yeast and human cells in vitro. *EMBO J* 1997; 16:4708-16.
- Wang Z, Luo T, Roeder RG. Identification of an autonomously initiating RNA polymerase III holoenzyme containing a novel factor that is selectively inactivated during protein synthesis inhibition. *Genes Dev* 1997; 11:2371-82.
- Dieci G, Sentenac A. Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell* 1996; 84:245-52.
- Cabart P, Lee J, Willis IM. Facilitated recycling protects human RNA polymerase III from repression by Maf1 in vitro. *J Biol Chem* 2008; 283:36108-17.
- Wang Z, Roeder RG. DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell* 1998; 1:749-57.
- Wang Z, Bai L, Hsieh YJ, Roeder RG. Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple-round transcription by human RNA polymerase III. *EMBO J* 2000; 19:6823-32.
- Tavenet A, Suleau A, Dubreuil G, Ferrari R, Ducrot C, Michaut M, et al. Genome-wide location analysis reveals a role for Sub1 in RNA polymerase III transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:14265-70.
- Rosonina E, Willis IM, Manley JL. Sub1 functions in osmoregulation and in transcription by both RNA polymerases II and III. *Mol Cell Biol* 2009; 29:2308-21.
- Maraia RJ. Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:3383-7.
- Weser S, Bachmann M, Seifart KH, Meissner W. Transcription efficiency of human polymerase III genes in vitro does not depend on the RNP-forming autoantigen La. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:3935-42.
- French SL, Osheim YN, Schneider DA, Sikes ML, Fernandez CF, Copela LA, et al. Visual analysis of the yeast 5S rRNA gene transcriptome: regulation and role of La protein. *Mol Cell Biol* 2008; 28:4576-87.
- Fairley JA, Kantidakis T, Kenneth NS, Intine RV, Maraia RJ, White RJ. Human La is found at RNA polymerase III-transcribed genes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:18350-5.
- Kruppa M, Moir RD, Kolodrubetz D, Willis IM. Nhp6, an HMG1 protein, functions in SNR6 transcription by RNA polymerase III in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 2001; 7:309-18.
- Stillman DJ. Nhp6: a small but powerful effector of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799:175-80.
- Chédin S, Ferri ML, Peyroche G, Andrau JC, Jourdain S, Lefebvre O, et al. The yeast RNA polymerase III transcription machinery: a paradigm for eukaryotic gene activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1998; 63:381-9.
- Hu P, Wu S, Sun Y, Yuan CC, Kobayashi R, Myers MP, et al. Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol Cell Biol* 2002; 22:8044-55.
- Kassavetis GA, Prakash P, Shim E. The C53/C37 subcomplex of RNA polymerase III lies near the active site and participates in promoter opening. *J Biol Chem* 2010; 285:2695-706.
- Carter R, Drouin G. The increase in the number of subunits in eukaryotic RNA polymerase III relative to RNA polymerase II is due to the permanent recruitment of general transcription factors. *Mol Biol Evol* 2010; 27:1035-43.
- Valenzuela P, Hager GL, Weinberg F, Rutter WJ. Molecular structure of yeast RNA polymerase III: demonstration of the tripartite transcription system in lower eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:1024-8.
- Werner M, Hermann-Le Denmat S, Treich I, Sentenac A, Thuriaux P. Effect of mutations in a zinc-binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol Cell Biol* 1992; 12:1087-95.
- Thuillier V, Stettler S, Sentenac A, Thuriaux P, Werner M. A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *EMBO J* 1995; 14:351-9.
- Werner M, Chaussivert N, Willis IM, Sentenac A. Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70 kDa component of transcription factor IIIB. *J Biol Chem* 1993; 268:20721-4.
- Brun I, Sentenac A, Werner M. Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *EMBO J* 1997; 16:5730-41.
- Bartholomew B, Braun BR, Kassavetis GA, Geiduschek EP. Probing close DNA contacts of RNA polymerase III transcription complexes with the photoactive nucleoside 4-thiodeoxythymidine. *J Biol Chem* 1994; 269:18090-5.
