

Université de Montréal

**Sur la régulation transcriptionnelle du gène de la pro-  
opiomélanocortine par l'hormone hypothalamique CRH**

par

Mario Hernan Maira

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Biochimie

Décembre 2003

© Mario Hernan Maira, 2003



W  
4  
U58  
2004  
v. 014

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Sur la régulation transcriptionnelle du gène de la pro-opiomélanocortine par  
l'hormone hypothalamique CRH**

présentée par :  
Mario Hernan Maira

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Michel Bouvier, président-rapporteur  
Dr. Jacques Drouin, directeur de recherche  
Dr. Muriel Aubry, membre du jury  
Dr. Maria Grazia Catelli, examinateur externe  
Dr. Michel Bouvier, représentant du doyen



## Résumé

L'expression du gène de la pro-opiomélanocortine (POMC) caractérise deux types de cellules hypophysaires; les mélanotropes de l'hypophyse intermédiaire et les corticotropes de l'hypophyse antérieure. Au niveau de ces dernières, la transcription de POMC est assujettie à un étroit contrôle multihormonal qui assure une réponse adéquate au stress. En effet, l'expression de POMC est activée par de l'hormone hypothalamique CRH et elle est réprimée par les glucocorticoïdes qui exercent ainsi une rétroaction négative sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

Les études du promoteur de POMC ont identifié une séquence, nommée NurRE, capable de médier l'activation transcriptionnelle en réponse au CRH. Le NurRE est une cible pour des homodimères du facteur de transcription NGFI-B, un membre orphelin de la superfamille des récepteurs nucléaires, qui est également capable d'activer la transcription sous forme de monomère via un élément nommé NBRE. Nurr1 et NOR-1 sont des facteurs apparentés à NGFI-B et ces trois récepteurs forment la famille Nur. Le NurRE s'est avéré une cible beaucoup plus sensible que le NBRE aux facteurs Nur, Nurr1 et NOR-1 activant toutefois moins que NGFI-B, ce qui corrèle avec leurs capacités moindres à former des homodimères sur le NurRE. J'ai également démontré que les facteurs Nur forment des hétérodimères qui activent la transcription du NurRE plus fortement que les homodimères des facteurs correspondants.

J'ai ensuite démontré que le CRH rehausse l'activité transcriptionnelle de NGFI-B par un mécanisme médié par la voie de l'AMPC/Protéine Kinase A (PKA). Cette voie induit rapidement et de manière transitoire la liaison de NGFI-B sur le NurRE mais non sur le NBRE. Cette spécificité est également observée au niveau transcriptionnel puisque PKA rehausse l'activité des dimères de NGFI-B sur le NurRE mais non celle des monomères sur le NBRE. De plus, j'ai pu démontrer que les coactivateurs transcriptionnels de la famille p160/SRC, notamment SRC-2, sont spécifiquement recrutés par les dimères de NGFI-B sur le NurRE et que ce recrutement est rehaussé par le CRH.

Le facteur à boîte T Tpit est principalement connu pour son rôle essentiel dans la différenciation des corticotropes. J'ai démontré que l'activité transcriptionnelle de Tpit est rehaussée par la voie PKA et par le recrutement du coactivateur SRC-2. De plus, j'ai

montré que l'élément de réponse à Tpit sur le promoteur de POMC confère une réponse au CRH et que cette réponse, de même que celle du promoteur POMC et du NurRE, requiert l'activation de la voie MAPK qui est en aval de PKA. Finalement, j'ai également démontré que NGFI-B et Tpit activent la transcription de manière synergique.

Mes études soulignent l'importance des dimères (homo- ou hétérodimères) de facteurs Nur dans la régulation transcriptionnelle du gène POMC. De plus, elles identifient les facteurs NGFI-B et Tpit en tant qu'effecteurs transcriptionnels des voies PKA et MAPK élicitées par le CRH. Mes résultats suggèrent que Tpit, NGFI-B et SRC-2 font partie d'un large complexe régulateur assemblé au promoteur en réponse à la stimulation des corticotropes par le CRH.

**Mots-clés :** Pro-opiomélanocortine, CRH, transcription, récepteur nucléaire, NGFI-B, PKA, coactivateur, SRC-2, Tpit

## Abstract

Expression of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene characterizes two cell types in the pituitary; the melanotrophs present in the intermediary lobe and the corticotrophs of the anterior pituitary. In the later cell type, POMC transcription is under a tight multihormonal regulation which is essential for the maintenance of homeostasis and proper response to stress. Indeed, POMC expression is activated by the hypothalamic hormone CRH and is repressed by the glucocorticoids who thus exert a negative feedback loop on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

Studies of the POMC promoter have identified a sequence, named the NurRE, which is able to mediate the transcriptional response to CRH. The NurRE is a target for homodimers of the transcription factor NGFI-B, an orphan member of the nuclear receptor superfamily, who is also able to activate transcription acting as a monomer on a sequence named NBRE. Nurr1 and NOR-1 are proteins related to NGFI-B and together these three factors form the Nur family. My studies showed that the NurRE is much more responsive than the NBRE to Nur factors. Nurr1 and NOR-1 were shown to be less potent activators than NGFI-B, which correlates with their lessened ability to form homodimers on the NurRE. I also demonstrated that Nur factors are able to physically interact, and these heterodimers synergistically enhance transcription from NurRE reporters in comparison to that seen with homodimers of the same factors.

I then showed that CRH signals enhance the transcriptional activity of NGFI-B by a mechanism involving the cAMP/Protein Kinase A (PKA) pathway. CRH rapidly and transiently increases DNA binding ability of NGFI-B dimers but not monomers. Accordingly, PKA specifically enhances the transcriptional activity of NGFI-B on the NurRE, but not on the NBRE. Moreover, I demonstrated that coactivators of the p160/SRC family, and especially SRC-2, are specifically recruited by NGFI-B dimers and that this recruitment is enhanced in response to CRH.

The T-box factor Tpit is known for its essential role in corticotroph differentiation. I showed that the transcriptional activity of Tpit is potentiated by the PKA pathway and by SRC-2 recruitment. I also showed that the Tpit response element in the POMC promoter confers responsiveness to CRH and that this response, as well as the one from the POMC promoter and the NurRE, requires the activation of the MAPK pathway which is

downstream of PKA. Finally, I demonstrated that NGFI-B and Tpit cooperate to synergistically activate transcription.

Taken together, my studies highlight the relevance of Nur dimers (homo- and heterodimers) in the regulation of POMC gene transcription. Moreover, they identify NGFI-B and Tpit as transcriptional effectors of the PKA and MAPK pathways elicited by CRH. My results suggest that Tpit, NGFI-B and SRC-2 are part of a large regulatory complex assembled on the POMC promoter in response to CRH stimulation.

**Keywords** : Pro-opiomelanocortin, CRH, transcription, nuclear receptor, NGFI-B, PKA, coactivator, SRC-2, Tpit

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xviii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION .....	1
1.1 Le système corticotrope hypophysaire.....	1
1.1.1 L'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien.....	1
1.1.2 L'hypophyse .....	3
1.1.2.1 Structure anatomique et types cellulaires .....	3
1.1.2.2 Les hormones hypophysaires .....	5
1.1.2.2.1 Le lobe antérieur.....	5
1.1.2.2.2 Le lobe intermédiaire .....	7
1.1.2.2.3 Le lobe postérieur .....	7
1.1.2.3 Développement et différenciation hypophysaire .....	8
1.1.2.3.1 Origine embryonnaire de l'hypophyse.....	8
1.1.2.3.2 Ontogénie des corticotropes et autres types cellulaires..	10
1.1.2.3.3 Facteurs régulant le développement hypophysaire.....	10
1.1.3 De la Pro-opiomélanocortine à l'ACTH.....	16
1.1.3.1 Le gène et les transcrits POMC .....	16
1.1.3.2 POMC et peptides dérivés.....	19
1.1.3.3 Distribution tissulaire de POMC et peptides dérivés.....	22
1.1.3.4 La régulation de l'expression de l'ACTH dans les corticotropes.....	23
1.1.3.4.1 Les facteurs stimulant la sécrétion d'ACTH.....	23
1.1.3.4.2 Les facteurs inhibant la sécrétion d'ACTH.....	25
1.2 Mécanismes de transcription basale et histo-spécifique de POMC.....	26
1.2.1 Le promoteur du gène POMC.....	26
1.2.2 Facteurs régulant la transcription de base de POMC.....	29
1.2.3 Facteurs régulant la spécificité tissulaire de POMC.....	33
1.2.3.1 Le facteur bHLH NeuroD1.....	33
1.2.3.2 Les homéoprotéines Pitx.....	35
1.2.3.3 Le facteur à boîte T Tpit.....	38
1.2.3.3.1 Les facteurs de transcription à boîte T.....	39

1.2.3.3.2	Rôles physiologiques de Tpit.....	41
1.2.3.3.3	Mécanismes d'action de Tpit.....	41
1.3	Facteurs régulant la transcription hormono-dépendante de POMC.....	44
1.3.1	Les récepteurs nucléaires.....	44
1.3.1.1	Structure générale des récepteurs nucléaires.....	44
1.3.1.2	Les différentes sous-familles de récepteurs nucléaires.....	46
1.3.1.2.1	Les récepteurs des hormones stéroïdiennes.....	46
1.3.1.2.2	Les récepteurs formant des hétérodimères avec RXR .....	49
1.3.1.2.3	Les récepteurs nucléaires orphelins.....	50
1.3.1.3	Mécanismes d'action et régulation de l'activité des NRs.....	53
1.3.1.3.1	La liaison de ligands.....	54
1.3.1.3.2	Les modifications covalentes.....	56
1.3.1.3.3	Les interactions protéines-protéines .....	59
1.3.2	Les récepteurs nucléaires orphelins de la sous-famille Nur.....	60
1.3.2.1	Patrons d'expression et rôles physiologiques des facteurs Nur.....	60
1.3.2.2	Mécanismes d'action des facteurs Nur.....	63
1.3.2.2.1	Liaison à l'ADN des facteurs Nur.....	64
1.3.2.2.2	Modulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur.....	65
1.3.3	Les cofacteurs transcriptionnels.....	67
1.3.3.1	Les coactivateurs transcriptionnels.....	68
1.3.3.1.1	Les cofacteurs CBP/p300.....	69
1.3.3.1.2	La famille SRC/p160.....	70
1.3.3.2	Les corépresseurs transcriptionnels.....	72
1.3.3.3	La régulation des régulateurs.....	72
1.4	Mécanismes de la régulation hormonale de la transcription de POMC.....	74
1.4.1	Régulation négative par les glucocorticoïdes.....	75
1.4.2	Régulation positive par le LIF.....	76
1.4.3	Régulation positive par le CRH.....	77
1.4.3.1	Les voies de signalisation induites par le CRH.....	78
1.4.3.2	Éléments et facteurs médiant la réponse au CRH.....	79
1.5	Hypothèses et objectifs de travail .....	82
<b>CHAPITRE 2.....</b>		<b>85</b>
2.1	Résumé du chapitre.....	86
2.2	ABSTRACT.....	87
2.3	INTRODUCTION.....	88

2.4 MATERIALS AND METHODS.....	90
2.4.1 Plasmids and oligonucléotides.....	90
2.4.2 Cell culture and transfections.....	91
2.4.3 Electrophoretic migration shift assays (EMSA).....	91
2.4.4 Recombinant proteins production and pull-down assays.....	92
2.4.5 AtT-20 nuclear extracts and co-immunoprecipitations.....	92
2.4.6 Northern blots.....	93
2.5 RESULTS.....	93
2.5.1 CRH induces all three Nur factors.....	93
2.5.2 The POMC NurRE is highly responsive to all Nur factors.....	93
2.5.3 Nurr1 and NOR-1 bind the NurRE as homodimers.....	96
2.5.4 The NurRE <sub>POMC</sub> is preferentially bound and activated by Nur77 homodimers .....	96
2.5.5 Nur dimers exhibit transcriptional synergy on NurRE <sub>POMC</sub> target.....	98
2.5.6 Heterodimerization between Nur77 and Nurr1.....	101
2.6 DISCUSSION.....	103
2.7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	106
 <b>CHAPITRE 3.....</b>	 107
3.1 Résumé du chapitre.....	108
3.2 ABSTRACT.....	109
3.3 INTRODUCTION.....	110
3.4 RESULTS.....	114
3.4.1 The CRH/cAMP/PKA pathway strongly enhances NurRE-dependent activity .....	114
3.4.2 The CRH/cAMP/PKA pathway transiently enhances NGFI-B binding to the NurRE.....	116
3.4.3 PKA specifically potentiates NurRE-dependent NGFI-B transcriptional activity.....	118
3.4.4 NurRE- (but not NBRE-) dependent transcription is enhanced by SRCs..	120
3.4.5 The N-terminus of both Nurr1 and NGFI-B mediates PKA potentiation and coactivator recruitment.....	122

3.5 DISCUSSION.....	128
3.6 MATERIALS AND METHODS.....	134
3.6.1 Plasmids and oligonucleotides.....	134
3.6.2 Cell culture and transfections.....	134
3.6.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	135
3.6.4 Preparation of AtT-20 extracts.....	135
3.6.5 Biotinylated-DNA affinity precipitation assay.....	135
3.6.6 Western Blotting.....	136
3.7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	137
<b>CHAPITRE 4.....</b>	<b>138</b>
4.1 Résumé du chapitre.....	139
4.2 Summary.....	140
4.3 INTRODUCTION.....	141
4.4 EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	143
4.4.1 Plasmids and oligonucléotides.....	143
4.4.2 Cell culture and transfections.....	144
4.4.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....	144
4.4.4 Preparation of nuclear extracts.....	145
4.4.5 Western Blotting.....	145
4.4.6 Pull-down assays.....	145
4.4.7 Co-immunoprecipitation assays.....	145
4.5 RESULTS.....	147
4.5.1 SRCs as coactivators of Tpit.....	147
4.5.2 Tpit as a target for signalling pathways .....	149
4.5.3 Tpit as a downstream effector of a PKA and MAPK pathways.....	151
4.5.4 Requirements for PKA enhancement of Tpit activity.....	153
4.5.5 Tpit and NGFI-B synergism in presence of PKA and SRC-2.....	155
4.6 DISCUSSION.....	158
4.7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	163
<b>CHAPITRE 5: Discussion et Perspectives.....</b>	<b>164</b>
5.1 Sur la pertinence biologique des dimères de facteurs Nur.....	164



5.2 Sur la pertinence biologique du NurRE .....	167
5.3 Sur les mécanismes de la régulation transcriptionnelle de POMC par NGFI-B.....	171
5.4 Sur les mécanismes de la régulation transcriptionnelle de POMC par Tpit .....	175
5.5 Sur la réponse du gène POMC au CRH et la recherche de l'Élément.....	178
5.6 Sur la quête de l'Élément de réponse.....	179
5.7 Conclusions et perspectives générales.....	181
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>184</b>

## Liste des figures

Figure 1.1.....	21
Figure 1.2.....	32
Figure 1.3.....	48
Figure 2.1.....	94
Figure 2.2.....	95
Figure 2.3.....	97
Figure 2.4.....	99
Figure 2.5.....	100
Figure 2.6.....	102
Figure 3.1.....	115
Figure 3.2.....	117
Figure 3.3.....	119
Figure 3.4.....	121
Figure 3.5.....	123
Figure 3.6.....	125
Figure 3.7.....	127
Figure 3.8.....	133
Figure 4.1.....	148
Figure 4.2.....	150
Figure 4.3.....	152
Figure 4.4.....	154
Figure 4.5.....	157
Figure 4.6.....	162

## Liste des abréviations

6-MP: 6-mercaptopurine

9cRA: acide 9cis-rétinoïque

$\alpha$ -GSU: Glycoprotein Subunit  $\alpha$

aa: acide aminé

ACTH: adrenal cortical-stimulating hormone (corticotropine)

AD: activation domain

AF-1: activation function 1

AF-2: activation function 2

AngII: angiotensine II

AMPC: adénosine monophosphate cyclique

ANF: atrial natriuretic factor

AP-1: Activator Protein 1

AR: récepteur des androgènes

ASC-2: Activating Signal Cointegrator-2

AVP: vasopressine

bHLH: basic helix-loop-helix

BMP: bone morphogenic protein

BNP: Natriuretic Peptide-B

BPA: Bisphenol A

C-: carboxy

CamKII/IV: calcium/calmodulin-dependent kinase II/IV

CAR: Constitutive Active Receptor

CARM-1: Co-Activator-Associated Arginine Methyltransferase

CASK: Calcium/calmodulin-dependent Serine protein Kinase

CBP: cAMP-Response Element Binding protein- Binding Protein

CCK-8: cholecystokinin-octopeptide

CDK: cyclin dependent kinase

CE: central element

ChIP: immunoprécipitation de la chromatine

CLIP: corticotropin (cortotropin)-like intermediate lobe protein

CNP: Natriuretic Peptide-C

CNS: système nerveux central

COUP-TF: Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor

CREB: cAMP-Response Element Binding protein

CRH: corticotropin releasing hormone

CRH-R1: récepteur au CRH

CTE: extension C-terminale

CUTE: corticotroph upstream transcription element-binding

CsA : Cyclosporine A

DBD: DNA binding domain

DE: distal element  
 DHEA: dehydroepiandrosterone  
 DHR38: Drosophila Hormone Receptor 38  
 DRs: direct repeats

e: jour embryonnaire  
 E6-AP: E6-associated protein  
 EcR: récepteur à l'ecdysone  
 EGF: epidermal growth factor  
 Egr-1: Early growth response gene-1  
 END: endorphine  
 ER: everted repeats  
 ER: récepteur aux oestrogènes  
 ERR: Estrogen Receptor-Related  
 Erk1/2: Extracellular signal-regulated kinase

FGF: fibroblast growth factor  
 FRAP: recouvrement de fluorescence après photoblanchiment  
 FS: cellules folliculo-stellate  
 FSH: follitropine (follicle-stimulating hormone)  
 FXR: Farnesoid X Receptor

GABA: acide gamma amino-butyrique  
 Gc: glucocorticoïdes  
 GFAP: glial fibrillary acidic protein  
 GH: growth hormone (hormone de croissance)  
 GHIH: hormone somatostatine  
 GHRH: growth hormone releasing hormone  
 GMPc: guanosine monophosphate cyclique  
 GnRH: gonadotropin-releasing hormone  
 GnRH-R: gonadotropin-releasing hormone-Receptor  
 GR: récepteur des glucocorticoïdes  
 GRE: Glucocorticoid Receptor Element

HAT: histone acétyltransférase  
 HDAC: histone déacétylase  
 Hip: hedgehog inhibitory factor  
 HMT: histone méthyltransférase  
 HNF-4: Hepatic Nuclear Factor-4  
 HPA (axe): axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien  
 HRE: hormone response element  
 hsp90: heat shock protein 90kD

IGF: insulin-like growth hormone  
 IL-6: interleukine 6  
 INF: interferon

IP3: inositol 3,4,5 triphosphate  
 IRs: inverted repeats  
 Isl: Islet 1

JNK (SAPK): Janus N-terminal Kinase (Stress-Activated Protein Kinase)  
 JP: joining peptide

kb: kilobases

Lys: lysine  
 LBD: ligand binding domain  
 LCR: région de contrôle de locus  
 LH: lutropine (luteinizing hormone)  
 Lhx: LIM homeobox  
 LIF: leukemia inhibitory factor  
 LXR: Liver X Receptor

MAPK: mitogen activated protein kinase  
 MC-R: Melanocortin-Receptor  
 MEF2c: Myogenic Enhancing Factor-2c  
 MIS: Mullerian-Inhibiting Substance  
 MMTV: mouse mammary tumor virus  
 MOZ: monocytic leukemia zinc finger  
 MR: récepteur des minéralocorticoïdes  
 MSH: melanocyte-stimulating hormone

N-: amino  
 NBRE: NGFI-B Response Element  
 N-CoR: Nuclear receptor Co-Repressor  
 néo: néomycine  
 NGF: Nerve Growth Factor  
 NGFI-B: Nerve Growth Factor Inducible-clone B  
 nGRE: negative Glucocorticoid Receptor Element  
 NID: nuclear receptor interacting domain  
 NLS: nuclear localisation signal  
 NOR-1: Neuron-derived orphan receptor  
 nt: nucléotide  
 NURD: NUCleosome Remodeling and histone Deacetylation  
 Nurr1: Nur-related factor  
 NurRE: Nur Response Element  
 NurRE<sub>CON</sub>: Nur Response Element consensus  
 NurRE<sub>POMC</sub>: Nur Response Element du gène POMC

omb: optomotor-blind  
 OT: ocytocine

PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide  
Pax: paired-box  
PC: prohormone convertase  
p/CAF: p300/CBP associated protein  
p/CIP: p300/CBP Interacting Protein  
PCR: polymerase chain reaction  
PE: proximal element  
PGC-1: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Coactivator-1  
Ph-CLIP: phospho-CLIP  
PHD: plant homeodomain  
PIH: prolactin inhibitory hormone  
Pitx1: pituitary homeobox 1  
PKA: protéine kinase A  
PKC: protéine kinase C  
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate  
POMC: pro-opiomélanocortine  
PP1: putative pituitary POMC 1  
PR: récepteur de la progestérone  
PPAR: proliferating peroxisome activating receptor  
PRL: prolactine  
PRMT-1: protein arginine methyltransferase-1  
Prop-1: Prophet of Pit-1  
PVN: noyau paraventriculaire  
PXR: Pregnane X Receptor

Q: acide glutamique

RAR: récepteur à l'acide rétinoïque tout-trans  
RE: response element  
RID: Receptor Interacting Domain  
Rpx: Rathke's pouch homeobox  
RXR: récepteur de l'acide 9cis-rétinoïque

Sér316 : sérine 316  
SF-1: steroidogenic factor 1  
Shh: sonic hedgehog  
SHP: Short Heterodimerization Partner  
SHRs: récepteurs des hormones stéroïdiennes  
SMAD: Sma/Mothers Against Decapentaplegic  
SMRT: Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors  
SRA: Steroid receptor RNA activator  
SRC: steroid receptor coactivator  
SUMO-1: small ubiquitin-like modifier  
SV40: Simian Virus-40kD

T: tail  
Tbr1: T-brain-1  
Tbx: T-box factor  
TCR: récepteur des cellules T  
TK: tyrosine kinase  
TLE: Transducin-like Enhancer of split  
Tpit/Pitx-RE: Tpit/Pitx response element  
TR: récepteur de l'hormone thyroïdienne  
TRAP/DRIP: Thyroid Receptor Associated Proteins/ vitamine D Receptor Interacting Proteins  
TRH: thyrotropin releasing hormone  
TSH: thyrotropine (thyroid-stimulating hormone)

USP:ultraspiracle

VDR: récepteur de la vitamine D  
VIP: vasoactive intestinal peptide

## Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de thèse, Jacques Drouin, pour son excellent appui qu'il m'a donné tout au long de mes longues études. Jacques m'a accueilli dans son labo malgré mon dossier académique en dents de scie (vous savez, à cause de mon père...) et j'espère ne pas l'avoir à jamais découragé des étudiants chiliens. Malgré son âge, Jacques garde une passion pour la science qui est inspirante pour les jeunes comme moi...

Je voudrais aussi remercier Mona Nemer, notre collaboratrice des premiers jours, ainsi que les membres de son laboratoire. La peur de me faire 'Nemeriser' au cours de mes premières présentations de laboratoire m'a sûrement motivé à parfaire plus que d'habitude ma préparation.

La liste des gens qui ont rendu mon séjour dans ce laboratoire si agréable serait bien trop longue à dresser. Je tiens toutefois à mentionner quelques noms qui ont été particulièrement importants. D'abord les camarades du début, soit Gino Poulin et Christian Lanctôt, avec qui les discussions pouvaient devenir dangereusement lumineuses, sans que j'y sois pour quoique ce soit. D'autres aussi comme Bruno Delorme, Pepinj van den Munckoff, Gwendal le Martelot et Romain Georges qui furent d'excellents camarades. Ces dernières années ont été particulièrement agréables, grâce notamment à la présence de Christine Martens, Steve Bilodeau, Anne-Marie Pulichino, Maria Nudi, Sophie Valette ainsi que les membres du ghetto français. L'ambiance du laboratoire était pour la plupart du temps géniale et j'en garderai un souvenir impérissable.

Je veux surtout remercier très particulièrement Catherine Couture, qui a été au cours de ces dernières années une collaboratrice hors paire et une amie proche. Son aide précieuse notamment au cours de la rédaction de ce manuscrit fut inestimable et je n'aurai assez d'une vie pour l'en remercier.

Enfin, mes proches, ma sœur Carmen Célinda, mes parents Carmen y Hernán que amo tanto, et ma tendre épouse enfin que j'aime tant et qui m'a toujours supporté, durant les beaux jours comme durant la tempête. Je veux remercier tous ces gens donc, à qui je dois tout et sans qui je ne suis rien.



*À tous ceux que j'aime, vous vous reconnaissez...*

## **CHAPITRE 1: INTRODUCTION**

### **1.1 Le système corticotrope hypophysaire**

La pro-opiomélanocortine (POMC) est le précurseur de l'hormone ACTH, produite par les cellules corticotropes de l'hypophyse. L'expression du gène POMC en réponse à l'hormone hypothalamique CRH, constitue l'étape centrale de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA). Afin de bien situer mes travaux dans leurs contextes physiologiques, je me propose de faire dans un premier temps un survol de l'axe HPA, pour ensuite me pencher sur l'hypophyse et sur la régulation de l'expression de POMC et de l'ACTH par le système corticotrope hypophysaire.

#### **1.1.1 L'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien**

Bien que le rôle fondamental de l'hypophyse dans le contrôle de l'activité des glandes surrénales, thyroïdiennes et gonades soit depuis longtemps reconnu, ce n'est qu'au cours des années 1950 que Geoffrey Harris émit "l'hypothèse neurovasculaire", postulant que le système nerveux central régule la sécrétion des hormones de l'hypophyse grâce au système porte hypophysaire, le réseau vasculaire qui relie l'éminence médiane de l'hypothalamus à l'hypophyse. Ainsi naissait donc le concept d'axe neuroendocrinien, dont l'axe HPA est l'archétype. L'axe HPA est essentiel au maintien de l'homéostasie adulte, notamment en médiant la réponse physiologique au stress. Ainsi, l'activation du système par diverses sources de stress mène rapidement à une augmentation des niveaux de glucocorticoïdes (Gc) sanguins, qui régulent une série d'événements métaboliques visant à contrer les effets négatifs du stress et à rétablir les conditions initiales.

Au sommet de cet axe trône l'hypothalamus, organe siégeant à la base du cerveau, au niveau du diencéphale, juste en dessous du thalamus. La majorité des neurones sécrétant l'hormone CRH ont leurs corps cellulaires dans une région circonscrite de l'hypothalamus, le noyau paraventriculaire (PVN), dont les neurones neurosécréteurs composent le système parvocellulaire de l'hypothalamus. Par ses connections nerveuses concourent sur le PVN des informations de diverses sources du système nerveux; ainsi la douleur causée par un stress physique ou une lésion est acheminée au PVN via le tronc cérébral, tandis que le stress émotionnel résulte d'une activité accrue au niveau du

système limbique, notamment de l'hippocampe. Ces neurones du PVN ont des projections nerveuses qui convergent au niveau de l'éminence médiane de l'hypothalamus pour former le canal tubéroinfundibulaire. C'est à ce niveau que sont déversés les facteurs hypophysiotropiques, tel que le CRH, dans le plexus capillaire primaire du système porte hypothalamo-hypophysaire.

Au niveau de l'hypophyse antérieure, seules les cellules corticotropes expriment le récepteur au CRH (soit le CRH-R1), un récepteur couplé aux protéines  $G_s$  qui stimule la transcription du gène POMC ainsi que la sécrétion de l'hormone ACTH, produit de la maturation protéolytique de POMC. Ces étapes seront discutées en détail plus loin. L'ACTH est sécrétée directement dans les vaisseaux efférents de l'hypophyse pour atteindre ensuite la circulation systémique.

L'ACTH est indispensable pour la biosynthèse et la sécrétion des Gc (principalement cortisol chez l'humain et corticostérone chez la souris et le rat) par les cellules de la zona fasciculata et de la zona reticularis du cortex surrénalien. L'ACTH, dont le récepteur est couplé aux protéines  $G_s$ , stimule l'adénylyl cyclase et entraîne donc une augmentation rapide de la concentration d'AMPc et l'activation subséquente de PKA. Ceci résulte en l'activation des enzymes essentielles à la stéroïdogénèse, notamment celles du complexe p450ssc, responsables de la conversion du cholestérol en pregnélonole, soit l'étape limitante de la voie de biosynthèse des Gc. Parmi les nombreux rôles des Gc, il faut mettre en exergue la stimulation de la gluconéogenèse et l'augmentation de la concentration de glucose sanguin, la mobilisation des protéines et des acides gras cellulaires, de même qu'une importante activité anti-inflammatoire (due à une stabilisation des lysosomes) et un effet immunosuppresseur. Les Gc exercent aussi une boucle de rétroaction négative afin de ramener les niveaux de Gc vers la normale, et ce en inhibant la sécrétion d'ACTH et la transcription de POMC au niveau de l'hypophyse de même que la production et la relâche de CRH dans l'hypothalamus.

Enfin, notons que le dérèglement de l'axe HPA entraîne chez l'humain des conditions pathologiques qui non-traitées peuvent s'avérer fatales. La suppression de la fonction corticosurrénalienne, due à une atrophie des glandes surrénales par exemple, entraîne la maladie d'Addison qui se traite par l'administration de corticostéroïdes. Une surproduction de Gc par les surrénales, conséquence d'une tumeur sécrétant l'ACTH ou

d'une hyperplasie du cortex surrénalien, entraîne le syndrome de Cushing qui exige normalement une surrénalectomie et un traitement hormonal substitutif.

### 1.1.2 L'hypophyse

Longtemps considérée comme la glande endocrine maîtresse, l'hypophyse est au cœur de la communication hormonale des vertébrés, orchestrant notamment les trois grands axes neuroendocriniens qui commandent les fonctions surrénaliennes, thyroïdiennes et gonadiques.

#### 1.1.2.1 Structure anatomique et types cellulaires

L'hypophyse (aussi appelée glande pituitaire) pèse moins d'un gramme chez l'humain et se trouve tapie à l'arrière du chiasme optique, dans une cavité de l'os sphénoïde, la selle turcique. Cette position incita Versalius, anatomiste du 16<sup>ième</sup> siècle qui nomma la glande, à croire que sa fonction était de drainer les cavités du cerveau de mucus ou de phlegme, d'où le nom de glande pituitaire (du latin *pituita* qui signifie phlegme). Bien que sa structure anatomique puisse varier selon l'espèce, l'hypophyse est généralement constituée par la juxtaposition de trois lobes qui diffèrent de par leur origine embryonnaire, leur histologie ainsi que leurs fonctions physiologiques. Les lobes antérieur et intermédiaire constituent ensemble l'adénohypophyse tandis que le lobe postérieur et la tige infundibulaire (ou tige hypophysaire) forment ensemble la neurohypophyse.

Le lobe antérieur de l'hypophyse peut être subdivisé en deux régions distinctes, le pars distalis du côté postérieur et le pars tuberalis positionné antérieurement. Le pars distalis est la structure principale du lobe antérieur et contient cinq types de cellules endocrines sécrétant six hormones majeures; les somatotropes qui produisent l'hormone de croissance (GH), les corticotropes qui sécrètent l'ACTH, les lactotropes qui synthétisent la prolactine (PRL), les thyrotropes qui produisent la thyrotropine (TSH) et les gonadotropes qui sécrètent la follitropine (FSH) et la lutropine (LH). Chez l'humain, les somatotropes (environ 40%) et les corticotropes (environ 10%) constituent la majorité des cellules de l'hypophyse antérieure, tandis que les autres types ne représentent que 3-

5%. Cette distribution est toutefois plastique puisque par exemple les lactotropes peuvent atteindre 20% durant la grossesse et la lactation post-partum.

Le pars tuberalis est adjacent à la tige infundibulaire, une structure qui forme le lien anatomique entre l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus. Des études ont rapporté qu'on retrouve dans le pars tuberalis des cellules exprimant chacune des hormones majeures (autant durant l'embryogenèse du rat (342) que dans l'hypophyse bovine adulte (47)), mais le rôle précis de cette structure reste nébuleux. Enfin, notons que le lobe antérieur abrite une population de cellules non-endocrine, les cellules folliculo-stellates (FS), qui peuvent représenter jusqu'à 10 % de la masse cellulaire totale. Ces cellules à la morphologie étoilée pourraient être d'origine neuroectodermale puisqu'elles expriment des marqueurs tel GFAP. Les cellules FS forment un réseau étroit entre elles ainsi qu'avec certaines cellules endocrines au moyen de jonctions lacunaires (gap junctions), et pourrait ainsi jouer un rôle dans la synchronisation de la réponse des cellules endocrines à certains stimuli (328). Les cellules FS sécrètent également plusieurs facteurs, tel les interleukines IL-6 et LIF, qui agissent de manière paracrine afin de moduler l'activité de certaines cellules endocrines, notamment celle des corticotropes (12).

Le lobe intermédiaire (pars intermedia) est une structure qui se retrouve entre le pars distalis et le lobe postérieur chez la plupart des vertébrés et qui est particulièrement développée chez les rongeurs. Chez l'humain, cette structure est présente au cours de l'embryogenèse mais régresse ensuite pour disparaître chez l'adulte, tandis qu'elle ne se forme jamais chez les oiseaux. Le pars intermedia est principalement composé de cellules endocrines, les mélanotropes, qui expriment l'hormone mélanotrope (MSH). Peu vascularisé, le lobe intermédiaire des amphibiens et de certains mammifères est entouré d'un plexus neuronal qui semble réguler la sécrétion de la MSH.

Le lobe postérieur (pars nervosa) constitue la partie neuronale de l'hypophyse puisqu'il est principalement composé de terminaisons nerveuses de neurones dont les corps cellulaires se trouvent dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus, et qui ensemble forment le système neurosécréteur magnocellulaire. Ces extrémités axonales sécrètent deux hormones hypothalamiques, soit la vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT). Le pars nervosa contient également un grand nombre de

cellules de type gliale, les pituicytes. Plus que de simples acteurs de soutien, elles possèdent la faculté de modifier leurs morphologies afin de moduler l'activité du système neurosécréteur. Ainsi, en période de forte production hormonale, les pituicytes se rétractent des espaces périvasculaires pour laisser libre accès aux terminaisons axonales afin qu'elles sécrètent leurs hormones dans la circulation sanguine (175).

### **1.1.2.2 Les hormones hypophysaires**

Outre la régulation des trois grands axes neuroendocriniens, les hormones hypophysaires commandent également de nombreuses fonctions métaboliques, notamment au niveau des glandes mammaires, des reins, et de l'utérus. Au nombre de neuf, les principales hormones hypophysaires sont exprimées chacune par un type cellulaire précis de l'adénohypophyse ou du système magnocellulaire de l'hypothalamus.

#### **1.1.2.2.1 Le lobe antérieur**

Les cinq types de cellules différentes de l'hypophyse antérieure sécrètent au total six hormones peptidiques majeures. Elles ont toutes en commun le fait d'être régulées par des hormones hypothalamiques, expliquant le lien étroit entre les différentes structures de l'appareil hypothalamo-hypophysaire. Ces hormones sont :

- L'hormone de croissance (GH, Growth Hormone) : L'hormone de croissance est un polypeptide de 191 acides aminés sécrété par les somatotropes. L'expression de GH par les somatotropes est sous double contrôle hypothalamique, soit positif par l'hormone GHRH (growth-hormone-releasing hormone) et négatif par l'hormone somatostatine (GHIH). La GH joue un rôle essentiel dans la croissance générale de l'organisme, ce qui la distingue des autres hormones hypophysaires dont le rôle principal vise un ou seulement quelques tissus-cibles. L'hormone de croissance favorise la prolifération cellulaire, en stimulant la mitose et en augmentant la taille des cellules. Ses effets sur le métabolisme incluent la stimulation de la synthèse protéique, la mobilisation des réserves d'acides gras et la conservation des glucides. La plupart des effets anabolisants de la GH sont indirects; ils sont plutôt médiés par l'action des somatomédines (IGFs, Insulin-like Growth Factor) qui sont sécrétées par le foie sous l'action de la GH.

- La Prolactine (PRL) : La PRL, sécrétée par les lactotropes, est une hormone très proche de la GH puisque 161 de ses 191 acides aminés sont conservés. L'expression de la PRL est régulée négativement par la PIH (Prolactin Inhibitory Hormone) hypothalamique et positivement par les oestrogènes, qui stimulent la sécrétion de la PRL de même que la prolifération des lactotropes. Le principal rôle de la PRL est de promouvoir le développement et la croissance des glandes mammaires et la production de lait chez les femelles.
- La thyrotropine (TSH, Thyroid-Stimulating Hormone) : La TSH, tout comme les gonadotropines FSH et LH, est une glycoprotéine composée de deux chaînes polypeptidiques, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , auxquelles sont attachés de manière covalente des oligosaccharides. La TSH partage avec les gonadotropines la même sous-unité  $\alpha$ , tandis que sa sous-unité  $\beta$  est spécifique et comporte entre 112 et 118 résidus selon l'espèce. Ces deux sous-unités sont synthétisées indépendamment par les cellules thyrotropes de l'adénohypophyse. La sécrétion de la TSH est stimulée par l'hormone hypothalamique TRH, tandis qu'elle est réprimée par les hormones thyroïdiennes (thyroxine et triiodothyronine) qui exercent ainsi une rétroaction négative sur l'axe. La TSH commande la production des hormones thyroïdiennes par la thyroïde, régulant ainsi un grand nombre de processus biologiques.
- La lutropine (LH, Luteinizing Hormone) : La LH est une hormone gonadotrope car elle stimule, avec la FSH, la production d'hormones stéroïdiennes par les gonades. Elle est exprimée par les gonadotropes de l'hypophyse sous la régulation positive de l'hormone hypothalamique GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone). Sa sous-unité  $\beta$  est nommée LH $\beta$  et comporte de 117 à 121 acides aminés. La LH stimule la formation du corps jaune (corpus luteum) de l'ovaire ainsi que l'ovulation chez la femelle, tandis qu'elle stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig chez le mâle.
- La follitropine (FSH, Follicle-stimulating Hormone) : La FSH, au même titre que la LH, est produite par les gonadotropes sous le contrôle de la GnRH. Sa sous-unité  $\beta$ , la FSH $\beta$ , est un polypeptide d'environ 110 acides aminés. La FSH commande le développement précoce du follicule ovarien chez la femelle ainsi

que le développement des cellules de Sertoli et les étapes initiales de la spermatogenèse chez le mâle.

- La corticotropine (ACTH, Adrenal Cortical-stimulating Hormone) : Tel que mentionné plus haut, l'ACTH produite par les corticotropes commande la biosynthèse des Gc. L'ACTH provient de la maturation du précurseur POMC, processus dont les détails seront décrit plus loin (voir section 1.1.3).

#### 1.1.2.2 Le lobe intermédiaire

Les cellules mélanotropes comptent pour la totalité des cellules endocrines du pars intermédia. Celles-ci produisent les hormones mélanotropes, soit  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -MSH (Melanocyte-Stimulating Hormone) suite à la maturation du précurseur POMC. Les mélanotropines jouent un rôle important dans la pigmentation de la peau en dispersant les granules de mélanine à la surface des mélanocytes. Ces effets semblent être surtout médiés par l'  $\alpha$ - et la  $\beta$ -MSH, puisque le seul récepteur ayant une haute affinité pour la  $\gamma$ -MSH n'est pas présent dans la peau (410). La sécrétion des mélanotropines est réprimée par la dopamine provenant de neurones aminergiques de l'hypothalamus qui étendent leurs projections jusqu'à la frontière entre le pars nervosa et la pars intermedia. D'autres hormones hypothalamiques telles que l'acide gamma amino-butyrique (GABA) et le neuropeptide Y répriment également la sécrétion des MSHs tandis que le CRH et le TRH en stimulent l'expression (236,442). Chez les humains, il ne semble pas y avoir de mélanotropines produites par l'hypophyse et la pigmentation serait régulée par des MSHs produites localement par les mélanocytes (476). Chez les oiseaux qui n'ont pas de pars intermedia, il semble que des mélanotropes soit présentes dans le pars distalis.

#### 1.1.2.3 Le lobe postérieur

Deux hormones peptidiques de 9 acides aminés chacune sont sécrétées par la neurohypophyse : l'hormone antidiurétique, également appelée vasopressine (AVP), et l'ocytocine (OT). L'AVP dérive d'une prohormone, la pressophysine, qui est synthétisée dans le corps cellulaire de neurones situés dans le noyau supraoptique de l'hypothalamus. Cette hormone est ensuite transportée dans des vésicules, complexée à des protéines de transport appelées neurophysines, jusqu'aux terminaisons axonales du pars nervosa.



L'AVP est ensuite stockée dans des granules de sécrétion jusqu'à ce que des influx nerveux de l'hypothalamus stimulent leur sécrétion par exocytose dans le réseau capillaire irriguant le lobe postérieur. La principale fonction de l'AVP est de favoriser la rétention d'eau. En effet, l'AVP augmente la perméabilité des tubules collecteurs des reins, stimulant ainsi la réabsorption et par conséquent la concentration d'eau dans les fluides corporels.

L'ocytocine quant à elle est produite suite à la maturation de la prohormone ocyphysine, qui est synthétisée dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Comme l'AVP, l'OT est transportée dans des vésicules, escortée par les neurophysines, jusqu'aux terminaisons nerveuses de la neurohypophyse en attente d'un signal hypothalamique commandant leur excrétion. Les principales fonctions physiologiques de l'OT sont de favoriser l'éjection du lait des alvéoles mammaires durant l'allaitement et stimule les contractions utérines durant l'accouchement.

### **1.1.2.3 Développement et différenciation hypophysaire**

Le système corticotrope hypophysaire se met en place durant la vie embryonnaire et l'activation de l'axe HPA est une caractéristique de la fin de la période de gestation à travers les espèces (77). En effet, une augmentation des niveaux de Gc sanguins est nécessaire pour induire la parturition ainsi que pour le développement de plusieurs organes, tels le foie et les poumons. De plus, la plupart des facteurs responsables de la transcription constitutive et régulée de POMC sont présents tôt durant le développement et plusieurs sont également impliqués dans le développement hypophysaire. Les quelques paragraphes qui suivent décrivent donc le développement général de l'hypophyse, la cytodifférenciation des divers types cellulaires ainsi que les facteurs impliqués, tout en portant une attention particulière à l'ontogénie du système corticotrope hypophysaire.

#### **1.1.2.3.1 Origine embryonnaire de l'hypophyse**

Depuis longtemps, il a été assigné aux différents lobes hypophysaires une origine distincte, mais un développement qui se fait de manière concomitante. En effet, Rathke puis Schwind ont décrit la formation de l'ébauche embryonnaire de l'hypophyse et ils ont tous deux observé que l'hypophyse dérive d'une région où l'épithélium oral contacte le

neuroectoderme du diencephale (424). D'élégants travaux, utilisant notamment des chimères caille/poulet (102) ainsi que le marquage au DiI d'embryons de rat (238), ont depuis permis de tracer un portrait plus détaillé du développement hypophysaire précoce.

L'adénohypophyse dérive d'une invagination de l'ectoderme oral (aussi appelé stomodeum) provenant du bourrelet neural antérieur (102,238). Cette structure, dont l'aspect rudimentaire est visible autour du 9<sup>ème</sup> jour embryonnaire (e9) de la souris, s'allonge pour former la poche de Rathke dite définitive vers le jour e10.5. Le feuillet de cellules épithéliales de la poche se referme ensuite et il y a resserrement des extrémités dorsales de la poche jusqu'à ce qu'il y est perte de la connexion avec l'épithélium oral (224). À ce stade, le primordium hypophysaire adopte sa structure glandulaire contenant une cavité, la lumière de l'hypophyse. Les cellules de la partie rostro-ventrale du primordium prolifèrent ensuite, entre les jours e12.5 et e14.5, et s'engagent dans une transition épithélium-mésenchyme. Ceci marque le début de la cytodifférenciation du pars distalis, qui s'accroît jusqu'à la naissance (206). En même temps, des excroissances latérales projettent antérieurement pour se rejoindre sur le plan médian et former le pars tuberalis (415). Au cours du développement de la poche de Rathke, les cellules adjacentes à l'infundibulum prolifèrent et forment le lobe intermédiaire. Il faut noter que bien qu'il s'agisse ici d'un modèle généralement accepté chez les mammifères, certaines études suggèrent une origine neuronale, du moins partielle, de l'adénohypophyse chez les oiseaux et certains amphibiens (133,225,226).