- Wang Z, Roeder RG. Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev* 1997; 11:1315-26.
- Hsieh YJ, Kundu TK, Wang Z, Kovelman R, Roeder RG. The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol* 1999; 19:7697-704.
- Hsieh YJ, Wang Z, Kovelman R, Roeder RG. Cloning and characterization of two evolutionarily conserved subunits (TFIIC102 and TFIIC63) of human TFIIC and their involvement in functional interactions with TFIIB and RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 1999; 19:4944-52.
- Schwartz LB, Sklar VE, Jaehning JA, Weinmann R, Roeder RG. Isolation and partial characterization of the multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma, MOPC 315. *J Biol Chem* 1974; 249:5889-97.
- Sklar VE, Roeder RG. Purification and subunit structure of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase III from the mouse plasmacytoma, MOPC 315. *J Biol Chem* 1976; 251:1064-73.
- Paule MR, White RJ. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:1283-98.
- Li Y, Moir RD, Sethy-Coraci IK, Warner JR, Willis IM. Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. *Mol Cell Biol* 2000; 20:3843-51.
- Willis IM, Desai N, Upadhyaya R. Signaling repression of transcription by RNA polymerase III in yeast. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2004; 77:323-53.
- Zaragoza D, Ghavidel A, Heitman J, Schultz MC. Rapamycin induces the G<sub>0</sub> program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1998; 18:4463-70.

57. Wei Y, Zheng XF. Sch9 partially mediates TORC1 signaling to control ribosomal RNA synthesis. *Cell Cycle* 2009; 8:4085-90.
58. Tsang CK, Liu H, Zheng XF. mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. *Cell Cycle* 2010; 9:953-7.
59. Upadhyaya R, Lee J, Willis IM. Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. *Mol Cell* 2002; 10:1489-94.
60. Moir RD, Lee J, Haeusler RA, Desai N, Engelke DR, Willis IM. Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:15044-9.
61. Ciesla M, Boguta M. Regulation of RNA polymerase III transcription by Maf1 protein. *Acta Biochim Pol* 2008; 55:215-25.
62. Murawski M, Szczesniak B, Zoladek T, Hopper AK, Martin NC, Boguta M. maf1 mutation alters the subcellular localization of the Mod5 protein in yeast. *Acta Biochim Pol* 1994; 41:441-8.
63. Boguta M, Czarska K, Zoladek T. Mutation in a new gene MAF1 affects tRNA suppressor efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1997; 185:291-6.
64. Pluta K, Lefebvre O, Martin NC, Smagowicz WJ, Stanford DR, Ellis SR, et al. Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2001; 21:5031-40.
65. Oficjalska-Pham D, Harismendy O, Smagowicz WJ, Gonzalez de Peredo A, Boguta M, Sentenac A, Lefebvre O. General repression of RNA polymerase III transcription is triggered by protein phosphatase type 2A-mediated dephosphorylation of Maf1. *Mol Cell* 2006; 22:623-32.
66. Roberts DN, Wilson B, Huff JT, Stewart AJ, Cairns BR. Dephosphorylation and genome-wide association of Maf1 with Pol III-transcribed genes during repression. *Mol Cell* 2006; 22:633-44.
67. Willis IM, Moir RD. Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1. *Trends Biochem Sci* 2007; 32:51-3.
68. Lee J, Moir RD, Willis IM. Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway. *J Biol Chem* 2009; 284:12604-8.
69. Wei Y, Tsang CK, Zheng XF. Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *EMBO J* 2009; 28:2220-30.
70. Reina JH, Azzouz TN, Hernandez N. Maf1, a new player in the regulation of human NA polymerase III transcription. *PLoS ONE* 2006; 1:134.