Le développement de la neurohypophyse se fait parallèlement à celui de l'adénohypophyse et ces deux structures maintiennent un contact étroit au cours de l'organogenèse hypophysaire. La neurohypophyse dérive du neuroectoderme du diencephale ventral. À partir du bourgeon neurohypophysaire, un infundibulum se forme (sorte de structure en forme d'entonnoir) et se développe suite à la prolifération des cellules neuroépithéliales, qui se différencient ensuite en pituicytes. Simultanément, des excroissances de fibres nerveuses provenant des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus traversent l'infundibulum. Ainsi, le lobe postérieur (pars nervosa) sera ultimement formé de terminaisons nerveuses endocrines entremêlées de pituicytes.

### 1.1.2.3.2 Ontogénie des corticotropes et autres types cellulaires

Au cours du développement hypophysaire, la différenciation des divers types cellulaires se fait selon un ordre spatio-temporel précis et conservé chez les mammifères (206,438). Bien que l' $\alpha$ -GSU (la sous-unité commune aux glycoprotéines) soit détectable au jour e11.5, les corticotropes sont les premières cellules endocrines du lobe antérieur à se différencier de manière terminale, c'est-à-dire qui expriment l'hormone adulte. Ainsi, l'ARNm de POMC de même que l'ACTH est détectable au jour e12-e12.5 dans la région caudo-ventrale du pars distalis (135,206,438). Bien que considérées différenciées, ces corticotropes ne répondent à une stimulation par le CRH que deux jours plus tard (300), probablement dû à l'absence de récepteurs membranaires. Quoiqu'il en soit, le système corticotrope n'est fonctionnel *in vivo* que vers le jour e14.5-e15, alors que les premiers neurones exprimant le CRH apparaissent dans l'hypothalamus (107) et que le système porte hypophysaire se met en place (106).

La TSH $\beta$  est détectable dans le pars tuberalis dès le jour e12.5 (135). Ces thyrotropes sont dit transitoires car elles disparaissent après la naissance. Viennent ensuite les mélanotropes du pars intermedia qui expriment POMC à partir du jour e14.5. La population définitive de thyrotropes apparaît dans la partie caudo-médiane du pars distalis au jour 15.5, soit au même moment où apparaissent les somatotropes (GH) et les lactotropes (PRL) du côté caudo-dorsal du pars distalis. Les gonadotropes occupant le domaine ventral du lobe antérieur sont les dernières à se différencier, produisant la LH $\beta$  puis la FSH $\beta$  aux jours e16.5 et 17.5 respectivement. La vasopressine et l'ocytocine ne sont détectables qu'après la naissance, soit au 4<sup>ième</sup> et 8<sup>ième</sup> jour post-natal respectivement chez le rat (502).

### 1.1.2.3.3 Facteurs régulant le développement hypophysaire

Le développement hypophysaire est une pièce en plusieurs actes et une myriade d'études génétiques et moléculaires ont permis d'identifier les nombreux acteurs impliqués. Ceux-ci incluent des morphogènes qui régulent la prolifération et la distribution topographique des types cellulaires de l'hypophyse antérieure, ainsi que des facteurs de transcription qui eux régissent la différenciation des différents types de

cellules endocrines. Voici donc quelques-uns des principaux protagonistes ainsi que leurs influence sur le développement des cellules corticotropes:

A) Molécules de signalisation (morphogènes): Des expériences de recombinaison tissulaire chez le rat ont révélé l'importance de signaux émanant du diencephale lors des premiers événements marquant le développement de l'adénohypophyse (105,500,501). Subséquemment, des études ont montré que BMP4, exprimé dans le diencephale (et ensuite dans l'infundibulum) dès le jour e8.5, était requis pour l'induction et la formation de la poche de Rathke. Ainsi, les quelques souris BMP4<sup>-/-</sup> ayant survécu jusqu'au jour e10 ont un diencephale intact mais ne développent pas de poche Rathke (459). Le diencephale exprime également FGF8 et FGF10 à partir des jours e9.5 et e14 respectivement. Ces facteurs semblent également essentiels pour la formation et la prolifération de la poche de Rathke. En effet, l'inactivation de FGF10 ainsi que celle de FGFR2b, un récepteur de FGF10 exprimé dans l'épithélium oral, entraîne la disparition par apoptose de la poche rudimentaire avant la formation complète de cette structure (115,356). L'inactivation du gène Nkx2.1, exprimé lui aussi seulement dans le diencephale, résulte en un phénotype similaire et l'étude de ces mutants a démontré l'absence de FGF8 (mais non celle de BMP4) chez ces mutants (459).

Le rôle de ces morphogènes sur la différenciation des corticotropes échappe toutefois encore au verdict définitif. Ainsi, Ericson et coll. rapportent que l'expression de l'ACTH est atténuée dans des explants de poche de Rathke prélevés au jour 10.5 et co-cultivés avec des cellules COS exprimant BMP4 (ou BMP2/7) (135). Toutefois, Treier et coll. n'observent pas d'effet sur l'expression d'ACTH en utilisant le même système, mais avec des explants prélevés un jour plus tôt (468). De plus, ce même groupe rapporte que l'expression de Noggin (un antagoniste de BMP4 et BMP2) par transgénèse bloque le développement de l'hypophyse au stade rudimentaire (jour e10) sans toutefois affecter la différenciation des corticotropes (468). Des résultats divergents ont aussi été rapportés concernant le rôle des FGFs. Ainsi, tandis que l'expression d'ACTH par des explants de poche de Rathke au jour e11.5 est réprimée par des billes enduites de FGF2 (135), l'expression par transgénèse de FGF8 dans la poche de Rathke semble plutôt augmenter le nombre de corticotropes (468).

L'ectoderme oral est également une source de morphogènes extrinsèques. Ainsi, Sonic hedgehog (Shh) est exprimé à travers l'ectoderme oral, excepté au niveau de la poche de Rathke, dès le jour e8. Shh semble aussi requis pour l'organogenèse hypophysaire puisque l'expression ectopique de Hip, un antagoniste de Shh, dans l'ectoderme oral et la poche de Rathke, bloque la formation de celle-ci au stade rudimentaire (469). Bien que POMC ne soit pas détectable dans ces hypophyses transgéniques à e13 (alors que POMC apparaît normalement à e12.5), le rôle de Shh sur la différenciation des corticotropes n'est pas clair puisque dans des expériences de gain de fonction qui entraînent une hyperprolifération des gonadotropes et des thyrotropes, Shh n'augmente pas le nombre de corticotropes (469).

Dès que la poche de Rathke définitive se forme autour du jour e10.5, d'autres signaux tels que BMP2, BMP7 et Wnt4, émanant cette fois-ci de la poche elle-même ainsi que du mésenchyme situé du côté ventral de l'hypophyse, semblent prendre le relais et gouverner l'organisation topographique et la différenciation des divers types cellulaires de l'hypophyse (135,468). BMP2, dont l'expression est induite par Shh, semble réguler l'expression de facteurs de transcription ventraux (voir plus bas) (469). Wnt4 est lui requis pour l'expansion des types cellulaires ventraux puisque l'analyse d'hypophyse de mutant  $Wnt4^{-/-}$  au jour e17.5 montre une nette réduction du nombre de gonadotropes, thyrotropes et somatotropes, sans toutefois affecter les corticotropes (468). À ces signaux s'ajoutent également les FGFs, dont l'expression est maintenue par l'infundibulum, ce qui crée deux gradients opposés; un dorsal → ventral de FGF8/10/18 et un autre ventral → dorsal de BMP2/7. Une hypothèse avancée par le groupe de Rosenfeld veut que ces gradients opposés induisent l'expression de facteurs de transcription différents selon la position des progéniteurs dans l'axe dorso-ventral et que ces facteurs soient les déterminants autonomes de la différenciation terminale des divers types cellulaires de l'hypophyse (427,468).

B) Facteurs de transcription : Un grand nombre de facteurs de transcription impliqués dans le développement hypophysaire ont pu être identifiés. Ces facteurs peuvent être divisés en deux; ceux exprimés tôt durant l'organogenèse et importants pour la prolifération et l'engagement vers une voie spécifique de différenciation, et ceux requis pour la différenciation terminale des divers types cellulaires.

Plusieurs homéoprotéines à domaines LIM sont importantes pour le développement hypophysaire précoce. Ainsi, Lhx3 et Lhx4, deux facteurs très homologues, sont exprimés dans la poche de Rathke en voie d'invagination à partir du jour e9.5 et leur expression est maintenue dans l'hypophyse adulte. Ces deux facteurs semblent jouer des rôles partiellement redondant durant le développement précoce de la glande puisque l'ablation génique de chacun individuellement n'empêche pas la formation de la poche de Rathke (433,434) tandis que la mutation des deux gènes bloquent l'apparition de la poche définitive (433). Outre ce rôle précoce, Lhx3 semble également contrôler une étape subséquente d'engagement vers la différenciation. Ainsi, les hypophyses de mutants Lhx3<sup>-/-</sup> présentent des défauts de prolifération et on y dénote l'absence de tous les types de cellules endocrines, excepté les corticotropes, suggérant que l'ontogénie de ceux-ci est indépendante de ce facteur (434). De plus, chez les souris Lhx3<sup>+/-</sup>Lhx4<sup>-/-</sup>, tous les types cellulaires apparaissent, indiquant clairement que Lhx3 est celui nécessaire pour l'engagement vers la différenciation cellulaire (433). Les FGFs sont des régulateurs positifs de Lhx3 (135,459) et des études suggèrent que Shh et FGF8/10 synergisent pour induire l'expression de Lhx3 (469). De plus, l'expression ainsi que l'activité transcriptionnelle de Lhx3 semblent régularisées par les homéoprotéines de la famille Pitx (27,474). Le rôle de ces facteurs de transcription, notamment dans l'organogenèse hypophysaire, sera abordé plus loin (voir section 1.2.3.1).

Tout comme Lhx3/4, Isl-1 est une homéoprotéine à domaine LIM. Isl-1 est exprimé dès le jour e8.5 dans l'épithélium oral d'où dérive la poche de Rathke. À partir du jour e10.5, son expression s'éteint du côté accolé à l'infundibulum mais persiste du côté plus ventral (135). Cette distribution asymétrique coïncide avec l'extinction progressive de la source de BMP4 venant du diencephale et le maintien de celle de BMP2 par le mésenchyme juxtaposé du côté ventral du lobe (135,468). Étant donné que les BMPs peuvent induire l'expression de Isl-1 *in vivo* ainsi qu'*in vitro* tandis que FGF8 la réprime (135), il semble que les gradients opposés de BMPs et FGFs régulent l'expression de Isl-1. Il est difficile d'assigner un rôle précis pour Isl-1 dans l'organogenèse hypophysaire puisque l'ablation génique de ce gène entraîne la mort vers le jour e10 (377). Toutefois, l'analyse de mutants au jour e9.5 révèle la présence d'une poche primitive présentant un défaut de prolifération avec notamment un épithélium non-

différencié (459). Une autre étude suggère que les corticotropes dérivent de progéniteurs dans lesquels l'expression de *Isl-1* s'éteint autour du jour e10.5 (135).

Les protéines à homéodomaines de type *Paired* constituent une autre famille importante pour le développement précoce de l'hypophyse. Parmi celles-ci, Prop-1 est détecté dans la poche de Rathke à partir du jour e10.5 et son expression est maintenue environ jusqu'au jour e16 (449). Prop-1 a été identifié par clonage positionnel comme étant le gène responsable d'une forme de nanisme lié à un défaut hypophysaire chez les souris Ames dwarf (449). L'étude de ces mutants hypomorphes a révélé que Prop-1 est essentiel à l'apparition des trois lignées dépendantes du facteur Pit-1 (voir plus bas), soit les somatotropes, les lactotropes et les thyrotropes (144,449). De plus, la mutation du gène *PROPI* chez l'humain cause le syndrome de déficience combinée en hormone hypophysaire et l'analyse de patients atteints a révélé une déficience en hormone LH et FSH, ce qui suggère que Prop-1 est requis pour l'ontogenèse des gonadotropes (519). On rapporte même une insuffisance en ACTH chez certains patients portant des mutations de Prop-1 affectant plus sévèrement la fonction de la protéine, suggérant un rôle de Prop-1 dans le développement ou le maintien des corticotropes (375). Le facteur Rpx/Hesx1 est exprimé très tôt durant le développement, apparaissant dès le jour e6.5 dans la région d'où origine la plaque neurale antérieure, puis son expression se restreint à l'épithélium oral et ensuite à la poche de Rathke et au lobe antérieur de l'hypophyse, où son expression est maintenue jusqu'au jour e13.5 (181). L'inactivation du gène Rpx cause un défaut de prolifération et une morphogenèse aberrante de la poche de Rathke (110). Il semble toutefois que l'extinction de Rpx soit nécessaire pour la différenciation hypophysaire adéquate. En effet, Rpx est un répresseur transcriptionnel qui peut hétérodimériser avec Prop-1 et recruter le corépresseur TLE, inhibant ainsi l'activité de Prop-1 (108,444). Rpx antagonise donc la fonction *in vivo* de Prop-1 et l'extinction de Rpx vers e13.5 est nécessaire pour permettre l'apparition des lignées dépendantes de Pit-1 ainsi que des gonadotropes (144,449). Une autre homéoprotéine de type *Paired*, Pax6, est exprimée dans le lobe antérieur selon un gradient dorsoventral. Les hypophyses de souris Pax6<sup>-/-</sup> contiennent un nombre accru de gonadotropes et thyrotropes, au dépend des lignées plus dorsales somatotropes et lactotropes (231).

Pit-1, une homéoprotéine à domaine POU, a été le premier des facteurs de transcription essentiels à la différenciation des cellules endocrines hypophysaires à être identifié. D'abord cloné en tant que facteur régulant l'expression histo-spécifique des gènes GH et PRL (48,197), l'analyse génétique des souris naines Snell et Jackson a déterminé que Pit-1 est requis pour la prolifération et la différenciation terminale des lignées somatotropes, lactotropes et thyrotropes (72,283). Pit-1 est nécessaire mais non suffisant pour diriger l'expression histo-spécifique de chacun des marqueurs de différenciation terminale que sont GH, TSH et PRL. Des interactions combinatoires avec divers facteurs de transcription et/ou cofacteurs sont donc requises dans chacun des cas.

Ainsi, Pit-1 s'associe au récepteur à l'œstrogène ER pour activer de manière synergique la transcription de PRL. L'ablation génique de l'isoforme ER $\alpha$  montre d'ailleurs une chute dramatique de l'expression de Prl et du nombre de lactotropes (425). Pit-1 s'associe également avec le facteur Ets-1 sur un site composite dans le promoteur de PRL et cette interaction est régulée par de multiples voies de signalisation convergeant sur les MAPKs (61,193). L'activation de la voie MAPK ainsi que celle de l'AMPc permet également le recrutement des coactivateurs CBP et p/CAF par Pit-1 et le rehaussement subséquent de son activité sur le promoteur PRL, GH et TSH $\beta$  (527,537). La régulation de l'expression du gène GH par Pit-1 dépend du contexte cellulaire. En effet, Pit-1 agit en coopération avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) et celui de l'hormone thyroïdienne (TR) pour activer la transcription du gène GH dans les somatotropes (362,422). Dans les lactotropes, Pit-1 de même que TR sont également liés au promoteur mais ils sont ici requis pour l'assemblage d'un complexe répresseur, en recrutant notamment le corépresseur N-CoR et des histones déacétylases (426). Chez l'humain, l'expression histo-spécifique est conférée au gène GH par une région de contrôle de locus (LCR) situé 15 kb en amont du promoteur et contenant plusieurs sites putatifs de liaison à Pit-1 (213,435).

L'interaction entre Pit-1 et GATA-2, un facteur à doigts de zinc induit par BMP-2 dans l'hypophyse, joue un double rôle dans la régulation génique dans les thyrotropes. Ainsi, sur un promoteur tel celui de TSH $\beta$  contenant des sites Pit-1 et GATA-2 adjacents, ces deux facteurs activent la transcription de manière synergique (109,166). Toutefois, sur des promoteurs ne contenant que des sites GATA-2 et normalement actifs dans les



gonadotropes, l'activité de GATA-2 est inhibée par Pit-1 par un mécanisme ne nécessitant pas sa liaison à l'ADN (109). L'importance de ce mécanisme d'inhibition par interaction protéine:protéine est soulignée par l'analyse des souris naines Snell où une mutation de Pit-1 interférant avec l'interaction avec GATA-2 change le destin cellulaire des présumés thyrotropes en gonadotropes. Dans ces dernières, GATA-2 induit l'expression du récepteur nucléaire orphelin SF-1 (109) qui peut ensuite activer la transcription des marqueurs terminaux de différenciation tel LH $\beta$  (172,228), FSH $\beta$  (62) et le récepteur au GnRH (130). Le rôle de SF-1 a été confirmé par l'ablation génique de SF-1 spécifiquement dans l'hypophyse, ce qui entraîne une forte baisse de LH et FSH (543). Le facteur Egr-1 est également essentiel pour l'expression du gène LH $\beta$  (274), qu'il active en synergie avec SF-1 et Pitx1 (472).

Finalement, la différenciation des mélanotropes et des corticotropes requiert Tpit, un facteur à boîte T (258,392). Dans les corticotropes, Tpit collabore avec Pitx1 et NeuroD1, deux autres facteurs histo-spécifiques, pour réguler l'expression spatio-temporelle adéquate de POMC. Le rôle de chacun de ces facteurs de transcription sera discuté en détail plus loin.

### 1.1.3 De la Pro-opiomélanocortine à l'ACTH

La prohormone POMC est le précurseur de plusieurs hormones peptidiques et peptides opioïdes importants. Le concept de prohormone date de la fin des années 1960s, alors que Steiner et coll. ont proposé que la biosynthèse de l'insuline impliquait le clivage d'un précurseur de plus haut poids moléculaire (450). Au même moment, Li et Chrétien rapportaient la séquence de la  $\beta$ -LPH, produit de maturation de la POMC et précurseur de la  $\beta$ -MSH, mais la signification de ce polypeptide ne fut appréciée que plusieurs années plus tard (280). Le premier indice suggérant l'existence d'un précurseur de l'ACTH est venu en 1971, alors que Yalow et Berson ont rapporté une hétérogénéité entre le poids moléculaire de la corticotropine du plasma et celle provenant d'extraits hypophysaires ou d'une tumeur thymique. En effet, l'anticorps dirigé contre l'ACTH détectait une protéine de 16 kD, qu'ils ont appelé big-ACTH, alors que l'ACTH purifiée a un poids moléculaire de 4.5 kD (528). Par la suite, à l'aide d'élégantes expériences de marquage métabolique par pulse-chasse, Eipper et Mains ont utilisé la lignée cellulaire AtT-20 dérivée d'une

tumeur hypophysaire pour démontrer que l'ACTH est synthétisé à partir d'un précurseur de plus haut poids moléculaire (304) et que ce précurseur est reconnu par un anticorps anti- $\beta$ -endorphine (303). Au même moment, Roberts et Herbert ont montré qu'un polypeptide immunoprécipité par un anti- $\beta$ -LPH était également reconnu par un anticorps dirigé contre l'ACTH (405). Ces expériences suggéraient donc l'existence d'un précurseur commun aux trois peptides. La quête de ce précurseur culmina par l'isolement de son ADNc, cloné à partir d'ARNm de lobe intermédiaire bovin, dont la séquence protéique déduite comprenait l'ACTH,  $\beta$ -lipotropine et la  $\beta$ -endorphine (340). C'est ainsi que naissait la pro-opiomélanocortine...

### 1.1.3.1 Le gène et les transcrits POMC

Bien que l'isolement de l'ADNc ait permis de déduire la séquence et la structure de POMC, il fût important de déterminer le nombre de copies du gène POMC présentes dans le génome et de caractériser les transcrits produits. En effet, la complexité de la régulation de l'expression des peptides dérivés de POMC (voir section 1.1.3.4. pour l'ACTH) aurait pu s'expliquer par l'existence de plusieurs gènes possédant des séquences régulatrices différentes ou à un seul gène conférant une réponse à de multiples hormones. De plus, la distribution différentielle des peptides dérivés de POMC aurait pu être le résultat d'épissages alternatifs d'un même transcrit primaire ou alors le fruit d'une maturation différentielle d'un précurseur polypeptidique.

Le gène POMC a été cloné chez plusieurs espèces, notamment le rat (123,124), la souris (348,478) et l'humain (458), et ces études n'ont identifié qu'un seul gène fonctionnel par génome haploïde. Chez la souris, un pseudogène contenant une séquence hautement homologue (92%) à l'extrémité 3' du troisième exon a été identifié. En dehors de cette séquence de 533 paires de bases (pb), aucune autre homologie n'est toutefois présente (348,478). Ce pseudogène ne produit pas un ARNm fonctionnel et contient notamment une substitution R $\rightarrow$ C au site de clivage requis pour libérer l'ACTH. De plus, la séquence contient une mutation introduisant un codon de terminaison prématuré, ce qui entraîne probablement l'élimination du transcrit par le mécanisme de NMD (nonsense-mediated mRNA decay) (179).

La structure du gène POMC retrouvée chez le rat est représentée à la figure 1.1. Le gène mesure environ 6,5 kilobases (kb) chez le rat, mais peut varier entre 6 et 8 selon l'espèce. La structure du gène reste toutefois toujours la même, soit trois exons séparés par deux introns. L'exon1 mesure 87 pb et comprend la majeure partie de l'extrémité 5' non-traduite de l'ARNm. Le deuxième exon mesure 152 pb et contient l'ATG, qui fait partie du peptide signal, ainsi que le début du peptide N-terminal. Enfin le troisième exon, mesurant 833 pb, code pour les principaux peptides actifs biologiquement, dont l'ACTH. Les introns A et B séparants ces exons sont assez grands, mesurant respectivement 3,6 et 3 kb. Il a été démontré qu'il existe de l'épissage alternatif à la jonction entre l'intron A et l'exon 2, résultat de l'utilisation de deux sites accepteurs différents, ayant pour effet d'ajouter 30 nucléotides (nt) à la partie 5' non-traduites de l'ARNm. Ce transcrite plus long, représentant environ 25% des ARNm POMC, code donc pour le même polypeptide et existe chez le rat et l'humain mais est absent chez le porc (256,351).

L'ARNm de POMC retrouvé dans l'hypophyse et dans les macrophages mesure environ 1100 nt chez le rat (50). Le transcrite retrouvé dans le noyau arqué de l'hypothalamus mesure lui 1300 nt; la différence étant due à une queue de poly-(A) de 200 nt plus longue que celle du transcrite hypophysaire. Outre cette différence, les deux transcrits sont identiques et encodent le même polypeptide (207). Plusieurs tissus périphériques, de même que certaines régions du cerveau, expriment des transcrits plus courts variant entre 800 et 1000 nt. Ces transcrits montrent une hétérogénéité dans leurs extrémités 5' et résultent d'initiation alternative de la transcription au début de l'exon 3. Ces ARNm contiennent la séquence de la majorité des peptides dérivés de POMC, mais ils sont dépourvus de peptide signal, qui est encodé par l'exon 2 (207,256). Donc, bien qu'il soit traduit, le polypeptide produit par ces transcrits tronqués ne se rend pas au réticulum endoplasmique rugueux, et donc les peptides ne peuvent être maturés ni sécrétés (94). La présence de transcrits normaux, bien qu'en très faible quantité, explique que des peptides dérivés de POMC soient détectables dans ces tissus (256). Mentionnons enfin que des sites d'initiation de la transcription en amont du site +1 ont été détectés chez la souris, le rat et l'humain, et la proportion des ARNm provenant de ces sites semblent être sous régulation hormonale (114,514).

### 1.1.3.2 POMC et peptides dérivés

La POMC est d'abord exprimée sous forme de pré-prohormone, la pré-POMC (voir figure 1.1). Une fois synthétisée dans le réticulum endoplasmique, la pré-POMC est transportée vers l'appareil de Golgi où elle sera séparée des autres protéines et emmagasinée dans des granules de sécrétion immatures de la voie de sécrétion régulée. Une fois le peptide-signal de 26 aa clivé, POMC est un polypeptide de 241 aa. Les enzymes nécessaires à la maturation sont co-emmagasinées dans les granules, où POMC est clivée par des endoprotéases spécifiques, les prohormones convertases (PCs), qui reconnaissent les sites formés de deux acides aminés basiques; soit KK, KR, RK et RR. L'expression différentielle des PCs dans les divers tissus exprimant la POMC déterminera quels peptides y seront produits. Une fois les peptides libérés, une exopeptidase, la carboxypeptidase E, enlève les résidus basiques afin de générer les peptides actifs. De plus, les peptides pourront subir des modifications qui moduleront leurs activités biologiques tel l'acétylation, l'amidation, la phosphorylation, la glycolysation et la sulfatation (74,442). S'ensuit la maturation des granules, puis les peptides stockés sont relâchés en réponse à la stimulation par les sécrétagogues (297).

L'ACTH, qui est produite et sécrétée par le lobe antérieur, est un polypeptide de 39 acides aminés compris entre les sites d'hydrolyse 4 et 7 de POMC (ACTH<sub>1-39</sub>). Des études de structure-fonction ont révélé que l'ACTH comporte trois domaines : le message corticostimulateur est codé par les aa 1 à 10, les aa 11 au 24 forment la partie reconnue par le récepteur et les aa 25 au 39 composent le domaine extérieur responsable de l'antigénicité et de la liaison avec les protéines du plasma. Dans le lobe intermédiaire, l'hydrolyse du site 5 de l'ACTH<sub>1-39</sub> libère l' $\alpha$ -MSH<sub>1-13</sub> et celle du site 6 le CLIP<sub>18-39</sub> (*cortotropin like intermediate lobe peptide*). La fonction physiologique du peptide CLIP, découvert dans le pars intermedia de rat et de porc, reste à être définie. Cependant, dans le noyau arqué de l'hypothalamus, CLIP<sub>18-39</sub> semble posséder des propriétés hypnogéniques (80) et il a été démontré que la forme phosphorylée de CLIP (Ph-CLIP) est importante pour ses effets sur le sommeil paradoxal (53).

La partie N-terminale de la big-ACTH (aussi appelée pro- $\gamma$ -MSH) est le précurseur de la  $\gamma^3$ -MSH (26 aa entre les sites 1 et 3), qui sera ensuite clivée pour donner

la  $\gamma^1$ -MSH et la  $\gamma^2$ -MSH (11 et 12 aa respectivement, entre les sites 1 et 2). Récemment, il a été proposé que la partie N-terminale de la pro- $\gamma$ -MSH (N-POMC<sub>1-52</sub>) est en fait responsable des effets mitogéniques dans le cortex surrénalien des peptides dérivés de POMC, un rôle traditionnellement attribué à l'ACTH. Selon Bicknell et coll., le fragment N-POMC<sub>1-52</sub>, pour lequel un récepteur potentiel a été identifié, serait libéré à partir de pro- $\gamma$ -MSH par une sérine protéase exprimée exclusivement dans le cortex surrénalien (39,40). Le clivage au site 3 libère également le peptide JP (*Joining Peptide*) auquel traditionnellement aucun rôle physiologique n'avait été attribué, en partie à cause de la grande variabilité de sa séquence chez les mammifères (322). Toutefois, plusieurs études ont suggéré une fonction dans les surrénales. Ainsi, il a été montré que le peptide JP stimule la production de cortisol, androsténone, aldostérone et DHEA (en synergie avec l'ACTH) dans des préparations cellulaires de surrénales humaines (95,326), tandis qu'un rôle potentiel dans la production d'androgènes reste controversé (322).

La partie COOH-terminale de la POMC est le précurseur des lipotropines  $\beta$ -LPH (= 91 aa après le site 7) et par la suite  $\gamma$ -LPH (= 58 aa entre les sites 7 et 9), dont la protéolyse génère la  $\beta$ -MSH (= 22 aa entre les sites 8 et 9). Les lipotropines sont des hormones sécrétées par l'hypophyse antérieure dont le rôle physiologique reste à définir, mais qui pourraient avoir un effet sur la mobilisation des graisses. En effet, il a été démontré que la  $\beta$ -LPH possède une forte activité adipocinétique (55,402). Le clivage de la  $\beta$ -LPH libère également les  $\beta$ -endorphines; soit la  $\beta$ -END<sub>1-31</sub> (= 31 aa après le site 9) dont la partie NH<sub>2</sub>-terminale donne les  $\gamma$ -endorphine (17aa) et  $\alpha$ -endorphine (16aa). Les endorphines sont des peptides opioïdes sécrétés par le système nerveux central. L'activité biologique des  $\beta$ -endorphines dépend de protéolyse additionnelles de même que de l'acétylation du N-terminal. Ainsi, la  $\beta$ -END<sub>1-27</sub>, issue du clivage au site 10, produit un peptide possédant une forte activité antagoniste sur le récepteur aux opiacés. De plus, l'acétylation du N-terminal de la  $\beta$ -END<sub>1-31</sub>, de même que la protéolyse aux résidus tyrosines des  $\alpha$ - et  $\gamma$ -endorphines génèrent de nombreux peptides dépourvus d'effets opioïdes; en effet c'est l'extrémité N-terminale (les cinq premiers acides aminés) ou enképhaline de la  $\beta$ -END<sub>1-31</sub> qui lui confère la fonction d'opioïde naturel (117,460).

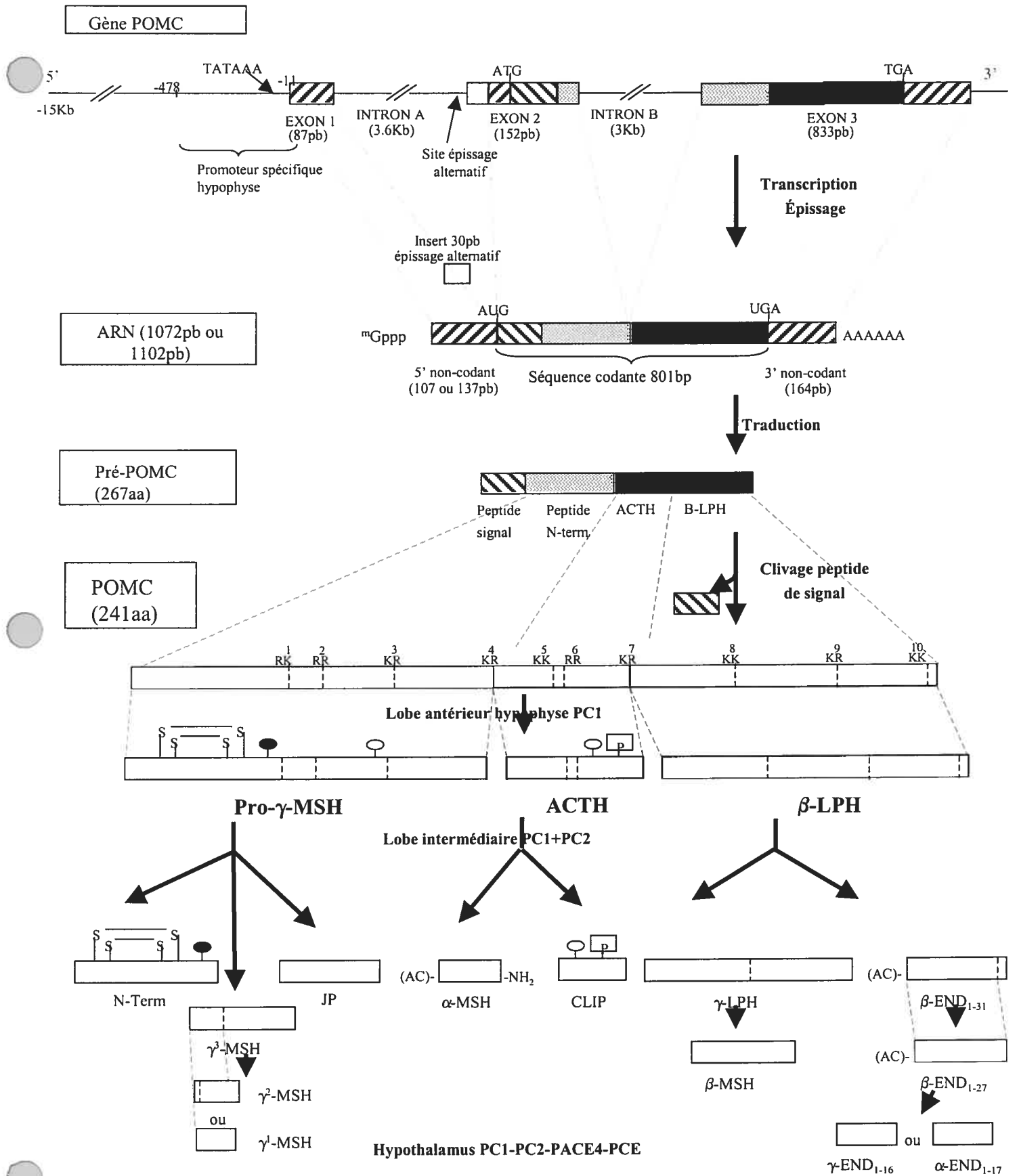


Figure 1.1: Le gène POMC et ses peptides dérivés

### 1.1.3.3 Distribution tissulaire de POMC et peptides dérivés

La POMC est principalement exprimée dans les corticotropes et les mélanotrope de l'hypophyse, de même que dans certaines régions du système nerveux central, notamment le noyau arqué de l'hypothalamus (74,302,447). PC1, est la seule convertase fortement exprimée dans les corticotropes, qui clivera la prohormone d'abord au site 7, générant la  $\beta$ -LPH et la big-ACTH (voir figure 1.1) (35,428). Après cette première hydrolyse, la big-ACTH a encore une masse de 16 kilodaltons. Une deuxième coupure au site 4 libère ensuite la pro- $\gamma$ -MSH et l'ACTH. La présence de multiples convertases dans les autres tissus exprimant la POMC explique que seules les corticotropes sécrètent l'ACTH. Ainsi, la présence de PC2 et PC1 dans les mélanotrope entraîne le clivage additionnel de l'ACTH en CLIP et  $\alpha$ -MSH. PC2 hydrolyse aussi la  $\beta$ -LPH pour donner la  $\gamma$ -LPH et la  $\beta$ -END<sub>1-31</sub> et clive la pro- $\gamma$ -MSH pour libérer les  $\gamma$ -MSH. De plus, dans les mélanotrope l' $\alpha$ -MSH et les  $\beta$ -endorphines sont acétylées, ce qui augmente les propriétés mélanotropiques de l' $\alpha$ -MSH mais diminue les effets opioïdes des  $\beta$ -endorphines. Les neurones exprimant POMC dans l'hypothalamus expriment également PC1 et PC2, mais en plus ils expriment d'autres protéases telles PACE4 et PCE, générant ainsi non seulement les mêmes peptides que le lobe intermédiaire, mais également les nombreuses variantes des  $\beta$ -endorphines (388). L' $\alpha$ -MSH et la  $\gamma$ -MSH produites localement par l'hypothalamus agissent via les récepteurs MC4-R et MC3-R respectivement et jouent des rôles essentiels dans le contrôle de l'appétit et dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

POMC est également exprimée à différents niveaux dans une myriade de tissus périphériques. Entre autre, plusieurs types de cellules de la peau expriment le CRH et des peptides dérivés de POMC et il a été proposé que ceci constitue un système de réponse locale au stress (440,447). Les keratinocytes notamment expriment POMC en réponse à l'interleukine IL-1 et aux rayons UV. Dans le système nerveux central, outre l'hypothalamus, POMC est aussi exprimé dans le noyau du faisceau solitaire du bulbe rachidien. Dans les lymphocytes et les macrophages, l'ACTH<sub>1-39</sub> (ainsi que diverses formes tronquées) et les  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -endorphines sont exprimé dépendamment de la nature du stimulus. Dans les parois intestinales et le duodénum, POMC est maturée en  $\alpha$ -MSH, et le petit intestin produit les  $\beta$ -endorphines. POMC est également faiblement exprimée

dans la médullosurrénale, les ovaires, les testicules (cellules de Leydig), les reins, les cardiomyocytes et les poumons (302,447). Enfin, POMC est exprimée dans plusieurs tissus pathologiques, entraînant parfois l'expression ectopique d'ACTH responsable du syndrome de Cushing (461). Les sources les plus communes d'expression ectopique d'ACTH sont les carcinomes pulmonaires à petites cellules (27%), les tumeurs carcinoïdes des bronches (21%), les tumeurs des cellules d'îlots de Langerhans du pancréas (16%), les tumeurs carcinoïdes du thymus (10%), de même que certains phéochromocytomes et neuroblastomes (37).

Des indices sur l'importance relative des divers peptides dérivés de POMC sont venus de l'analyse des souris POMC<sup>-/-</sup> ainsi que de l'identification de patients portant des mutations dans le gène humain. Il semblerait donc que ce soit les rôles de l'ACTH sur les surrénales ainsi que ceux des hormones mélanotropes dans l'hypothalamus et la peau qui sont les plus importants, puisque autant les humains que les souris affectées présentent des problèmes de développement et d'insuffisance surrénales, d'obésité et de pigmentation (246,534).

#### **1.1.3.4 La régulation de l'expression de l'ACTH dans les corticotropes**

L'expression d'ACTH par les corticotropes est assujettie à une régulation complexe par une variété d'hormones et de neuropeptides. Ces facteurs agissent de manière biphasique; leurs effets (stimulateurs ou inhibiteurs) précoces passent par la régulation de la sécrétion de l'ACTH, tandis que leurs effets plus tardifs (ou adaptatifs) impliquent des mécanismes génomiques, notamment la régulation transcriptionnelle de POMC. Les prochains paragraphes porteront essentiellement sur la régulation de la sécrétion de l'ACTH, puisque la régulation transcriptionnelle de POMC sera traitée in extenso plus bas (section 1.4).

##### **1.1.3.4.1 Les facteurs stimulant la sécrétion d'ACTH**

Le principal sécrétagogue de l'ACTH est bien sûr le CRH (d'où le nom de Corticotropin Releasing Hormone...). Bien qu'il était connu depuis les travaux de Harris qu'un facteur hypothalamique régulaient la sécrétion de l'ACTH hypophysaire, ce n'est qu'en 1981 que Vale et coll. ont isolé et caractérisé cette hormone peptidique de 41 aa



(482). Le CRH agit via son récepteur couplé aux protéines G pour induire la production d'AMPc, activer la kinase PKA et provoquer l'entrée de calcium extracellulaire (voir section 1.4.3.1 pour mécanismes). L'implication de PKA dans la sécrétion de l'ACTH a été démontré par la transfection de PKI, un inhibiteur peptidique très sélectif de PKA, qui bloque la sécrétion d'ACTH induite par le CRH dans les cellules AtT-20 (401).

Les études initiales ont permis d'identifier plusieurs hormones qui, bien que ne possédant qu'une faible activité sécrétagogue intrinsèque, ont en commun la propriété de rehausser fortement les effets du CRH sur la sécrétion d'ACTH hypophysaire; il s'agit des hormones neurohypophysaires vasopressine (AVP) et ocytocine (OT) ainsi que l'angiotensine II (AII) (149,157,161,483). L'action de l'AVP est la mieux caractérisée; ainsi, contrairement au CRH, les effets de l'AVP passent par la mobilisation du système  $IP_3/Ca^{2+}$  intracellulaire et l'activation subséquente de la PKC qui est requise pour observer les effets synergiques avec le CRH (5,69). Moins bien caractérisés, les effets de l'AII et de l'OT semblent également impliquer la voie PKC (5,291). Bien que l'AVP, l'AII, l'OT et le PMA (un activateur de la voie PKC) ne stimulent pas directement la formation d'AMPc (8), ces hormones potentialisent l'accumulation d'AMPc intracellulaire induite par le CRH (6,157,423). Il a été proposé que cet effet est dû à une inhibition de la phosphodiesterase par un mécanisme nécessitant l'activation de la PKC (6). L'AVP potentialise aussi l'effet du CRH en augmentant le nombre de cellules corticotropes exprimant l'ACTH et il a été proposé que l'AVP et l'AII facilitent la liaison du CRH à son récepteur (90).

Que ce soit par l'entremise de la voie AMPc/PKA ou  $IP_3/PKC$ , la sécrétion d'ACTH requiert la mobilisation du calcium afin d'en augmenter la concentration intracellulaire. Ainsi, des études ont montré que dans un milieu exempt de  $Ca^{2+}$ , la sécrétion d'ACTH induite par le CRH ou l'AVP/OT/AII est fortement réprimée (515,516). Le CRH induit principalement l'entrée de calcium extracellulaire, tandis que l'AVP et l'OT induisent plutôt le relâchement de  $Ca^{2+}$  stocké dans des vésicules intracellulaires sensibles à l' $IP_3$  (291,515). Le calcium extracellulaire est aussi important pour la phase de sécrétion soutenue induite par l'AVP et régulée par la voie PKC (357). Quant à la synergie entre le CRH et l'AVP, elle est observable même en absence complète d'ions  $Ca^{2+}$  mais requiert absolument l'activation de PKA et de PKC (357,515).

De nombreuses autres hormones pouvant aussi moduler la sécrétion de l'ACTH ont été identifiées. Les catécholamines épinéphrine et norépinéphrine potentialisent elles aussi les effets du CRH (156,481,483) et ce en agissant autant par les récepteurs de types  $\alpha$ - que  $\beta$ -adrénergiques (16,156). Les mécanismes d'action des catécholamines pourraient toutefois différer puisqu'il a été rapporté que l'épinéphrine stimule l'accumulation d'AMPC tandis que la norépinéphrine en diminue les niveaux intracellulaires (8,16). La cholecystokinine (CCK-8) synergise également avec le CRH et son action requiert la mobilisation de calcium (384,400,483). Parmi les autres sécrétagogues, mentionnons l' $\alpha$ -MSH et la  $\gamma^3$ -MSH qui peuvent stimuler la sécrétion d'ACTH de manière synergique avec l'AVP (292), les hormones peptidiques de la famille glucagon/sécrétine VIP et PACAP (350) ainsi que divers sulphonylurées (329). La cytokine LIF semble également être un modulateur important de l'axe HPA et il a été démontré que le LIF et le CRH synergisent pour stimuler la sécrétion d'ACTH (397). De plus, d'autres cytokines tels les interleukines IL-11, IL-1 $\beta$ , IL-6 et INF $\gamma$  stimulent également la sécrétion d'ACTH (22,222).

#### 1.1.3.4.2 Les facteurs inhibant la sécrétion d'ACTH

Les Gc produits par les surrénales sont eux aussi d'importants régulateurs des niveaux d'ACTH sanguin. En effet, les Gc inhibent la sécrétion d'ACTH hypophysaire par une boucle de rétroaction négative qui régule l'axe HPA. Des études ont montré que les Gc, bien qu'affectant les niveaux de base de sécrétion, inhibent surtout l'activité induite par les principaux sécrétagogues, dont le CRH et l'AVP (437). Les mécanismes sous-jacents à cette inhibition restent toutefois mal définis. En effet, des résultats contradictoires ont été rapportés quant à l'effet des Gc sur l'accumulation d'AMPC induite par le CRH (41,158), de même que sur la nécessité de synthèse protéique *de novo* induite par les Gc (4,113). Il semblerait toutefois que les Gc inhibent la sécrétion d'ACTH en agissant au niveau de la mobilisation de calcium induite par les voies PKA et PKC (437). Ceci est appuyé par l'observation que les Gc ne renversent pas la sécrétion d'ACTH induite par le calcium ionophore A23187 (325).

D'autres hormones ayant des effets inhibiteurs sur la sécrétion d'ACTH induite par le CRH ont également été identifiées. Ainsi, il a été démontré que la somatostatine

pouvait inhiber la sécrétion d'ACTH en empêchant la production d'AMPc (26). Une inhibition de la sécrétion d'ACTH induite par le CRH sans effet sur la production d'AMPc a été rapportée pour le peptide vasoactif adrenomédulline (170), tandis que les peptides natriurétiques ANF, BNP et CNP semblent inhiber la sécrétion d'ACTH en augmentant les niveaux de GMPc intracellulaires (418).

## 1.2 Mécanismes de transcription basale et histo-spécifique de POMC

De nombreuses études portant sur les séquences régulatrices du gène POMC ont permis de disséquer l'architecture de son promoteur. Ces études ont mené directement à l'identification de nombreux facteurs nécessaires à la transcription basale du gène, à la spécificité d'expression tissulaire, ainsi qu'à la réponse hormonale de POMC. Cette section portera sur les deux premiers aspects, en insistant sur les facteurs conférant la spécificité d'expression spatio-temporelle.

### 1.2.1 Le promoteur du gène POMC

Les premiers efforts de caractérisation des séquences promotrices du gène POMC ont porté sur le gène humain (324). Ainsi, Mishina et coll. ont d'abord montré qu'une fusion du gène complet au vecteur SV40 permet de produire dans les cellules COS un ARNm identique à celui présent dans les corticotropes. Les auteurs de cette étude ont ensuite utilisé le gène rapporteur TK sous le contrôle des premiers 685 nt de la région 5' flanquante en plus des 65 nt de l'exon 1 du gène POMC (désigné -685/+65), de même qu'une série de délétions 5', afin de définir les séquences minimales requises pour obtenir une activité transcriptionnelle adéquate. Ainsi, dans les cellules COS, les 95 premiers nt (-95/+65) suffisent pour produire un ARNm initié au bon site et l'activité de cette délétion est similaire à celle de la construction pleine longueur. Ces auteurs ont de plus identifié une boîte TATA, dont la séquence est proche du consensus, entre les nucléotides -35 et -22, qui est essentielle pour la transcription appropriée du gène aussi bien en transfection transitoire en cellules eucaryotes que dans un système de transcription *in vitro* (324,347).