71. Rollins J, Veras I, Cabarcas S, Willis I, Schramm L. Human Maf1 negatively regulates NA polymerase III transcription via the TFIIB family members Brl1 and Brf2. *Int J Biol Sci* 2007; 3:292-302.
72. Goodfellow SJ, Graham EL, Kantidakis T, Marshall L, Coppins BA, Oficjalska-Pham D, et al. Regulation of RNA polymerase III transcription by Maf1 in mammalian cells. *J Mol Biol* 2008; 378:481-91.
73. Johnson SS, Zhang C, Fromm J, Willis IM, Johnson DL. Mammalian Maf1 is a negative regulator of transcription by all three nuclear RNA polymerases. *Mol Cell* 2007; 26:367-79.
74. Ginsberg AM, King BO, Roeder RG. *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell* 1984; 39:479-89.
75. Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1985; 4:1609-14.
76. Honda BM, Roeder RG. Association of a 5S gene transcription factor with 5S RNA and altered levels of the factor during cell differentiation. *Cell* 1980; 22:119-26.
77. Shastry BS, Honda BM, Roeder RG. Altered levels of a 5 S gene-specific transcription factor (TFIIIA) during oogenesis and embryonic development of *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 1984; 259:11373-82.
78. Wolffe AP, Brown DD. Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. *Science* 1988; 241:1626-32.
79. Wolffe AP. Dominant and specific repression of *Xenopus* oocyte 5S RNA genes and satellite I DNA by histone H1. *EMBO J* 1989; 8:527-37.
80. Taylor W, Jackson IJ, Siegel N, Kumar A, Brown DD. The developmental expression of the gene for TFIIIA in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res* 1986; 14:6185-95.
81. Martinez E, Lagna G, Roeder RG. Overlapping transcription by RNA polymerases II and III of the *Xenopus* TFIIIA gene in somatic cells. *J Biol Chem* 1994; 269:25692-8.
82. Segall J, Matsui T, Roeder RG. Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III. *J Biol Chem* 1980; 255:11986-91.
83. Matsui T, Segall J, Weil PA, Roeder RG. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1980; 255:11992-6.
84. Grummt I, Roth E, Paule MR. Ribosomal RNA transcription in vitro is species specific. *Nature* 1982; 296:173-4.
85. Roeder RG. Lasker Basic Medical Research Award. The eukaryotic transcriptional machinery: complexities and mechanisms unforeseen. *Nat Med* 2003; 9:1239-44.
86. Juven-Gershon T, Kadonaga JT. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 2010; 339:225-9.
87. Drygin D, Rice WG, Grummt I. The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50:131-56.
88. Berger SL, Folk WR. Differential activation of RNA polymerase III-transcribed genes by the polyomavirus enhancer and the adenovirus E1A gene products. *Nucleic Acids Res* 1985; 13:1413-28.
89. Hoefler WK, Roeder RG. Enhancement of RNA polymerase III transcription by the E1A gene product of adenovirus. *Cell* 1985; 41:955-63.
90. Gaynor RB, Feldman LT, Berk AJ. Transcription of class III genes activated by viral immediate early proteins. *Science* 1985; 230:447-50.
91. Yoshinaga S, Dean N, Han M, Berk AJ. Adenovirus stimulation of transcription by RNA polymerase III: evidence for an E1A-dependent increase in transcription factor IIIC concentration. *EMBO J* 1986; 5:343-54.
92. Sinn E, Wang Z, Kovelman R, Roeder RG. Cloning and characterization of a TFIIC2 subunit (TFIICbeta) whose presence correlates with activation of RNA polymerase III-mediated transcription by adenovirus E1A expression and serum factors. *Genes Dev* 1995; 9:675-85.
93. Patel G, Jones NC. Activation in vitro of RNA polymerase II and III directed transcription by baculovirus produced E1A protein. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:2909-15.
94. Loeken M, Bikel I, Livingston DM, Brady J. Trans-activation of RNA polymerase II and III promoters by SV40 small t antigen. *Cell* 1988; 55:1171-7.