Afin de définir les séquences du promoteur requises pour l'expression histo-spécifique de POMC, Jeannotte et coll. ont utilisé divers plasmides où le gène-rapporteur

*neo* est sous le contrôle des séquences flanquantes du site d'initiation, soit une construction pleine longueur (-4500/+63) ainsi qu'une série de délétions 5' (208). En comparant l'activité relative de ces constructions dans les cellules AtT-20 ou dans les cellules L (d'origine fibroblastique), les auteurs ont déterminé que les 480 premiers nt en amont du site d'initiation suffisent pour conférer une activité transcriptionnelle maximale et spécifique aux corticotropes. Cette étude a également permis d'identifier les séquences distales (entre -480 et -323) et proximales (entre -166 et -34) dont la délétion réduit fortement l'activité du promoteur dans les AtT-20 (208).

Une analyse plus détaillée du promoteur utilisant la même approche, soit la transfection de rapporteurs POMC dans diverses lignées cellulaires, a ensuite permis d'identifier trois domaines fonctionnels distincts dans la région -480 à -34 flanquant le promoteur minimal (-34/+63) (208,464,465):

- Le domaine proximal PE (-166/-34) confère une activité transcriptionnelle indépendamment de la présence des autres domaines et rehausse l'activité d'un promoteur hétérologue. De plus, contrairement aux autres domaines, il est actif dans des lignées cellulaires de diverses origines, ce qui suggère qu'il recrute des facteurs ubiquitaires et donc contribue peu ou pas à la spécificité tissulaire de POMC.
- Le domaine central CE (-323/-166) peut aussi conférer une activité transcriptionnelle lorsque isolé, mais c'est en combinaison avec le domaine distal (en présence ou non du PE) qu'il agit en synergie pour donner une forte expression de POMC spécifiquement dans les cellules AtT-20. Étonnamment, les activités du CE et du PE ne sont pas additives, et il a été suggéré que cela est dû à l'utilisation d'éléments redondants dans le promoteur.
- Le domaine distal DE (-480/-323) est peu actif en soi, mais son action synergique avec le CE est indispensable pour obtenir l'activité maximale et spécifique du promoteur.

Ces résultats, obtenus à l'aide du modèle cellulaire AtT-20, ont pour la plupart été confirmés *in vivo* grâce à des souris transgéniques. Ainsi, Hammer et coll. ont dérivé plusieurs lignées transgéniques portant des gènes-rapporteurs dirigés par le promoteur de POMC et l'analyse de celles-ci a révélé que la région -480/+64 du promoteur est

suffisante pour spécifier l'expression hypophysaire de POMC. Ces souris n'expriment POMC que dans les corticotropes et les mélanotropes, et aucune expression n'est détectable dans l'hypothalamus ou l'appareil reproducteur (173). L'importance du DE pour l'expression spatio-temporel adéquate de POMC a également été démontrée par transgénèse. En effet, tandis que 100% des souris ayant intégré une construction dirigée par le promoteur -480/+63 expriment le transgène dans l'hypophyse, seulement 50% (4 lignées sur 8) le font en absence du DE (293). De plus, ces souris n'expriment le transgène, dirigé par les séquences -323/-34, qu'à partir du jour e14.5, soit environ deux jours après POMC. Plus récemment, Poulin et coll. ont montré à l'aide de souris transgéniques que l'activité du promoteur dépourvu de DE était 1000 fois plus faible que celle du promoteur intact (-480/+63) dans les lobes proximal et intermédiaire (386). Liu et coll. ont quant à eux démontré qu'en absence des régions CE+DE, aucune lignée (0/19) n'exprime le transgène dans l'hypophyse (293). De plus, ces mêmes auteurs ont identifié plusieurs sous-régions importantes dans le domaine CE du promoteur POMC requises pour diriger l'expression appropriée des transgènes (293,294).

En somme, ces études ont permis de disséquer le promoteur de POMC et de définir deux composantes majeures dans la région -480/+63; soit le domaine proximal qui semble conférer une activité de base au promoteur mais qui ne contribue pas à l'expression histo-spécifique, et puis les domaines distal et central qui agissent en synergie et qui spécifient l'expression hypophysaire de POMC. De plus, chacun de ces domaines contient des éléments qui contribuent à l'expression régulée de POMC. Ces éléments de même que les facteurs qui les lient seront abordés plus loin (voir section 1.4). À ce jour, peu est connu quant aux séquences promotrices requises pour diriger l'expression extra-hypophysaire de POMC. Un début de réponse a toutefois été obtenu en ce qui concerne l'expression de POMC dans le système nerveux central. En effet, il a été démontré qu'un transgène dirigé par un fragment de 11 kb correspondant aux séquences 5' situées entre -2kb et -13kb du gène POMC confère l'expression spécifique aux neurones du noyau arqué de l'hypothalamus et du noyau du tractus solitaire. De plus, ce fragment confère une expression temporelle ainsi qu'une régulation hormonale identique à celle du gène POMC endogène (386).

Finalement, ajoutons qu'un mécanisme épigénétique semble également participer à la régulation de l'expression histo-spécifique de POMC. En effet, il a été montré que la région -480/+63 de POMC, qui fait partie d'un îlot CpG, est méthylée dans les tissus n'exprimant pas POMC et spécifiquement déméthylée dans les tissus qui normalement l'expriment de même que dans certaines tumeurs sécrétant l'ACTH (344). Or la méthylation des cytosines est un moyen efficace de réprimer l'expression génique et ce type de modification de l'ADN est d'ailleurs normalement associé à la chromatine condensée. Notons qu'il s'agit d'un cas quasi unique, puisque les promoteurs faisant partie d'îlot CpG sont normalement exempts de méthylation dans les cellules somatiques. Un dérèglement de ce mécanisme de répression pourrait expliquer l'expression ectopique de POMC souvent observée chez des patients atteints du syndrome de Cushing (343).

### **1.2.2 Facteurs régulant la transcription de base de POMC**

Depuis la fin des années 1980s, diverses études ont permis d'identifier un grand nombre d'éléments régulateurs dans le promoteur de POMC. Parmi celles-ci, une analyse exhaustive du promoteur par empreinte à la nucléase (footprinting), retardement sur gel et mutagenèse du promoteur, a permis à Therrien et Drouin d'identifier plus d'une dizaine de sites occupés par des facteurs de transcription et importants pour l'activité de base du promoteur (464). D'autres études similaires, effectuées par Liu et coll., ont permis de compléter le portrait du promoteur de POMC de rat (293,294), tandis que l'analyse du promoteur de POMC humain a largement confirmé ces résultats (244,477). À la lumière de ces études, la transcription basale de POMC est donc régulée par une multitude de facteurs qui semblent tous contribuer à l'activité globale du promoteur. Les prochains paragraphes porteront sur les principaux éléments et facteurs identifiés comme étant importants pour la transcription basale de POMC et ceux-ci sont représentés à la figure 1.2. Notons que la nomenclature utilisée pour décrire ces éléments est celle employée par Therrien et Drouin (464) et que certains éléments importants pour l'activité basale semblent également impliqués dans l'activité régulée et seront traités à la section 1.4.

Les expériences d'empreintes à la DNase I ont identifié quatre sous-domaines dans la partie proximale PE du promoteur dont la longueur semble varier légèrement dépendamment des conditions expérimentales utilisées (293,464). Il a été proposé que les

éléments PE-1 (+25/+32) et PE-3 (-63/-70) soient la cible de facteurs de type COUP-TF, puisque les empreintes observées dans les AtT-20 peuvent être compétitionnées par l'élément de réponse à COUP du promoteur de l'ovalbumine (464). De plus, ces éléments peuvent être liés par des facteurs COUP purifiés dans des études de retard sur gel. Toutefois, seule la mutation de la partie distale de l'élément PE-1 entraîne une diminution de 30% de l'activité du promoteur, tandis que celle du PE-3 n'a pas d'effet significatif sur l'activité (464).

En 1990, Reigel et coll. ont rapporté l'identification d'un facteur liant le promoteur entre la boîte TATA et le site de la coiffe (+1) qu'ils ont nommé PO-B (404). Par interférence à la méthylation et empreinte à la nucléase, ils ont montré que PO-B reconnaît la séquence située entre -3 et -15 et que la mutation de ce site réduit de 70% l'activité du promoteur dans les cellules AtT-20 ainsi que dans un système de transcription *in vitro* (404). Ces résultats ont ensuite été confirmés par Therrien et Drouin, puisque le site -3/-15 correspond à l'empreinte PE-2 et que la mutation de ce site entraîne également dans leur étude une réduction de 70% de l'activité du promoteur (464). PO-B a été purifié à partir d'extraits de cellules HeLa et il apparaît sous deux formes, soit de 54 kD et de 56 kD, cette dernière étant peut-être une forme hyperphosphorylée (505). Ainsi, l'activité de PO-B semble régulée par phosphorylation puisque le traitement à la phosphatase augmente de 30 fois la liaison à son élément de réponse dans le PE-2 (505). La facteur PO-B n'est pas spécifique aux corticotropes puisqu'il est présent dans les cellules HeLa et C127, de même que dans les cellules HL-60 non-différenciées, un modèle de cellules leucémiques promyélocyaires (119). Dans les HL-60, l'activité de PO-B est régulée négativement par la voie MAPK et il a été montré que cette inhibition est levée durant la différenciation cellulaire (119). Ces résultats suggèrent que PO-B puisse jouer un rôle dans la transcription régulée de POMC ou durant la différenciation des corticotropes.

Les domaines proximal et central du promoteur contiennent des séquences GC-riches homologues à l'élément de réponse consensus pour les facteurs Sp1. Ces éléments font partie des empreintes PE-4 et CE-1 et la mutation de chacun de ceux-ci entraîne une baisse d'environ 40 à 50% de l'activité du promoteur (464). Les complexes liant le PE-4 et le CE-1 comigrent sur gel et la liaison du PE-4 peut être compétitionnée par un excès

de sonde CE-1 (et vice-versa). De plus, ces deux complexes peuvent être compétitionnés par une sonde Sp1 consensus, suggérant que des facteurs apparentés à Sp1 ciblent ces deux éléments dans les corticotropes (464). Ces résultats ont ensuite été corroborés par Liu et coll. qui ont observé des empreintes correspondantes aux sites PE-4 et CE-1 (293). Ils ont démontré par retardement sur gel que le facteur Sp1 humain purifié peut lier ces deux sites et qu'un anticorps dirigé contre Sp1 peut "surrétarder" les complexes protéiques liés aux sites PE-4 et CE-1 (294). De plus, ils ont démontré que Sp1 se lie aux sites -136/-146 (PE-4) et -192/-201 (CE-1) du promoteur par interférence à la méthylation (294).

Liu et coll. ont également identifié biochimiquement un facteur, appelé PP1 (putative Pituitary POMC 1), qui se lie à deux séquences AT-riches dans le domaine central; soit entre -202/-211 (CE-1) et -253/-262 (CE-2) (294). La mutation correspondante de chacun de ces sites entraîne une diminution de 60% de l'activité du promoteur dans l'étude de Therrien et Drouin (464). L'activité de liaison de PP1 semble spécifique aux cellules exprimant POMC puisqu'elle n'est détectable qu'à partir d'extraits d'AtT-20 et de tumeurs mélanotropes, mais non de cellules HeLa, GH<sub>4</sub> (tumeur somatotrope hypophysaire) ou hépatique (294). De plus, les sites PP1 semblent importants pour l'expression hypophysaire de POMC en souris transgéniques (294). Toutefois, PP1 n'a jamais été cloné et son rôle exact dans la régulation de POMC reste à être défini, d'autant plus qu'il a également été démontré que son site de liaison dans le CE-2 chevauche celui de Brn3a, un autre activateur transcriptionnel. Ce dernier est un facteur de la famille POU essentiel à la différenciation neuronale. Or il a été montré que Brn3a est présent dans l'hypophyse et les AtT-20, qu'il lie l'élément CE-2 (-256/-266) *in vitro*, et qu'il transactive le promoteur POMC dans des cellules hétérologues CV-1 (153). Brn3a est également un activateur du promoteur du CRH dans l'hypothalamus. Son expression assez restreinte pourrait suggérer un rôle dans la transcription histo-spécifique de POMC. Toutefois, il a été démontré que l'expression de Brn3a ne corrèle pas avec celle de POMC dans une variété de tumeurs neuroendocrines (270).



## PROMOTEUR (r)POMC -480/+63

-480 gatcttgatt tcacaagact ccatactttc ccaacactgg gaaatctga tgcgtaacag

-420 acccctcct cattagtgat atttacctcc **aaatgccagg** **aaggcagatg** gacgcacaca  
 Facteurs Nur STAT1/3 NeuroD1

-360 ggtaattcca ctccattctg taagacctca gaactaggcc tgcctcacac daggatgcta  
 Tpit

-300 **agcctctg**tc cagtctgag tggagatcca acag**catct taattaag**tt cctcctgacc  
 Pitx Brn3a PP1

-240 accggggcca ggtgtgctg tcagcgggtc **tgtgctaadg** **ccagcctccg** cactttccag  
 PP1 Sp1

-180 gcacatctgc **tgtgcgcgca** gcccgcaccg ggaag**cccc cctcc**cgcg cccgcccgcc  
 PCRH-REB-1 Sp1

-120 cccttcgct ggccggggat tcgcttggtg cgttgcagaa gcgctgccag **gaaggtcacg**  
 NGFI-B

-60 **tccaaggctc** acccaccxaa cctgcaggt **ataaaagaag** agaga**agagt gacagggacc**  
 nGRE Boîte TATA PO-B

+1 **aaacgggagg** cgacggagga gaa**agaggt ta**aggagcag **tgactaag**gag aggccactga  
 COUP-TF AP-1

+61 **aca** +63  
 CREB

Figure 1.2: Le promoteur POMC de rat

### 1.2.3 Facteurs régulant la spécificité tissulaire de POMC

L'analyse du promoteur a révélé que la synergie entre les domaines central et distal est à la base de la spécificité tissulaire de l'expression de POMC. Des études subséquentes ont permis de circonscrire deux courtes séquences pouvant récapituler la spécificité d'expression de POMC; soit les séquences DE-2 dans le domaine distal et CE-3 dans le domaine central (259,465). Ces observations ont mené à l'identification de facteurs spécifiques aux corticotropes (et/ou aux mélanotropes), qui reconnaissent ces séquences et confèrent l'expression histo-spécifique de POMC. Ceci est leur histoire...

#### 1.2.3.1 Le facteur bHLH NeuroD1

Au cours de la dissection initiale du promoteur, Therrien et Drouin ont identifié trois éléments fonctionnels dans le domaine distal, désignés DE-1,-2 et -3. Afin de déterminer lequel confère l'activité spécifique aux corticotropes, ces éléments ont été isolés et testés en combinaison avec le domaine central. Des trois, seul l'élément DE-2 reconstitue l'activité synergique avec le domaine central dans la lignée AtT-20 (465). L'étude plus détaillée de cet élément a permis d'identifier le motif DE-2C comme étant principalement responsable de l'activité du DE-2. L'analyse par mutagenèse du DE-2C a finalement mis en évidence la séquence GCAGATGG, située en position -370/-377 du promoteur de rat, qui est essentielle à l'activité histo-spécifique du DE-2C (465). Cette séquence est également importante pour l'activité globale du promoteur puisque l'introduction d'une mutation ponctuelle a le même effet que la délétion complète du domaine distal (386). Or, cette séquence contient le motif NCANNTGN, appelé boîte E, qui est reconnu par les facteurs de transcription de la famille bHLH. Ces facteurs contiennent un domaine riche en acides aminés basiques suivi d'une séquence conservée d'environ 60 aa, nommée domaine HLH, formée de deux hélices  $\alpha$  séparées par une boucle. La liaison à l'ADN s'effectue au niveau du domaine basique, tandis que le domaine HLH sert d'interface de dimérisation. En effet, les bHLH à expression tissu-spécifique (classe B) ne peuvent lier l'ADN que sous forme d'hétérodimères avec un bHLH à distribution ubiquitaire (classe A), qui eux toutefois peuvent agir sous forme d'homodimères (263).

Outre la présence d'une boîte E, plusieurs autres observations ont suggéré que le complexe présent dans les AtT-20 liant spécifiquement le DE-2C, appelé CUTE (pour Corticotroph Upstream Transcription Element-binding), était constitué d'hétérodimères de facteurs bHLH. Ainsi, le facteur Id, qui agit en tant que dominant négatif des bHLH, réprime l'activité transcriptionnelle du promoteur et du domaine distal et bloque la liaison du complexe CUTE au DE-2C. De plus, la migration sur gel du complexe CUTE peut aussi être "surretardée" par un anticorps anti-E47 (Pan2), un bHLH de classe A, tandis que la surexpression de E47 stimule l'activité transcriptionnelle du promoteur (465).

NeuroD1, également connu sous le nom de Beta2, est un bHLH à expression restreinte impliqué dans le développement des cellules endocrines de l'intestin et du pancréas ainsi que de certains types de neurones (272,336,341). Or, la présence d'une boîte E similaire à celle du DE-2C dans le promoteur de l'insuline, un gène régulé par NeuroD1, a suggéré que ce facteur puisse aussi cibler POMC. Poulin et coll. ont testé cette hypothèse et ils ont démontré que NeuroD1 est présent dans le complexe CUTE en association avec une variété de bHLH ubiquitaires (387). De plus, ils ont montré que seul un hétérodimère contenant NeuroD1 est capable de lier le DE-2C, et que la présence de ce facteur est requise (en plus de celle d'un bHLH ubiquitaire) pour obtenir une activité transcriptionnelle dépendante du DE-2C (387).

NeuroD1 est présent dans les AtT-20 et son ARNm colocalise avec l'ACTH dans l'hypophyse antérieure adulte (387). Toutefois, en immunohistochimie, la protéine ne semble être exprimée qu'entre les jours e12 et e15, et ce exclusivement dans les corticotropes (et non dans les mélanotropes) (386). Étant donné son expression transitoire qui précède de 0.5 jour celle de POMC, il a été proposé que NeuroD1 puisse jouer un rôle durant la différenciation corticotrope. Ce mécanisme impliquerait qu'après le jour e15, un autre bHLH apparenté prenne le relais pour maintenir l'expression histo-spécifique de POMC, rappelant ainsi la cascade de bHLH observée au cours du développement musculaire. Une telle cascade proneurale existe chez la souris dans les progéniteurs de neurones olfactifs où l'expression de Mash1 précède celle de neurogenin1, qui elle-même précède celle de NeuroD1 (75). Cette hypothèse est supportée par l'analyse des souris NeuroD1<sup>-/-</sup> qui présentent un retard dans l'apparition des corticotropes, mais chez qui l'expression de POMC au jour e17.5 n'est pas affectée (295). Ces observations suggèrent

la présence de facteurs pouvant compenser pour l'absence de NeuroD1, mais qui n'apparaissent dans les corticotropes qu'à partir du jour e15. Chez l'humain, bien que la séquence CANNTG se retrouve dans le DE-2C, les nucléotides adjacents ne sont pas conservés. Or, ceux-ci sont également importants pour la liaison de NeuroD1. Toutefois, la protéine NeuroD1 est présente dans les corticotropes adultes ainsi que dans des tumeurs exprimant l'ACTH (360).

Qu'en est-il des autres tissus exprimant POMC? Notons que dans l'hypothalamus, un autre bHLH neurogénique, soit *Nhlh2* (NSCL2), est exprimé dans une sous-population (30%) de neurones du noyau arqué exprimant POMC (345) et que les souris ayant subi l'ablation génique de *Nhlh2* montrent une baisse des niveaux d'ARNm de POMC ainsi que des niveaux moindre d'ACTH (165). Ceci suggère donc qu'il puisse exister d'autres bHLH qui remplacent NeuroD1 dans les différents sites d'expression de POMC.

### 1.2.3.2 Les homéoprotéines Pitx

La quête des éléments et facteurs qui confèrent l'expression histo-spécifique de POMC s'est ensuite concentrée sur le domaine central. Par analyse génétique, il a été déterminé qu'un élément situé à l'extrémité 5' du CE, baptisé CE-3 (-287/-322), est important pour l'activité transcriptionnelle du promoteur dans les AtT-20 puisque sa délétion entraîne une diminution de 85% de l'activité (259). De plus, il a été montré que le CE-3 est suffisant pour reconstituer la synergie transcriptionnelle avec le DE-2C, et ce spécifiquement dans les corticotropes. Lamonerie et coll. ont donc criblé une banque d'expression d'AtT-20 à l'aide du CE-3 et ils ont ainsi cloné une nouvelle protéine de 315 aa, contenant une homéodomaine, qu'ils ont nommé Ptx1 (Pitx1) (259). L'analyse de la séquence de l'homéodomaine de Pitx1 a révélé qu'il fait partie de la grande classe « paired » de gènes à homéoboîtes. Plus spécifiquement, Pitx1 se distingue par la présence d'une lysine en position 9 de la troisième hélice (dite de reconnaissance), soit le 50<sup>ième</sup> résidu de l'homéodomaine, qui caractérise la sous-famille bicoïde de facteurs à homéodomaine. Chez les mammifères, cette sous-famille inclut également les facteurs Otx-1/2 et goosecoïde, qui présentent une identité de 62% et 53% respectivement dans l'homéodomaine. Subséquemment, Pitx1 a également été cloné en tant que facteur interagissant avec Pit-1 (457). De plus, deux nouveaux facteurs dont l'homéodomaine est

hautement homologue à Pitx1 ont été identifiés, soit Pitx2 (95%) et Pitx3 (93%). Pitx2 a été identifié par clonage positionnel chez l'humain en tant que gène responsable du syndrome de Rieger, une malformation cranio-faciale (429). Pitx3 a été cloné indépendamment soit par homologie avec les deux premiers (430) ou soit en tant que gène exprimé spécifiquement dans le cerveau (441). Outre l'hypophyse, Pitx1 est exprimé spécifiquement dans les membres inférieurs, tandis que Pitx2 contrôle l'asymétrie gauche/droite durant l'embryogenèse. Pitx3 n'est quant à lui exprimé que dans l'œil et dans le mésencéphale, où il semble requis pour la survie d'une sous-population de neurones dopaminergiques qui dégénèrent dans la maladie de Parkinson (485).

Il a été montré que Pitx1 rehausse l'activité du promoteur POMC, ainsi que celle d'un rapporteur contenant simplement l'élément CE-3, autant dans une lignée cellulaire hétérologue que dans les AtT-20 (259). L'analyse du CE-3 a révélé la présence d'une séquence très semblable à celle reconnue par le facteur bicoïde dans le promoteur du gène *hunchback*; soit le motif TAATCC (TAAGCC dans le CE-3, situé entre -302 et -297). Dans ce motif, ce sont les cytosines qui confèrent la spécificité de liaison, en particulier l'avant-dernière qui est reconnue par la lysine 50 de l'homéodomaine (121,507). Pitx1 lie le CE-3 *in vitro* sous forme de monomère, et tel qu'attendu, la mutation du motif TAAGCC abolit la liaison. De plus, l'intégralité de cette cible est requise pour observer les effets transcriptionnels de Pitx1, puisque la mutation du motif abolit également la capacité de Pitx1 à transactiver le promoteur POMC (ou le CE-3 isolé) (259,386). La fonction de Pitx1 (ou d'un facteur apparenté) semble être conservée chez l'humain puisque le site CE-3 est conservé et important pour l'activité du promoteur POMC dans les cellules DMS-79 (344).

Pitx1 joue un rôle central dans la transcription de POMC par le biais de ses interactions protéine:protéine. Ainsi, Pitx1 collabore avec les hétérodimères de bHLH contenant NeuroD1 pour conférer la synergie entre les domaines central et distal, et les deux sites sont requis pour observer cette synergie transcriptionnelle (386). Plus spécifiquement, Pitx1 interagit physiquement avec le partenaire ubiquitaire tel Pan1/2 (E12/E47), tel que démontré *in vitro* par chromatographie d'affinité et *in vivo* par co-immunoprécipitation à partir d'extraits d'AtT-20. Cette interaction requiert le domaine

bHLH de Pan1 et l'homéodomaine de Pitx1 (386). L'activité de Pitx1 sur le promoteur POMC nécessite également la présence du site de liaison pour le facteur à boîte T Tpit, situé à quelques paires de base en 5' du site Pitx (voir section 1.2.3.3) (258).

L'étroite relation entre Pitx1 et Tpit (ou NeuroD1/Pan1) sur le promoteur POMC illustre un important aspect de l'action hypophysaire de Pitx1 et Pitx2, soit leurs capacités à activer la transcription en synergie avec d'autres facteurs à expression restreinte. Les facteurs Pitx jouent ainsi un rôle pan-hypophysaire en activant un large éventail de promoteurs, qui tous contiennent une ou plusieurs cibles TAATCC. Il a été démontré que les facteurs Pitx interagissent avec le facteur de transcription à doigt de zinc Egr-1 et le récepteur nucléaire SF-1 pour activer en synergie la transcription du gène LH $\beta$  (472,474,475). Dans ce cas, il a été démontré que le site Pitx est essentiel à l'activité du promoteur LH $\beta$  (393). Les facteurs Pitx collaborent également avec Pit-1 pour activer de manière synergique la transcription des gènes GH et PRL (457,474), ainsi qu'avec les facteurs Lhx pour activer la transcription du gène  $\alpha$ -GSU dans les gonadotropes (27). De plus, il a été montré que les facteurs Pitx activent la transcription d'autres gènes spécifiques à l'hypophyse tel FSH $\beta$ , TSH $\beta$  et GnRH-R (le récepteur au GnRH) (473).

L'examen des domaines N- et C-terminal de Pitx1 a révélé qu'ils contiennent des motifs riches en proline et en sérine souvent associés à des domaines d'activation transcriptionnelle. En effet, il a été montré que ces deux régions flanquant l'homéodomaine correspondent à des domaines de transactivation indépendants, et que la présence d'un seul domaine est requise pour conférer une activité transcriptionnelle (475). Toutefois, l'activité de Pitx1 sur le promoteur POMC et sur celui de LH $\beta$  dépend principalement de son domaine C-terminal, suggérant qu'il puisse exister une spécificité transcriptionnelle selon le promoteur ciblé et le contexte cellulaire (349,475). Ces observations pourraient s'avérer importantes puisqu'il existe 2 isoformes de Pitx1 et 3 isoformes de Pitx2 provenant de l'utilisation de promoteur alternatif et/ou d'épissage différentiel et qui diffèrent tous dans leurs extrémités N-terminales (145,473). Il semble toutefois que la spécificité de liaison à l'ADN, de même que la capacité à activer la transcription soit similaire entre différents isoformes de la famille Pitx. Ceci a d'ailleurs été démontré sur un panel de promoteurs hypophysaires et implique également

l'interaction synergique observée avec Tpit, NeuroD/Pan1, SF-1, Egr-1, et Pit-1 (258,473,474).

Ces dernières observations suggèrent qu'il puisse exister une redondance fonctionnelle entre les différents membres de la famille là où plus d'un membre est présent. Or, Pitx1 et Pitx2 sont co-exprimés dans le stomodeum ainsi que dans ses dérivés tel la poche de Rathke (260,332), de même que dans la plupart des lignées cellulaires hypophysaires (474). L'inactivation de Pitx1 affecte surtout l'expansion tardive des lignées thyrotropes et gonadotropes, et provoque des défauts de développement au niveau cranio-facial et des membres inférieurs (261,456). Les souris Pitx2<sup>-/-</sup> présentent de nombreux anomalies de développement, notamment au niveau de l'hypophyse qui ne progresse pas au-delà du stade e10.5 et présentent des problèmes de prolifération et de patterning (146,287). Toutefois, des cellules exprimant POMC subsistent dans les deux cas, suggérant une redondance fonctionnelle des facteurs Pitx lors de l'ontogénie des corticotropes.

### 1.2.3.3 Le facteur à boîte T Tpit

Les études d'inactivation génique ont montré que NeuroD1 et Pitx1 n'étaient pas indispensables à la différenciation terminale des corticotropes (453), et inversement, des expériences de gain-de-fonction par transgénèse ont déterminé que la simple présence de ces facteurs n'est pas suffisante pour induire la différenciation des corticotropes (résultats non-publiés). De plus, l'expression pan-hypophysaire de Pitx1 exclut la possibilité que celui-ci soit le seul responsable de l'activité transcriptionnelle spécifique aux corticotropes conférée par le CE-3. Ces résultats ont donc suggéré qu'il existe d'autres facteurs impliqués dans l'expression histo-spécifique de POMC et dans la différenciation terminale des corticotropes.

Au cours de l'analyse des séquences actives du CE3, une séquence contiguë au site reconnu par Pitx1 a été identifiée qui lorsque mutée abolit complètement l'activité du CE3. Or, cette séquence contient le motif TCACACCA, qui correspond (à un nucléotide près) à un demi-site de l'élément T. Cet élément est reconnu par Brachyury (T) ainsi que par les autres membres de la famille de facteurs de transcription à boîte T. En se basant sur cette observation, Lamolet et coll. ont utilisé une banque d'ADNc de cellules AtT-20

ainsi que des oligonucléotides dégénérés dirigés contre la boîte T pour cloner un nouveau membre de la famille qu'ils ont judicieusement nommé Tpit (258).

#### 1.2.3.3.1 Les facteurs de transcription à boîte T

Les facteurs à boîte T constituent une famille de régulateurs transcriptionnels dont les membres jouent des rôles cruciaux au cours du développement, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Le membre fondateur de la famille est T (tail) ou Brachyury, qui signifie "queue courte" en grec. La mutation Brachyury a d'abord été décrite en 1927 par Dobrovolskaïa-Zavadskaa qui a rapporté que les souris hétérozygotes mutantes présentent une queue plus courte et souvent légèrement tordue (120). Subséquemment, l'analyse des souris homozygotes a révélé qu'aucune structure postérieure au somite 7 n'est formée normalement et que, faute de développer un allantoïs, ces mutants meurent autour du jour e10.5 (89,164,169). Bien que le mutant Brachyury ait été pendant très longtemps l'un des favoris des généticiens du développement, ce n'est qu'en 1990 que le gène responsable fut identifié par clonage positionnel par Hermann et coll. (182).

L'analyse initiale a montré que le gène Brachyury code pour une protéine de 436 aa qui à cette époque ne présentait aucune homologie de séquence avec les familles de gènes connus, ni même de domaines fonctionnels reconnaissables. On a donc cru un certain temps que Brachyury était le seul représentant d'une nouvelle classe de gènes. Cette vision a toutefois dû être révisée en 1992 quand il fut rapporté que Brachyury et le gène *optomotor-blind* (*omb*) cloné chez la drosophile présentent une grande homologie de séquence dans l'extrémité N-terminal des deux protéines et que cette région contient un domaine unique de liaison à l'ADN (378). Puis en 1994, Bollag et coll. ont montré qu'il existe chez la souris une famille de facteurs comportant une boîte T très conservée, variant entre 180 et 200 acides aminés (51). Depuis, un grand nombre de nouveaux membres de la famille ont été identifiés, certains ayant des orthologues chez de nombreuses espèces (revus exhaustivement dans (364)). Il a aussi été montré que les gènes à boîte T représentent 0,1% du génome d'une variété d'organismes allant du nématode jusqu'à l'humain, tandis qu'ils sont absents chez d'autres organismes tel la plante *Arabidopsis thaliana* (512).



Les facteurs à boîte T jouent de nombreux rôles au cours du développement embryonnaire, particulièrement durant la gastrulation et la formation du mésoderme. Ainsi, Brachyury est nécessaire pour les composantes caudales du mésoderme axial, tandis que d'autres membres de la famille tels Eomesodermin et Tbx6 sont requis pour la formation du mésoderme paraxial et le recrutement dans le sillon primitif (364). Plusieurs membres ont également été associés à un rôle dans le patterning au cours du développement de divers membres; mentionnons simplement le rôle essentiel de Tbx4 dans le développement des membres postérieurs et inversement celui de Tbx5 dans les membres antérieurs. Quant aux rôles des facteurs à boîte T dans la différenciation cellulaire, ils se limitaient jusqu'à récemment à celui de Tbr1, requis pour les neurones glutamatergiques du néocortex (183), et à celui de Tbet qui induit la différenciation des cellules naïves T auxiliaires vers la voie Th1 (455). Enfin, soulignons l'importance de cette famille chez l'humain, dont le génome comprend une vingtaine de membres. En effet, plusieurs maladies génétiques ont été associées à des mutations aux facteurs à boîte T, notamment le syndrome de DiGeorge (Tbx1) et le syndrome de Holt-Horam (Tbx5) (361).

Les études fonctionnelles ont démontré que les facteurs à boîte T sont des régulateurs de l'expression génique et que la plupart, tel Brachyury, agissent en tant qu'activateurs transcriptionnels (70,233). Tbx2 et Tbx3 représentent quant à eux une exception puisqu'ils peuvent réprimer l'expression de plusieurs gènes (68,290). Malgré une certaine divergence au niveau de la boîte T au sein de la famille, l'examen des gènes-cibles, ainsi que les résultats d'expériences de sélection de sites par PCR, ont montré que tous les facteurs à boîte T étudiés lient le site consensus TCACACCT (512). Plusieurs de ces études ont montré que les facteurs à boîte T lient préférentiellement des séquences contenant deux ou même plusieurs sites consensus pouvant adopter multiples organisations et orientations spatiales. Ainsi, Brachyury lie un site palindromique et la structure cristallographique a révélé que des dimères de facteurs se lient de manière à ce que leurs hélices C-terminales contactent le sillon mineur de l'ADN (334). Toutefois, la pertinence biologique de ces observations reste à être démontrée puisqu'aucun des gènes-cibles de facteurs à boîte T identifiés jusqu'ici ne comporte de sites doubles (99). Enfin, très peu est connu quant aux mécanismes par lesquels les facteurs à boîte T

régulent la transcription. Ainsi, par exemple, un seul coactivateur de cette famille est connu, soit la guanylate kinase CASK/LIN2 qui rehausse l'activité transcriptionnelle de Tbr-1 (194).

#### 1.2.3.3.2 Rôles physiologiques de Tpit

Tpit est la quintessence du facteur à expression restreinte; en effet, les analyses par hybridation *in situ* et par immunohistochimie ont démontré que Tpit n'est exprimé que dans les corticotropes et les mélanotropes de l'hypophyse (258). Tpit n'est donc pas retrouvé dans les autres tissus exprimant POMC, tels les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus. Au cours du développement, son expression débute autour du jour e12-12.5 et précède légèrement celle de POMC dans les corticotropes. Au jour e13.5, Tpit est présent dans toutes les cellules du lobe antérieure exprimant POMC, tandis qu'il n'apparaît dans le lobe intermédiaire qu'au jour e15.5, soit au moment où débute l'expression de POMC. Chez la souris et l'humain, Tpit est également retrouvé dans les corticotropes et les mélanotropes de l'hypophyse adulte (258,484).

Cette corrélation suggère un rôle capital pour Tpit dans l'expression hypophysaire de POMC. Ceci a été élégamment démontré *in vivo* par Lamolet et coll. à l'aide d'expériences de gain-de-fonction par transgénèse où Tpit est exprimé sous le contrôle du promoteur de l' $\alpha$ -GSU. L'infundibulum exprime transitoirement l' $\alpha$ -GSU et contient des cellules non-différenciées qui expriment fortement Pitx1. Le ciblage de Tpit dans cette structure induit l'expression ectopique de POMC sans toutefois activer l'expression de NeuroD1. Ces résultats suggèrent donc qu'en présence de Pitx1, Tpit est suffisant pour induire la différenciation des corticotropes (258). Ces résultats ont été corroborés par l'analyse des souris Tpit<sup>-/-</sup> chez qui les éventuels corticotropes et mélanotropes n'atteignent pas le stade final de différenciation (défini par l'expression de POMC) malgré la présence de précurseurs compétents (392). À la lumière de ces résultats, Tpit semble donc requis pour la différenciation tardive et non pour l'engagement vers les voies corticotrope et mélanotrope.

L'inactivation génique de Tpit a également révélé un rôle inattendu de celui-ci dans l'ontogenèse des gonadotropes. En effet, l'absence de Tpit provoque l'apparition ectopique de gonadotropes dans le lobe intermédiaire, qui est normalement composé

exclusivement de mélanotropes (392). Ces résultats suggèrent donc un rôle de régulateur négatif du programme de différenciation des gonadotropes pour *Tpit*, ce qui est supporté par l'observation que l'expression ectopique de *Tpit* sous la régulation du promoteur de l' $\alpha$ -GSU mène à une forte diminution des marqueurs des gonadotropes que sont la  $\beta$ LH,  $\beta$ FSH, SF1 et  $\alpha$ -GSU (392). L'ensemble de ces observations, de même que l'absence d'effet de *Tpit* sur les lignées dépendantes de PIT1, ont mené à proposer un modèle où les corticotropes, mélanotropes, et gonadotropes forment un groupe d'équivalence distinct de celui formé par les lignées thyrotropes, somatotropes et lactotropes, qui toutes dépendent du facteur PIT1 (227,392).

Étant donné le profil d'expression très restreint de *Tpit* et son rôle essentiel dans l'expression de POMC *in vivo*, il a été proposé que des mutations dans le gène *TPIT* humain puisse être responsable de la déficience congénitale isolée en ACTH, une maladie qui entraîne une déficience surrénalienne chez certains enfants. L'analyse de l'ADN de divers patients affectés a révélé une étroite association (73%) entre le déficit isolé en ACTH (présentation néonatale) et des mutations dans le gène *TPIT* (389). Ainsi, sept mutations différentes ont été identifiées chez des nouveaux-nés atteints, et l'analyse fonctionnelle de ces mutations a montré qu'elles résultaient toutes en des pertes de fonction du facteur *Tpit* (389). De plus, il a été démontré que les souris *Tpit*<sup>-/-</sup> constituent un très bon modèle de déficience isolée en ACTH et que leurs phénotypes sont très similaires aux patients humains portant des mutations dans le gène *TPIT* (389).

#### 1.2.3.3.3 Mécanismes d'action de *Tpit*

*Tpit* est une protéine de 446 aa dont la boîte T est à 84% homologue à celle de Brachyury, tandis que l'homologie est d'environ 60% avec les autres facteurs de la famille à boîte T. *Tpit* est l'orthologue murin de *Tbx19* chez l'humain et les deux protéines sont à 94% homologues. *Tpit* est un facteur de transcription et il a été montré qu'il requiert la présence de son site de liaison dans le CE-3 (appelé *Tpit/Pitx-RE*) pour activer la transcription de POMC dans une variété de lignées cellulaires (258). L'importance fonctionnelle de la liaison à l'ADN de *Tpit* est illustrée par le fait que 3 mutations dans le gène humain qui abolissent la liaison à l'ADN et qui n'activent plus POMC ont été trouvées chez des patients souffrant de déficience isolée en ACTH (389).

De plus, il a été montré que le site de liaison à Tpit est méthylé sur les cytosines dans les tissus n'exprimant pas POMC chez l'humain, confirmant son importance pour la transcription adéquate de POMC (344).

Tpit active la transcription de POMC en coopération avec Pitx1 et l'intégralité des deux sites de liaison dans le promoteur est requise pour observer la synergie transcriptionnelle. Tpit et Pitx1 lient le Tpit/Pitx-RE sous forme de monomères et un effet coopératif lors de leurs interactions avec l'ADN pourrait être le mécanisme moléculaire expliquant la synergie entre les deux facteurs (258). Tpit active la transcription en synergie avec les trois membres de la famille Pitx et une étude structure-fonction a montré que l'homéodomaine, très conservé au sein de la famille Pitx, est suffisant pour observer l'effet synergique (258). Inversement, Brachyury qui est le facteur à boîte T le plus homologue à Tpit est également capable d'activer la transcription en synergie avec les Pitx, suggérant que la boîte T de Tpit est le domaine impliqué dans l'interaction avec Pitx1. Ceci est supporté par l'observation que Tbx1, un autre facteur à boîte T présent dans les AtT-20 mais phylogénétiquement plus éloigné de Tpit, est incapable de se substituer à celui-ci pour activer la transcription de POMC en synergie avec Pitx1 (258). Récemment, d'autres partenaires transcriptionnels de Tpit ont été caractérisés. Ainsi, Tpit interagit avec les hétérodimères NeuroD/Pan1 pour activer la transcription de POMC de manière synergique. Comme c'est le cas avec Pitx1, c'est Pan1 qui interagit avec Tpit et cette interaction ne requiert pas la boîte T de Tpit. Tpit peut également se comporter en répresseur transcriptionnel. En effet, Tpit et le récepteur nucléaire SF-1 antagonisent mutuellement leurs activités transcriptionnelles par un mécanisme qui ne requiert pas la liaison de Tpit à l'ADN (392). Cet effet répresseur pourrait expliquer son rôle de régulateur négatif lors de la différenciation des gonadotropes.

Finalement donc, à l'instar des autres membres de la famille des facteurs à boîte T, relativement peu est connu sur les mécanismes par lesquels Tpit régule la transcription. Les travaux rapportés au chapitre 5 de cette thèse adressent cette question et montrent que Tpit active la transcription en recrutant les coactivateurs de la famille SRC/p160 au Tpit/Pitx-RE. Il est également rapporté que Tpit est un médiateur de la réponse hormonale au CRH, médiée par la voie PKA/MAPK, sur le promoteur POMC et que Tpit active la transcription en synergie avec le récepteur nucléaire NGFI-B.

### 1.3 Facteurs régulant la transcription hormono-dépendante de POMC

Dans les cellules corticotropes de l'hypophyse, la transcription du gène POMC est assujettie à un étroit contrôle hormonal qui assure une réponse adéquate au stress. Cette régulation endocrine se fait principalement par le CRH qui active la transcription de POMC, de même que par les Gc qui à travers leurs récepteurs GR répriment la transcription et exercent ainsi une boucle de rétroaction négative sur l'axe HPA. Avant de regarder en détails les mécanismes par lesquels ces hormones régulent l'expression de POMC (voir section 1.4), cette section portera sur les principaux acteurs impliqués dans l'activation ainsi que dans la répression transcriptionnelle de POMC. Ceux-ci incluent les récepteurs nucléaires, particulièrement ceux de la sous-famille Nur, ainsi que les cofacteurs transcriptionnels, dont les coactivateurs de la famille SRC/p160 comptent parmi les mieux caractérisés.

#### 1.3.1 Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (NRs) forment une superfamille de facteurs de transcription qui jouent des rôles multiples au cours du développement embryonnaire et qui contribuent au maintien de l'homéostasie chez l'adulte. Les NRs comptent parmi les familles de régulateurs transcriptionnels les plus nombreuses, comprenant notamment 21 gènes chez la drosophile, 48 gènes chez l'humain, tandis que le génome de la souris en contient un de plus que l'humain, soit  $\text{FXR}\beta$ . Étonnamment, la superfamille des NRs s'est beaucoup amplifiée et diversifiée chez le nématode où l'on retrouve pas moins de 270 membres, tous issus d'un même gène ancestral, l'orthologue de HNF-4 (406).

##### 1.3.1.1 Structure générale des récepteurs nucléaires

Les NRs partagent une structure modulaire commune, dont la partie la moins bien conservée est la région N-terminale qui varie en longueur entre 50 et 500 acides aminés. Cette région contient au moins un domaine de transactivation constitutivement actif appelé AF-1. Chez de nombreux NRs, l'usage de promoteurs et/ou de sites d'épissage alternatifs mène, à partir d'un seul gène, à l'expression de plusieurs isoformes qui varient

uniquement dans le domaine N-terminal et qui possèdent des propriétés transcriptionnelles différentes. La région la mieux conservée est le domaine de liaison à l'ADN (DBD) qui se situe du côté C-terminal de l'AF-1 et dont le noyau est composé d'environ 66 à 70 résidus. Ce domaine est constitué de deux structures en doigt de zinc qui reconnaissent des séquences d'ADN (appelées *éléments de réponse*, REs) retrouvées sur les gènes-cibles de ces récepteurs. Ces éléments de réponse se composent typiquement de deux motifs AGGTCA dont l'orientation et l'espacement entre les motifs varient selon le récepteur. Un court sous-domaine dans le DBD, appelé P-box, confère la spécificité de reconnaissance à l'ADN, tandis qu'une autre séquence, le D-box, est impliquée dans la dimérisation des NRs (31,479). Les doigts de zinc sont suivis d'une extension C-terminale (CTE) qui est très importante pour la spécificité de reconnaissance à l'ADN pour plusieurs NRs, notamment ceux liant sous forme de monomère (307). Du côté C-terminal du DBD se trouve une région très flexible moyennement conservée qui joue le rôle de charnière entre le DBD et le domaine de liaison au ligand (LBD). Cette région doit être assez flexible pour permettre au DBD de tourner de 180° chez certains récepteurs qui peuvent lier des éléments de réponse composés de répétitions directes (DRs) ou de demi-sites palindromiques (IRs) (voir figure 1.3). Ce domaine contient également un signal de localisation nucléaire (NLS), qui peut parfois chevaucher le DBD, ainsi qu'un site potentiel d'interaction avec les corépresseurs (46).