95. Aufero B, Schneider RJ. The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990; 9:497-504.
96. Wang HD, Yuh CH, Dang CV, Johnson DL. The hepatitis B virus X protein increases the cellular level of TATA-binding protein, which mediates transactivation of RNA polymerase III genes. *Mol Cell Biol* 1995; 15:6720-8.
97. Levine AJ. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* 2009; 384:285-93.
98. DeCaprio JA. How the Rb tumor suppressor structure and function was revealed by the study of Adenovirus and SV40. *Virology* 2009; 384:274-84.
99. White RJ, Trouche D, Martin K, Jackson SP, Kouzarides T. Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein. *Nature* 1996; 382:88-90.
100. Chu WM, Wang Z, Roeder RG, Schmid CW. RNA polymerase III transcription repressed by Rb through its interactions with TFIIB and TFIIC2. *J Biol Chem* 1997; 272:14755-61.
101. Chesnokov I, Chu WM, Botchan MR, Schmid CW. p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. *Mol Cell Biol* 1996; 16:7084-8.
102. Cairns CA, White RJ. p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *EMBO J* 1998; 17:3112-23.
103. Morton JP, Kantidakis T, White RJ. RNA polymerase III transcription is repressed in response to the tumour suppressor ARF. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:3046-52.
104. Woivode A, Johnson SA, Zhong S, Zhang C, Roeder RG, Teichmann M, et al. PTEN represses RNA polymerase III-dependent transcription by targeting the TFIIB complex. *Mol Cell Biol* 2008; 28:4204-14.
105. Veras I, Rosen EM, Schramm L. Inhibition of RNA polymerase III transcription by BRCA1. *J Mol Biol* 2009; 387:523-31.
106. Larmine CG, Cairns CA, Mital R, Martin K, Kouzarides T, Jackson SP, White RJ. Mechanistic analysis of RNA polymerase III regulation by the retinoblastoma protein. *EMBO J* 1997; 16:2061-71.
107. Hirsch HA, Jawdekar GW, Lee KA, Gu L, Henry RW. Distinct mechanisms for repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 2004; 24:5989-99.
108. Eichhorn K, Jackson SP. A role for TAF3B2 in the repression of human RNA polymerase III transcription in nonproliferating cells. *J Biol Chem* 2001; 276:21158-65.
109. Sutcliffe JE, Cairns CA, McLees A, Allison SJ, Tosh K, White RJ. RNA polymerase III transcription factor IIIB is a target for repression by pocket proteins p107 and p130. *Mol Cell Biol* 1999; 19:4255-61.
110. White RJ. RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:69-78.
111. Gottesfeld JM, Wolf VJ, Dang T, Forbes DJ, Hartl P. Mitotic repression of RNA polymerase III transcription in vitro mediated by phosphorylation of a TFIIB component. *Science* 1994; 263:81-4.
112. Leresche A, Wolf VJ, Gottesfeld JM. Repression of RNA polymerase II and III transcription during M phase of the cell cycle. *Exp Cell Res* 1996; 229:282-8.
113. White RJ, Gottlieb TM, Downes CS, Jackson SP. Mitotic regulation of a TATA-binding-protein-containing complex. *Mol Cell Biol* 1995; 15:1983-92.
114. Fairley JA, Scott PH, White RJ. TFIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo. *EMBO J* 2003; 22:5841-50.
115. Hu P, Samudre K, Wu S, Sun Y, Hernandez N. CK2 phosphorylation of Bdp1 executes cell cycle-specific RNA polymerase III transcription repression. *Mol Cell* 2004; 16:81-92.
116. Hu P, Wu S, Hernandez N. A minimal RNA polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK2. *Mol Cell* 2003; 12:699-709.
117. Ghavidel A, Hockman DJ, Schultz MC. A review of progress towards elucidating the role of protein kinase CK2 in polymerase III transcription: regulation of the TATA binding protein. *Mol Cell Biochem* 1999; 191:143-8.