La reconnaissance du ligand se fait par le LBD, large domaine localisé dans la partie C-terminale de la protéine. La structure secondaire du LBD, constituée de 11 à 13 hélices  $\alpha$  organisées en trois couches, est mieux conservée au sein de la famille que la séquence primaire, ce qui permet une sélectivité et une spécificité de réponse à un grand nombre de régulateurs physiologiques. Les fonctions du LBD sont nombreuses et dépendent pour la plupart de la présence du ligand. Ainsi, le LBD est la principale interface de dimérisation des NRs, en plus de contenir un autre NLS et parfois un domaine de répression. Le LBD contient également un domaine d'activation AF-2 qui est démasqué par le ligand, et ce par un mécanisme moléculaire qui a été étudié en détails. En effet, de nombreuses études cristallographiques ont permis d'élucider la structure 3D du LBD en absence (apo) ou en présence (holo) d'agonistes et d'antagonistes. Ces études ont montré que le LBD semble être dans l'ensemble une structure relativement rigide,

tandis que l'hélice la plus C-terminale (l'hélice 12) peut adopter plusieurs conformations. Ainsi, l'hélice 12, qui contient un domaine hydrophobe similaire au motif de reconnaissance LxxLL retrouvé chez les coactivateurs, se trouve en absence de ligand à bloquer l'accès à la poche occupée par les coactivateurs. La présence d'un agoniste induit un changement conformationnel qui implique un repositionnement de l'hélice 12, permettant ainsi le recrutement de coactivateurs (451).

### **1.3.1.2 Les différentes sous-familles de récepteurs nucléaires**

Les NRs peuvent être subdivisés en trois principales sous-classes; les récepteurs des hormones stéroïdiennes, les récepteurs formant des hétérodimères avec le récepteur de l'acide 9cis-rétinoïque (RXR) ainsi qu'un grand nombre de récepteurs dits orphelins, pour lesquels aucun ligand physiologique n'a encore été identifié (309).

#### **1.3.1.2.1 Les récepteurs des hormones stéroïdiennes**

La nature liposoluble des hormones stéroïdiennes, qui dérivent toutes du cholestérol, confère à ces hormones la capacité de faire le lien entre un signal physiologique et la réponse transcriptionnelle. Ce concept de lien direct est né à la fin des années 1960s, suite à l'observation que des hormones marqués pouvaient migrer du cytoplasme vers le noyau. Cette idée a été renforcée par Ashburner et coll. qui ont observé que l'ecdysone, un ecdystéroïde induisant la métamorphose chez les insectes, provoque l'ouverture de la chromatine à des endroits spécifiques sur les chromosomes polytènes de drosophile (21). Puis, dans les années 1970s, des études ont montré que les hormones stéroïdiennes agissent sur les tissus-cibles grâce à la présence de récepteurs à haute affinité qui activent des gènes spécifiquement dans ces tissus. Subséquemment, la purification biochimique du récepteur des glucocorticoïdes (GR) et du récepteur de la progestérone (PR) a permis l'étude des mécanismes d'action de ces récepteurs. Ces recherches ont abouti, au milieu des années 1980s, au clonage successif de GR (187) et du récepteur aux oestrogènes (ER) (168), qui furent les premiers facteurs de transcription à être clonés (voir la référence (529) pour une revue historique).

Depuis, un récepteur nucléaire spécifique à chacune des grandes classes d'hormones stéroïdiennes a été cloné; soit le récepteur de la progestérone (PR), des

androgènes (AR), des oestrogènes (ER), des minéralocorticoïdes (MR) et des glucocorticoïdes (GR). Outre la nature similaire de leurs ligands, les récepteurs des hormones stéroïdiennes (SHRs) partagent également plusieurs caractéristiques mécanistiques. Ainsi, tous forment des homodimères en présence de leurs ligands pour ensuite se lier à leurs éléments de réponse composés de 2 demi-sites organisés en répétitions inversées. De plus, ces récepteurs se retrouvent sous forme inactive dans le cytoplasme, complexés à des chaperonnes moléculaires tel hsp90, puis migrent vers le noyau en présence du ligand pour y exercer leur fonction transcriptionnelle. Certaines différences distinguent cependant ER des autres SHRs. Ainsi, contrairement aux autres qui reconnaissent préférentiellement des motifs AGAACA, ER, comme la plupart des NRs non-stéroïdiens, a plus d'affinité pour la séquence canonique AGGTCA (31). De plus, tandis que ER est retrouvé chez tous les vertébrés, il n'existe pas d'orthologue de GR, MR ou AR chez les poissons ni chez les amphibiens. Ces observations suggèrent d'ailleurs que les SHRs forment une branche relativement récente dans la superfamille des NRs. Enfin, il a été rapporté que ER peut former des hétérodimères avec d'autres types de NRs, notamment avec PPAR, ce qui n'est pas le cas pour les autres membres de cette sous-classe (31,134).

Soulignons que certains de ces récepteurs, tel que GR, peuvent agir soit comme activateurs ou comme répresseurs de la transcription, et ce par différents mécanismes. Enfin, mentionnons qu'étant donné les rôles cruciaux joués par les SHRs, la recherche de drogues modulant l'activité ces récepteurs est depuis longtemps un champ de recherche très actif. Ainsi dès les années 1960s, la dexaméthasone, un Gc synthétique ciblant GR, était couramment utilisé comme anti-inflammatoire. Ces dernières années, la recherche s'est concentrée sur les modulateurs spécifiques de l'activité de ER, ce qui a mené notamment aux traitements basés sur le tamoxifène pour prévenir le cancer du sein et le raloxifène pour prévenir l'ostéoporose (223). Il est très intéressant de noter que ces produits peuvent se comporter soit comme agoniste ou antagoniste, dépendamment du tissu-cible. Ceci suggère l'existence de mécanismes autres que la liaison du ligand qui peuvent moduler l'activité des NRs.



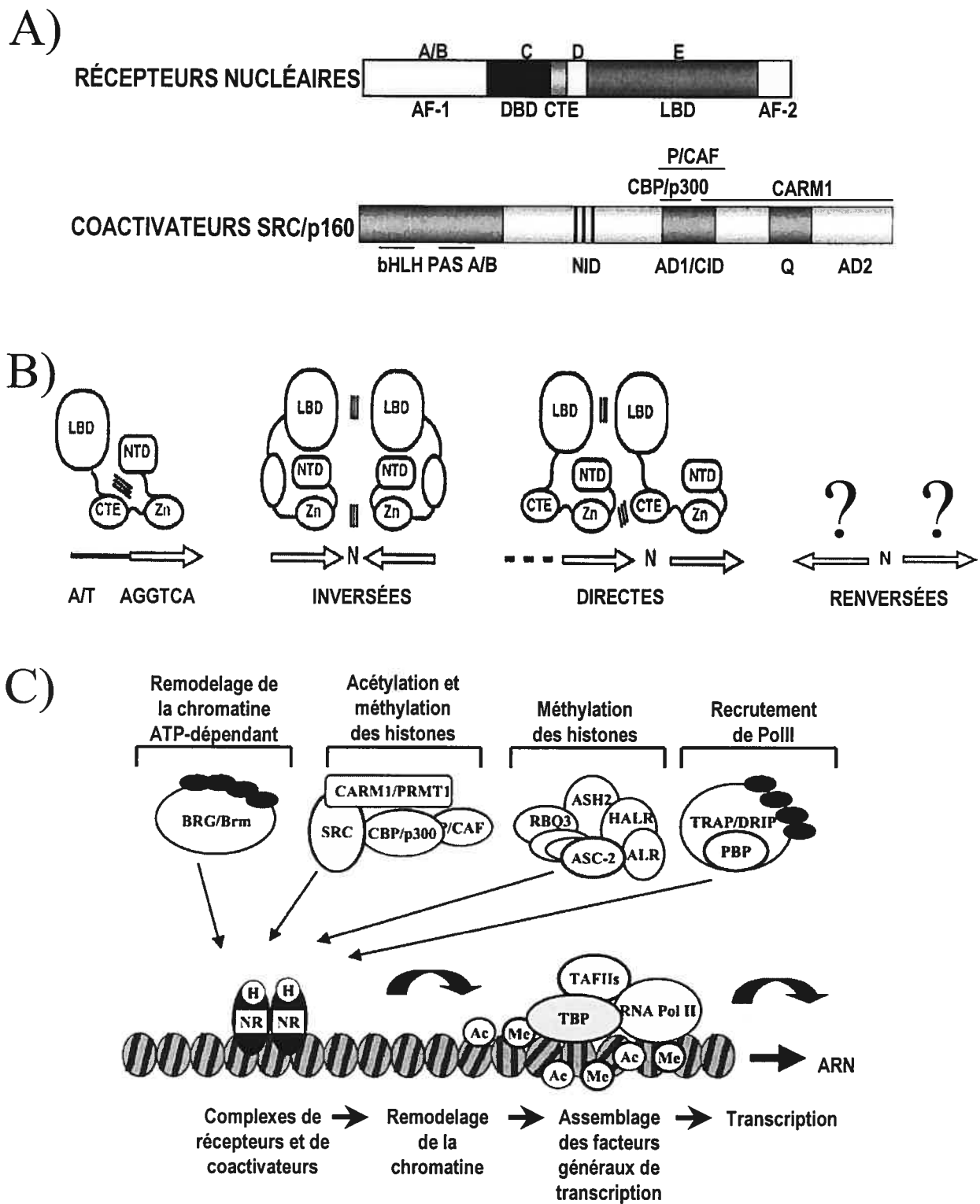


Figure 1.3: Récepteurs nucléaires et mécanismes d'action

### 1.3.1.2.2 Les récepteurs formant des hétérodimères avec RXR

Cette sous-classe de NRs comprend des récepteurs pour lesquels le ligand est généralement connu et d'une nature beaucoup plus diversifiée que les ligands des SHRs. Ces récepteurs ont en commun la nécessité de former des hétérodimères avec RXR, le récepteur à l'acide 9-cis rétinoïque (9cRA), pour médier leurs effets physiologiques. Parmi ceux-ci, il y a des récepteurs d'hormones non-stéroïdiennes importantes qui furent parmi les premiers NRs à être identifiés, tel le récepteur à l'acide rétinoïque tout-trans (RAR), le récepteur à l'hormone thyroïdienne (TR), de même que le récepteur de la vitamine D (VDR). Jusqu'au début des années 1990s, il était présumé que les récepteurs TR et RAR agissaient sous forme d'homodimères, suivant le paradigme établi pour les SHRs. Bien que TR puisse former des homodimères et lier des HRE organisés en répétitions inversées, cette liaison est de faible affinité et peu spécifique (492). Il fut donc vite évident que la présence d'un facteur accessoire, présent dans les extraits nucléaires, était requise pour la liaison efficace de RAR, TR et VDR à leurs éléments de réponse respectifs (163). Ce facteur a été identifié simultanément par plusieurs laboratoires comme étant RXR, récepteur à l'origine orphelin qui venait d'être cloné (163,308). Outre ces récepteurs classiques, il a été démontré que plusieurs récepteurs orphelins, tels les sous-familles PPARs et LXR, forment des hétérodimères avec RXR (46). Depuis son clonage, le rôle crucial de RXR en tant que 'maître régulateur' a été confirmé puisqu'il est au centre d'au moins 11 voies de signalisation (46). Étonnamment, les trois isoformes de RXR sont les trois seules protéines pouvant servir de partenaires à tous ces récepteurs. Enfin, cette sous-classe compte également au moins un membre très important chez les anthropodes, le récepteur à l'ecdysone (EcR), qui forme chez la drosophile des hétérodimères avec Ultraspiracle (USP), l'orthologue de RXR (307).

D'un point de vue mécanistique, plusieurs caractéristiques distinguent cette sous-classe de celle des SHRs. Ainsi, ces récepteurs sont pour la plupart exclusivement nucléaires et plusieurs occupent en permanence leurs éléments de réponse sur l'ADN (voir section 1.3.1.3). De plus, ces récepteurs lient des éléments de réponse qui sont organisés en répétitions directes espacées de 1 à 5 nucléotides (appelées DR1 à DR5), et non des séquences palindromiques comme les SHRs. Un grand nombre d'études ont permis d'établir quel type de DR est lié préférentiellement par les divers hétérodimères

RXR; le DR1 est lié par les PPARs et les homodimères RXR, le DR2 par RAR, le DR3 par VDR, le DR4 par TR et le DR5 par RAR (revue dans réf. (307)). Ainsi, l'espacement entre les répétitions directes confère une spécificité, qui explique en partie la diversité de la réponse transcriptionnelle, à ces hétérodimères qui partagent pourtant un partenaire commun et se lient essentiellement aux mêmes demi-sites (AGGTCA). De plus, de subtiles différences dans le motif hexamérique, de même que dans les nucléotides flanquant du côté 5', peuvent dramatiquement affecter l'activité des hétérodimères (307).

La disposition des éléments à répétitions directes entraîne une liaison asymétrique à l'ADN des hétérodimères. Ainsi, lorsque complexé à VDR, TR et RAR (sur des DR3, DR4 et DR5 respectivement), RXR occupe toujours le demi-site du côté 5', tandis que cette polarité est inversée pour les hétérodimères RXR/RAR sur les DR1 (307). Il est également intéressant de noter que l'activité transcriptionnelle des hétérodimères impliquant VDR, TR et RAR est indépendante de la présence du ligand de RXR. Plus encore, il a été démontré que la présence du partenaire empêche la liaison du 9cRA à RXR; celui-ci agit donc en tant que 'partenaire silencieux' (140,249). Récemment, il a été suggéré que dans ces cas, RXR participe tout de même au recrutement de coactivateurs, par un effet de 'ligand fantôme' qui induit un changement allostérique suite à la liaison du ligand au partenaire transcriptionnel (36). RXR est parfois un partenaire pleinement actif, tels que chez les hétérodimères RXR/PPAR et RXR/LXR où les deux récepteurs répondent à leurs ligands respectifs et la présence des deux ligands résulte en une activation synergique de la transcription (234). Enfin, dans le cas unique de l'interaction avec les récepteurs orphelins NGFI-B/Nur77 et Nurr1, la présence du ligand de RXR est absolument requise pour obtenir une activation transcriptionnelle par les hétérodimères (140,374).

### 1.3.1.2.3 Les récepteurs nucléaires orphelins

Le clonage des premiers récepteurs stéroïdiens au milieu des années 1980s incita de nombreux laboratoires à entreprendre des criblages à faible stringence, utilisant des régions conservées des NRs, afin d'identifier de nouveaux membres de ce qui s'annonçait déjà comme une large famille de facteurs de transcription. Ceci mena à l'identification de protéines présentant une homologie structurale avec les SHR au niveau du LBD et du

DBD, mais dont les ligands étaient inconnus, d'où la classification de ces facteurs en tant que récepteurs nucléaires 'orphelins'. Depuis l'identification des premiers membres il y a une quinzaine d'années (les ERRs, clonés par homologie au DBD de ER (160)), la sous-classe des orphelins n'a cessé de grandir et à ce jour, plus de 75% des NRs font partie de cette classe de protéine (134). De plus, les orphelins constituent la plus ancienne branche des NRs, beaucoup étant retrouvés chez les insectes et les nématodes, de même que chez certains eucaryotes primitifs, tels les protostomes et les deuterostomes, chez qui aucune autre sous-classe de NRs n'est représentée (134).

En comparant les propriétés structurales, de liaison à l'ADN et de dimérisation, il est possible de classer le NR orphelins en 4 catégories qui ne sont pas mutuellement exclusives. La première catégorie est composée de récepteurs orphelins pouvant former des hétérodimères avec RXR. Tel que mentionné dans la section précédente, ces récepteurs lient des répétitions directes ou symétriques (2 demi-sites en tête-à-queue) et ces hétérodimères peuvent être activés par le 9cRA, un agoniste de l'orphelin ou les deux. Cette famille compte de nombreux régulateurs importants du métabolisme et de la réponse aux xénobiotiques, tels que les récepteurs PPAR, LXR, CAR, FXR et PXR (46). Bien que la majorité des hétérodimères RXR/orphelins soient des activateurs transcriptionnels, une exception notable à signaler est celle des facteurs COUP-TFs. En effet, ceux-ci peuvent interagir avec RXR en absence de ligand et peuvent ainsi le titrer pour l'empêcher d'accomplir ses fonctions transcriptionnelles.

La deuxième catégorie est celle constituée par les NRs orphelins liant l'ADN sous forme d'homodimères. Contrairement aux SHRs, les homodimères d'orphelins peuvent lier des éléments de réponse organisés en répétitions directes ou palindromiques. Les récepteurs de cette catégorie sont typiquement de forts activateurs ou répresseurs transcriptionnels. De plus, ils exercent leurs fonctions de manière constitutive (à l'exception des homodimères de RXR), suggérant que la présence de ligands potentiels n'est pas requise. Par exemple, les récepteurs TLX et HNF-4, essentiels au développement et aux fonctions du télencéphale et du foie respectivement, sont des exemples typiques d'orphelins qui activent constitutivement la transcription en liant des répétitions directes (155). À l'opposé, les facteurs Rev-Erb et COUP-TF sont de puissants répresseurs transcriptionnels qui tous deux lient des sites DRs. Il a été démontré que les

COUP-TFs répriment l'activité basale, de même que la transcription induite, par plusieurs autres NRs tels RXR, RAR, VDR et TR grâce à leur aptitude à lier des répétitions directes espacées de 1 à 5 nt (DR1 à DR5) ainsi qu'à la présence d'un fort domaine de trans-répression C-terminal (155). Cette versatilité au niveau de la liaison à l'ADN ainsi que leur capacité à titrer RXR ont suggéré qu'en absence d'hormones, les facteurs COUP-TFs jouent un rôle de répresseur général de la transcription des gènes-cibles des NRs, ce qui a pour effet de rehausser l'effet transcriptionnel dû à la présence de ligands.

La troisième catégorie consiste en récepteurs orphelins liant leurs éléments de réponse sous forme de monomères. Comme ceux liant en homodimères, ces récepteurs sont constitutivement actifs, suggérant qu'il s'agit de 'vrais' orphelins. De nombreuses études mécanistiques ont montré que ce type de récepteurs reconnaît des éléments de réponse étendus, composés de l'héxamotif AGGTCA et de 1 à 3 nucléotides A/T flanquants du côté 5'. Tandis que, comme c'est le cas pour les autres NR, le DBD fait contact avec l'héxamotif, les nucléotides flanquants sont reconnus et liés par le CTE de ces récepteurs orphelins, ces quelques acides aminés conférant ainsi la spécificité de reconnaissance des éléments de réponse monomériques (159,509). De plus, des interactions intramoléculaires peuvent influencer la spécificité de liaison de ces récepteurs. Ainsi, les deux isoformes de ROR $\alpha$  reconnaissent différents sites monomériques, bien que leurs CTE soient identiques. Il a été montré que leurs domaines N-terminals respectifs orientent les doigts de zinc et le CTE différemment l'un par rapport à l'autre, modifiant ainsi leurs propriétés de liaison à l'ADN (159,314). Parmi les autres membres importants de cette catégorie, mentionnons SF-1 qui est un régulateur important de la stéroïdogénèse et du développement des glandes sexuelles (367).

La quatrième et dernière catégorie inclut les récepteurs orphelins atypiques qui ne contiennent qu'un LDB ou un DBD, les deux domaines qui constituent la signature des NRs. Par exemple, DAX-1 possède un LBD mais pas de DBD apparenté à celui des NRs. En fait, DAX-1 semble plutôt lier l'ADN en reconnaissant des structures en épingle à cheveux (155). Le récepteur SHP quant à lui n'est composé que d'un LBD et ne semble pas pouvoir lier l'ADN. SHP agit plutôt en hétérodimérisant avec de nombreux NRs en présence du ligand de ceux-ci. Cette interaction résulte en la répression des fonctions transcriptionnelles des NRs concernés puisque SHP inhibe la liaison à l'ADN du

partenaire et de plus SHP contient un fort domaine de trans-répression (155). Contrairement à DAX-1 et SHP, un groupe de 3 NRs retrouvés chez la drosophile, les facteurs knirps, knir1 et egon, possèdent un DBD bien conservé mais pas d'homologie avec les NRs en dehors de ce domaine (134). Ces observations suggèrent que le DBD et le LBD aient évolué indépendamment l'un de l'autre et soulignent la nature modulaire des NRs.

Finalement, mentionnons qu'étant donné l'importance et la diversité des rôles joués par les NRs orphelins, ces récepteurs constituent des cibles thérapeutiques alléchantes. De fait, ces NRs font depuis de nombreuses années l'objet d'intenses recherches dans le but de trouver des molécules pouvant moduler leurs activités, un processus appelé 'endocrinologie inverse'. Pour certains, quelques ligands endogènes potentiels ont été rapportés, mais la pertinence physiologique de ces interactions reste à être démontrée. Tel est le cas pour HNF-4 et SF-1, qui lient certains acyl-CoA thioesters et oxystérols respectivement (134). La quête de ligands s'est révélée plus fructueuse pour d'autres récepteurs et certains orphelins peuvent même être considérés comme 'adoptés'. Tel est le cas pour plusieurs des récepteurs formant des hétérodimères avec RXR. Par exemple, il a été montré que LXR $\alpha$  est activé par des dérivés oxydés du cholestérol, ce qui a mené à la découverte du rôle essentiel de ce récepteur en tant que 'senseur' dans la biosynthèse du cholestérol ainsi que dans la réaction inflammatoire (46). Ces observations ont poussé le développement d'agonistes de LXR $\alpha$  qui pourraient s'avérer utiles dans le traitement de l'athérosclérose et des troubles du cholestérol (214).

### 1.3.1.3 Mécanismes d'action et régulation de l'activité des NRs

Depuis le clonage des premiers NRs il y a une vingtaine d'années, une avalanche d'études (auxquelles l'auteur de ces lignes a cru bon de participer...) ont permis de raffiner notre compréhension des mécanismes sous-jacents à l'activité transcriptionnelle des NRs. Bien qu'il soit difficile d'établir un modèle général intégrant tous ces avancées et s'appliquant à l'ensemble de la superfamille, il est tout de même possible d'identifier quelques mécanismes majeurs par lesquels l'action des NRs est régulée. Ainsi, il y a d'abord la liaison de ligands, mécanisme simple et direct auquel s'ajoutent toutefois un ensemble d'événements moléculaires qui modulent l'activité transcriptionnelle des NRs,

tels que des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, etc.) et des interactions directes entre NRs et d'autres facteurs de transcription. Ces mécanismes peuvent s'appliquer individuellement ou tous à la fois, contribuant ainsi à la spécificité transcriptionnelle des NRs et leur permettant d'intégrer plusieurs signaux extracellulaires pour le réglage fin de l'expression génique.