118. Ghavidel A, Schultz MC. TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. *Cell* 2001; 106:575-84.
119. Dephousse N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:10762-7.



120. Gu L, Husain-Ponnampalam R, Hoffmann-Benning S, Henry RW. The protein kinase CK2 phosphorylates SNAP190 to negatively regulate SNAPC DNA binding and human U6 transcription by RNA polymerase III. *J Biol Chem* 2007; 282:27887-96.
121. Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman RN, White RJ. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 2003; 421:290-4.
122. Felton-Edkins ZA, Fairley JA, Graham EL, Johnston IM, White RJ, Scott PH. The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIIB. *EMBO J* 2003; 22:2422-32.
123. Zhong S, Johnson DL. The JNKs differentially regulate RNA polymerase III transcription by coordinately modulating the expression of all TFIIIB subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:12682-7.
124. Kenneth NS, Ramsbottom BA, Gomez-Roman N, Marshall L, Cole PA, White RJ. TRRAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:14917-22.
125. Dai MS, Sun XX, Lu H. Ribosomal protein L11 associates with c-Myc at 5 S rRNA and tRNA genes and regulates their expression. *J Biol Chem* 2010; 285:12587-94.
126. Steiger D, Furrer M, Schwinkendorf D, Gallant P. Max-independent functions of Myc in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 2008; 40:1084-91.
127. Greasley PJ, Bonnard C, Amati B. Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:446-53.
128. Ittmann M, Greco A, Basilico C. Isolation of the human gene that complements a temperature-sensitive cell cycle mutation in BHK cells. *Mol Cell Biol* 1987; 7:3386-93.
129. Ittmann M, Ali J, Greco A, Basilico C. The gene complementing a temperature-sensitive cell cycle mutant of BHK cells is the human homologue of the yeast RPC53 gene, which encodes a subunit of RNA polymerase C (III). *Cell Growth Differ* 1993; 4:503-11.
130. Mann C, Micouin JY, Chiannilkulchai N, Treich I, Buhler JM, Sentenac A. RPC53 encodes a subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase C (III) whose inactivation leads to a predominantly G<sub>1</sub> arrest. *Mol Cell Biol* 1992; 12:4314-26.
131. Winter AG, Sourvinos G, Allison SJ, Tosh K, Scott PH, Spandidos DA, White RJ. RNA polymerase III transcription factor TFIIIC2 is overexpressed in ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12619-24.
132. Marshall L, Kenneth NS, White RJ. Elevated tRNA(iMet) synthesis can drive cell proliferation and oncogenic transformation. *Cell* 2008; 133:78-89.
133. Johnson SA, Dubeau L, Johnson DL. Enhanced RNA polymerase III-dependent transcription is required for oncogenic transformation. *J Biol Chem* 2008; 283:19184-91.
134. Hinault C, Hu J, Maier BF, Mirmira RG, Kulkarni RN. Differential expression of cell cycle proteins during ageing of pancreatic islet cells. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10:136-46.
135. Bouwens L, Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev* 2005; 85:1255-70.
136. Atanasoski S, Notterpek L, Lee HY, Castagner F, Young P, Ehrenguber MU, et al. The protooncogene Ski controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron* 2004; 43:499-511.
137. Goodfellow SJ, Innes F, Derblay LE, MacLellan WR, Scott PH, White RJ. Regulation of RNA polymerase III transcription during hypertrophic growth. *EMBO J* 2006; 25:1522-33.
138. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 2009; 8:3822-30.
139. White RJ, Stott D, Rigby PW. Regulation of RNA polymerase III transcription in response to F9 embryonal carcinoma stem cell differentiation. *Cell* 1989; 59:1081-92.
140. Meissner W, Thome R, Seifart KH. The activity of transcription factor IIIC1 is impaired during differentiation of F9 cells. *J Biol Chem* 2002; 277:7148-56.
141. Alzuherri HM, White RJ. Regulation of a TATA-binding protein-associated factor during cellular differentiation. *J Biol Chem* 1998; 273:17166-71.
142. Athineos D, Marshall L, White RJ. Regulation of TFIIIB during F9 cell differentiation. *BMC Mol Biol* 2010; 11:21.
143. Meissner W, Ahlers A, Seifart KH. The activity of transcription factor PBP, which binds to the proximal sequence element of mammalian U6 genes, is regulated during differentiation of F9 cells. *Mol Cell Biol* 1995; 15:5888-97.
144. Weser S, Gruber C, Hafner HM, Teichmann M, Roeder RG, Seifart KH, et al. Transcription factor (TF)-like nuclear regulator, the 250 kDa form of *Homo sapiens* TFIIIB", is an essential component of human TFIIIC1 activity. *J Biol Chem* 2004; 279:27022-9.
145. Dean N, Berk AJ. Separation of TFIIIC into two functional components by sequence specific DNA affinity chromatography. *Nucleic Acids Res* 1987; 15:9895-907.
146. Yoshinaga SK, Boulanger PA, Berk AJ. Resolution of human transcription factor TFIIIC into two functional components. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:3585-9.
147. Oettel S, Härtel F, Kober I, Iben S, Seifart KH. Human transcription factors IIIC2, IIIC1 and a novel component IIIC0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:2440-7.
148. Yee NS, Gong W, Huang Y, Lorent K, Dolan AC, Maraia RJ, Pack M. Mutation of RNA Pol III subunit rpc2/polr3b Leads to Deficiency of Subunit Rpc11 and disrupts zebrafish digestive development. *PLoS Biol* 2007; 5:312.
149. Dittmar KA, Goodenbour JM, Pan T. Tissue-specific differences in human transfer RNA expression. *PLoS Genet* 2006; 2:221.
150. Barski A, Chepelev I, Liko D, Cuddapah S, Fleming AB, Birch J, et al. Pol II and its associated epigenetic marks are present at Pol III-transcribed noncoding RNA genes. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17:629-34.
151. Canella D, Praz V, Reina JH, Cousin P, Hernandez N. Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells. *Genome Res* 2010; 20:710-21.
152. Moqtaderi Z, Wang J, Raha D, White RJ, Snyder M, Weng Z, Struhl K. Genomic binding profiles of functionally distinct RNA polymerase III transcription complexes in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17:635-40.
153. Oler AJ, Alla RK, Roberts DN, Wong A, Hollenhorst PC, Chandler KJ, et al. Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17:620-8.
154. Raha D, Wang Z, Moqtaderi Z, Wu L, Zhong G, Gerstein M, et al. Close association of RNA polymerase II and many transcription factors with Pol III genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:3639-44.
155. Tiedge H, Chen W, Brosius J. Primary structure, neural-specific expression and dendritic location of human BC200 RNA. *J Neurosci* 1993; 13:2382-90.
156. Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 2008; 22:3172-83.
157. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13:1097-101.
158. Noma K, Cam HP, Maraia RJ, Grewal SI. A role for TFIIIC transcription factor complex in genome organization. *Cell* 2006; 125:859-72.
159. Mertens C, Roeder RG. Different functional modes of p300 in activation of RNA polymerase III transcription from chromatin templates. *Mol Cell Biol* 2008; 28:5764-76.
160. Dubey RN, Gartenberg MR. A tDNA establishes cohesion of a neighboring silent chromatin domain. *Genes Dev* 2007; 21:2150-60.
161. Kalkhoven E. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* 2004; 68:1145-55.
162. Haeusler RA, Engelke DR. Genome organization in three dimensions: thinking outside the line. *Cell Cycle* 2004; 3:273-5.
163. Haeusler RA, Pratt-Hyatt M, Good PD, Gipson TA, Engelke DR. Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes. *Genes Dev* 2008; 22:2204-14.
164. Pollock C, Huang S. The perinucleolar compartment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:000679.