#### 1.3.1.3.1 La liaison de ligands

La liaison d'hormones ou d'autres petites molécules liposolubles au LBD de nombreux NRs déclenche leur fonction transcriptionnelle et leur permet ainsi de jouer leurs rôles de médiateurs intracellulaires en assurant un lien direct entre les signaux extracellulaires et la réponse transcriptionnelle du tissu-cible. Précisons que la nature de ces ligands n'est pas nécessairement endocrine puisqu'il peut s'agir d'un xénobiotique ou d'un produit intracellulaire tel un intermédiaire d'une voie métabolique. C'est le cas par exemple pour PXR et CAR, deux récepteurs qui, une fois activés par une variété de xénobiotiques, vont induire la transcription de plusieurs protéines de la voie de désintoxication (413).

Le mécanisme classique implique un récepteur complexé à des chaperones moléculaires, présent dans un état latent dans le cytoplasme. Ces chaperones maintiennent le récepteur dans un état inactif mais compétent à lier le ligand. Ainsi, l'absence de hsp90 n'entraîne pas l'activité constitutive de GR mais plutôt une forte diminution de la réponse transcriptionnelle due à l'hormone (49). La liaison du ligand entraîne la migration du récepteur vers le noyau, sa dimérisation et sa liaison sur l'élément de réponse. Une fois liés, les SHRs recrutent des complexes protéiques contenant divers coactivateurs transcriptionnels possédant une activité enzymatique qui modifie la topologie de la chromatine, notamment une activité d'histones acétyltransférase (HAT) et histones méthyltransférase (HMT). L'acétylation des histones est requise au recrutement du complexe SWI/SNF qui possède une activité hélicase ATP-dépendante. Ce complexe organise les nucléosomes dans une conformation permettant l'initiation de la transcription. Bien qu'essentielle, cette décondensation de la chromatine n'est pas suffisante pour activer la transcription du gène-cible puisque la dissociation du complexe HAT et son remplacement par un deuxième complexe appelé 'Médiateur' sont

également nécessaires. Ce complexe Médiateur (aussi appelé TRAP/DRIP/ARC), composé de 23 sous-unités conservées de la levure à l'humain, contacte la machinerie de la transcription basale et sert donc d'interface entre les NRs et l'ARN pol II (33,318).

Ce mécanisme s'applique surtout aux SHRs et diffère de celui de la majorité des autres NRs, notamment de celui des hétérodimères RXR/NR. En effet, beaucoup exercent leur fonction de transactivation en agissant en trois étapes. D'abord, il y a une étape de répression qui caractérise le récepteur-*apo*. Ainsi, contrairement aux SHRs, la plupart de ces NRs se retrouvent en permanence au promoteur et recrutent un complexe corépresseur. Celui-ci comprend des enzymes possédant une activité d'histones déacétylases (HDAC), qui favorisent la condensation de la chromatine et maintiennent le gène dans un état réprimé. La liaison du ligand entraîne l'étape de dérpression du gène en induisant un changement conformationnel du LBD qui mène à la dissociation du complexe corépresseur et au recrutement subséquent du complexe coactivateur. La troisième étape, soit l'activation proprement dite, consiste en le remplacement du complexe coactivateur par le complexe Médiateur (406).

Quant aux NRs orphelins, il est difficile de définir un mécanisme d'action général. Ainsi, tandis que certains sont cytoplasmiques, d'autres sont nucléaires et parfois même liés en permanence à leur élément de réponse. Ce sont surtout les étapes préliminaires qui varient, le consensus étant que tous doivent recruter séquentiellement les complexes coactivateur et Médiateur pour activer la transcription (155). De plus, de nombreux NRs orphelins activent constitutivement la transcription, ce qui suggère qu'il s'agit de 'vrais' orphelins et que la liaison de ligands n'est pas une condition sine qua non à l'activité transcriptionnelle des NRs. De fait, il a même été montré pour CAR $\beta$  que le ligand physiologique androstanol peut désactiver le récepteur, en induisant le relâchement du complexe NR/coactivateurs constitutivement assemblé au promoteur (139). La répression transcriptionnelle peut elle s'effectuer par divers mécanismes qui seront abordés dans le cas de GR dans la section 1.4.

Mentionnons enfin que notre compréhension de ces mécanismes est en constante évolution, notamment avec l'avènement de technologies permettant l'étude en temps réel de l'action des NRs. Ainsi, l'utilisation de techniques de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) a récemment permis de démontrer que GR, de même



que le complexe coactivateur, ne réside que 5 secondes en moyenne sur le promoteur MMTV, contrairement à l'ARN pol II qui y reste plus de 10 minutes. De plus, ces études ont montré que GR retourne cycliquement au promoteur en présence continue de Gc, ce qui tranche avec la conception classique d'occupation statique de l'élément de réponse durant quelques dizaines de minutes (32,320). Même la nécessité du ligand pour la liaison à l'ADN des SHRs a récemment été remise en cause. En effet, il a été montré, par utilisation combinée d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et de FRAP, que ER $\alpha$  s'associe cycliquement au promoteur du gène pS2 même en absence d'œstrogènes, ceux-ci ralentissant plutôt la fréquence des cycles (399). Dans le cas de ER $\alpha$  donc, il semblerait que l'activité transcriptionnelle dépende principalement de l'efficacité et de la fréquence du recrutement du complexe coactivateur au promoteur induit par le ligand plutôt que de la liaison à l'ADN du récepteur.

#### 1.3.1.3.2 Les modifications covalentes

Contrairement aux hormones liposolubles, les hormones peptidiques et les cytokines régulent l'expression génique en agissant via des récepteurs membranaires qui relaient ces signaux au travers de diverses voies de transduction du signal. La cellule est constamment soumise à une variété de signaux extracellulaires divergents et souvent opposés, elle doit donc balancer l'influence relative de ces signaux pour générer une réponse transcriptionnelle appropriée. Les modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation offrent à la cellule un moyen rapide et réversible d'intégrer les diverses voies de signalisation pour ajuster l'expression génique, et ce en modulant l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription.

Les NRs sont des cibles majeures des kinases activées par de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Ce type de régulation est complexe et peut aboutir à des effets activateurs ou répresseurs, en influençant pratiquement toutes les étapes du mécanisme d'action des NRs. Par exemple, les MAPKs peuvent réguler la fonction de nombreux NRs en absence de ligand (voir références dans (253,431)). Ainsi, les activités transcriptionnelles de SF-1, de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en réponse à EGF, de même que celle de PPAR $\alpha$  suite à la stimulation par l'insuline, sont rehaussées suite à la phosphorylation par Erk1/2 de leurs AF-1. Pour ER $\beta$  et SF-1, il a été montré que la phosphorylation favorise

le recrutement de coactivateurs de la famille SRC/p160 (174,470). Inversement, la voie Erk1/2 réprime la transcription médiée par GR, PR, PPAR $\gamma$  et VDR. Dans les deux derniers cas, la phosphorylation entraîne un effet à distance car elle n'affecte pas directement la fonction du domaine modifié. Ainsi, la modification de l'AF-1 de PPAR $\gamma$  par divers facteurs de croissance diminue l'affinité du LBD pour le ligand thiazolidinedione, tandis que la répression par Erk1/2 de l'activité induite par la vitamine D<sub>3</sub> est le résultat de la phosphorylation du partenaire RXR et non de VDR directement (432,446). Cette communication interdomaine est probablement due à un changement conformationnel induit par la phosphorylation. Il est à noter que dans tous ces cas, les kinases Erk1/2 ciblent le domaine AF-1 des NRs en question.

JNK (ou SAPK) est une autre MAPK ciblant l'AF-1 des NRs pour en moduler l'activité. Ainsi, il a été rapporté que JNK inhibe l'action de PPAR $\gamma$  par le même mécanisme que Erk1/2 (66). La voie JNK atténue également l'activité de GR en favorisant l'export du récepteur du noyau vers le cytoplasme (202), tandis qu'elle inhibe l'action de RXR $\alpha$  en favorisant sa dégradation par le complexe du protéosome 26S (271). Enfin, une autre MAPK, p38, cible également certains NRs pour en augmenter l'activité mais étonnement par des mécanismes opposés. Ainsi, tandis que la phosphorylation de l'AF-1 de RAR $\gamma_2$  par p38 cible ce récepteur vers la dégradation par le protéosome 26S (154), la même kinase augmente la stabilité de TR. Dans ce dernier cas, la phosphorylation se fait sur de multiples résidus et semble également favoriser le recrutement du coactivateur SRC-1 par TR (87).

Une autre voie de signalisation importante capable de moduler l'activité des NRs est celle de l'AMPc/PKA. Tout comme les MAPKs, la régulation par PKA est complexe et semble agir à plusieurs niveaux. Ainsi, la phosphorylation directe du DBD par PKA réprime l'activité en inhibant la liaison en dimère de HNF4 et ER $\alpha$ , ou la liaison monomérique de TR $\alpha_1$  et v-erb A. À l'opposé, PKA stabilise la liaison de GR, MR et des PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  à leurs éléments de réponse respectifs, augmentant ainsi leur capacité à transactiver la transcription (pour revue voir (96,431)). Dans le cas de TR $\beta$ , PKA rehausse son activité en stabilisant la protéine et en favorisant l'hétérodimérisation avec RXR (38,467). PKA rehausse également la transcription induite par l'orphelin SF-1 par de multiples mécanismes. Il a été démontré que la voie de l'AMPc/PKA augmente la

stabilité de la protéine (7), favorise la liaison à l'ADN (452) et potentialise l'effet des coactivateurs SRC-1 et p/CIP (54). Quant à la dépendance face à la présence du ligand, elle varie selon le récepteur. Ainsi, PKA rehausse l'activité de ER $\alpha$ , MR, AR, PR (poulet), RXR, RAR et des PPAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , de manière ligand-indépendante. De plus, la phosphorylation par PKA de ces NRs rehausse l'activité induite par leurs ligands. Par contre, GR et le récepteur PR humain ne peuvent être activés par ce mécanisme en absence de ligand, bien que la voie de l'AMPC/PKA rehausse l'activité induite par l'hormone de ces récepteurs (96,431). Enfin, mentionnons que de nombreuses autres kinases peuvent cibler les NRs afin d'en moduler l'activité par divers mécanismes. Le récepteur ER est une cible récurrente, avec notamment les cdk2, cdk7 et pp90rsk1, qui toutes rehaussent l'activité indépendante du ligand en phosphorylant le domaine AF-1 (98). Signalons aussi l'exemple de PKC $\theta$  qui, en réponse à l'activation du récepteur des cellules T (TCR), phosphoryle RXR et TR, favorisant ainsi leur interaction avec le corépresseur SMRT (198).

La phosphorylation sert de signal de reconnaissance pour un autre type de modification post-traductionnelle, soit l'ubiquitination. Récemment, de nombreuses études ont impliqué la voie ubiquitine-protéosome dans la régulation hormono-dépendante des niveaux de récepteurs nucléaires, de même que dans la modulation de leur activité transcriptionnelle. Lorsqu'une protéine est ciblée pour la dégradation par le protéosome, des chaînes d'ubiquitine (une protéine de 76 aa, 8,6 kD) sont liées de manière covalente à des résidus lysines de la protéine cible. Cette polyubiquitination marque les protéines pour une reconnaissance par le protéosome 26S. Dans l'ensemble, ces études ont montré que les récepteurs ER $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , TR, GR, RAR $\alpha$  et  $\gamma$ , RXR $\alpha$  et PR sont dégradés par le protéosome 26s suite à la liaison des ligands respectifs, tandis les récepteurs VDR et AR sont quant à eux stabilisés par leurs ligands (pour revue voir référence (298)). Dans le cas de VDR, la liaison au ligand vitamine D<sub>3</sub> diminue le niveau d'ubiquitination la dégradation par le protéosome du récepteur (284). Bien qu'il ait été montré que l'activité transcriptionnelle de GR est fortement rehaussée en présence d'inhibiteurs du protéosome (493), il est très important de noter que la dégradation des NRs n'est pas nécessairement associée à une régulation négative de l'activité

transcriptionnelle. Au contraire, la dégradation par le protéosome est même essentielle à l'activité de ER $\alpha$ , PR et TR (298).

Enfin, mentionnons que l'acétylation et la sumoylation des résidus lysines sont deux autres types de modifications post-traductionnelles pouvant moduler l'activité des NRs. SUMO-1 est un peptide apparenté à l'ubiquitine qui est souvent retrouvé conjugué à différents types de protéines pour en contrôler la distribution subcellulaire de même que la stabilité (141). Contrairement à l'ubiquitination, la conjugaison de SUMO-1 ne condamne pas normalement les protéines à la dégradation protéosomale. L'exception vient toutefois de GR, dont la sumoylation le dirige vers la dégradation par le protéosome 26S, ce qui rehausse son activité dépendante du ligand (268). À l'inverse, la sumoylation inhibe l'activité induite par l'hormone de AR et de PR, dans ce dernier cas en favorisant l'autoinhibition de ses propriétés transcriptionnelles (3,385). À ce jour, seul l'acétylation de deux NRs, ER $\alpha$  et AR, a été rapporté. Tandis que l'acétylation de la région charnière D de ER $\alpha$  par p300 inhibe sa sensibilité au ligand (495), l'acétylation de AR augmente son activité transcriptionnelle en inhibant l'interaction avec le corépresseur N-CoR tout en favorisant le recrutement des coactivateurs SRC-1 et p300 en présence du ligand (143).

### 1.3.1.3.3 Les interactions protéines-protéines

L'interaction directe entre différentes classes de régulateurs est un thème récurrent en transcription et les NRs n'échappent pas à cette règle. Le cas le mieux étudié est la répression mutuelle entre GR et les facteurs AP-1 et NF- $\kappa$ B. Cet antagonisme est très important, notamment pour médier les effets anti-inflammatoires des Gc qui inhibent la transcription de nombreux gènes induits par les cytokines (421). Bien que les mécanismes impliqués semblent être complexes et s'opérer à plusieurs niveaux, une partie de l'antagonisme entre GR et AP-1/ NF- $\kappa$ B implique une transrépression qui ne requiert pas la liaison à l'ADN de GR et qui est probablement due à une interaction directe protéine-protéine (voir section 1.4.1 pour plus de détails).

ER $\alpha$  peut également moduler l'activité des facteurs AP-1, mais contrairement à GR, cette interaction rehausse généralement la transcription induite par des dimères Jun/Jun ou Jun/Fos. Il a été montré que le récepteur apo-ER $\alpha$  et c-Jun (ou JunB) interagissent physiquement et il semble qu'en présence d'œstrogènes, cette interaction

stabilise un complexe contenant le coactivateur SRC-2 (462). ER $\alpha$  et SF-1 interagissent fonctionnellement tous deux avec CREB, un autre facteur à motif 'leucine zipper'. L'interaction entre CREB et ER $\alpha$  médie la synergie, observée sur plusieurs gènes, entre les voies de signalisation dépendantes des œstrogènes et de l'AMPc (267), tandis que l'interaction SF-1/CREB régule la transcription du gène Inhibine  $\alpha$  (200). Dans ces deux cas, le recrutement coopératif du coactivateur CBP/p300 a été invoqué pour expliquer la synergie transcriptionnelle.

Les NRs peuvent également interagir avec des facteurs à expression restreinte tels certains bHLHs et homéoprotéines. C'est le cas de SF-1 qui, tel que mentionné dans la section 1.3.2.1, coopère avec Pitx1 pour activer la transcription des gènes LH $\beta$  et MIS dans l'hypophyse (475). De plus, l'interaction directe entre les hétérodimères TR/RXR et Pit-1 a été invoquée pour expliquer la synergie observée sur le promoteur du gène GH (363). Enfin, mentionnons qu'un cas d'interaction entre un NR et un bHLH a été rapporté. En effet, RXR et MyoD interagissent à travers leurs DBD respectifs pour activer en synergie plusieurs gènes induits par l'acide rétinoïque au cours de la myogenèse (142).

### 1.3.2 Les récepteurs nucléaires orphelins de la sous-famille Nur

NGFI-B (également connu sous le nom de Nur77) a été cloné par de nombreux groupes en tant que gène précoce inductible par une variété de stimuli, tels le sérum, les facteurs de croissance et les agents mitotiques (177). Par la suite, deux autres récepteurs apparentés à NGFI-B ont été identifiés : Nurr1 (Nur-related factor 1) cloné en tant que facteur de transcription spécifique au cerveau (265) ainsi que NOR-1 (Neuron-derived orphan receptor) cloné par homologie avec le DBD des NRs à partir d'une banque de neurones en cours d'apoptose (352). Nurr1 et NOR-1 sont très homologues à NGFI-B dans la région des deux doigts de zinc formant le domaine de liaison à l'ADN (soit 92 % et 91 % d'identité), tandis que l'homologie est moindre dans les domaines N et C terminaux (27-25 % et 67-54 % respectivement). Leur LBD est relativement bien conservé mais aucun ligand n'a été identifié jusqu'à maintenant.

#### 1.3.2.1 Patrons d'expression et rôles physiologiques des facteurs Nur

Les patrons d'expression de NGFI-B et de Nor-1 sont assez similaires au cours du développement, celui de NGFI-B étant plus tardif, et on les retrouve dans la plupart des tissus (540). Nurr1 est quant à lui plus restreint au cerveau où il est exprimé précocement avec Nor-1, mais selon des patrons d'expression complémentaires (540). De plus, cette famille joue un rôle important dans le contrôle de l'apoptose des thymocytes induite par stimulation du récepteur des cellules T (TCR). En effet, NGFI-B et NOR-1 sont rapidement et fortement induits suite à l'activation des thymocytes immatures et il appert que ces deux facteurs jouent à ce niveau des rôles fonctionnellement redondants (88). Les signaux induits par la stimulation du TCR convergent sur ces deux récepteurs orphelins et incluent la voie de la protéine kinase C ainsi que des signaux de la voie calcique qui sont bloqués par l'immunosuppresseur cyclosporine A (535). Si l'activité de NGFI-B est bloquée par l'expression d'un mutant dominant négatif ou avec un transcrit antisens, la stimulation du TCR n'entraînera plus l'apoptose des cellules T (296,517). L'importance des membres de la famille Nur dans l'apoptose des thymocytes a été confirmée *in vivo*; toutefois, aucun gène-cible de NGFI-B ou de NOR-1 n'a encore été identifié dans ce système (65,88).

Outre les lymphocytes T, NGFI-B est également impliqué dans l'apoptose induite par divers stimuli dans de nombreux autres types cellulaires, notamment les lymphocytes B, les macrophages ainsi que divers neurones (513). Dépendamment du stimulus, les mécanismes d'action de NGFI-B impliqués pour induire l'apoptose peuvent varier. Ceci est bien illustré dans le cas des cellules LNCaP qui dérivent d'un cancer de la prostate. En effet, il a été montré que suite au traitement de ces cellules par le rétinoïde synthétique AHPN, NGFI-B est transloqué du noyau vers la mitochondrie, ce qui cause le relâchement du cytochrome C dans le cytoplasme et déclenche le programme apoptotique (281). Fait à noter, ces événements ne requièrent pas le DBD de NGFI-B et semblent donc indépendants de ses fonctions transcriptionnelles. Par contre, l'apoptose de ces mêmes cellules LNCaP induite par le TPA nécessite l'activité transcriptionnelle de NGFI-B qui agit en induisant le gène E2F1 (331).

Les membres de la famille Nur seraient également impliqués dans la régulation de l'axe HPA. En effet, la synthèse de l'ARNm des facteurs Nur est fortement induite suite à la stimulation par diverses sources de stress dans les neurones du PVN de l'hypothalamus

produisant l'hormone CRH, ainsi que dans la région corticale des glandes surrénales. Dans ces dernières, NGFI-B, Nurr1 et NOR-1 ont tous trois été impliqués conjointement avec SF-1 dans le contrôle de l'expression de plusieurs gènes stéroïdogéniques, notamment de la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein), de la P450c17 (17-hydroxylase) et surtout de la P450c21 (21-hydroxylase) qui est l'enzyme limitante dans la stéroïdogénèse (112,137,452,510,542). Au niveau des neurones du PVN, NGFI-B et Nurr1 ont été impliqués dans la régulation de l'expression du gène CRH puisqu'ils lient le promoteur sur un site NBRE et que Nurr1 est capable d'activer la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène CRH (335). Les facteurs Nur ont également été impliqués dans la régulation hormonale de l'expression hypophysaire du gène de POMC (335,379,380). En effet, les signaux transcriptionnels positifs du CRH et négatifs des Gc semblent converger sur les facteurs Nur. L'implication des facteurs Nur dans la régulation hormonale de POMC sera traitée dans la section 1.4, ainsi que dans les chapitres 3, 4 et 5 de cette thèse.

Bien que NGFI-B semble impliqué dans de nombreux processus cellulaires, l'inactivation du gène NGFI-B n'a produit aucun phénotype marqué (275), ce qui suggère que sa fonction ne soit pas unique. Il est très probable que les autres membres de la famille jouent des rôles partiellement redondants avec ceux de NGFI-B, ce qui pourrait expliquer l'absence de phénotype des souris NGFI-B<sup>-/-</sup>. Ainsi, il a été montré que l'expression de Nurr1 est triplée dans ces souris et que Nor-1 peut compenser pour NGFI-B dans l'apoptose des cellules T (88). Deux groupes ont rapporté des résultats très divergents concernant l'inactivation du gène *NOR-1*. En effet, une première publication a fait état d'un phénotype très subtil des souris NOR-1<sup>-/-</sup>, dont la conclusion majeure est que NOR-1 est essentiel à la prolifération des canaux semi-circulaires de l'oreille interne (383). Récemment toutefois, une deuxième étude a imputé un rôle essentiel pour NOR-1 dans le développement précoce. En effet, leurs souris NOR-1<sup>-/-</sup> meurent au jour e8, avant la fin de la gastrulation, et présentent de nombreux défauts de prolifération et de patterning (118).

Par contre, l'inactivation de Nurr1 présente un phénotype frappant et sans appel : ces souris n'ont pas de système dopaminergique mésencéphalique (539). Plusieurs gènes-cibles de Nurr1 ont été identifiés dans le système dopaminergique, notamment à l'aide

des souris *Nurr1*<sup>-/-</sup>. Ainsi, *Nurr1* régule l'expression de la tyrosine hydroxylase, l'enzyme-clé de la voie de biosynthèse de la dopamine, et ce de manière dépendante du contexte cellulaire (230,417). *Nurr1* semble aussi réguler plusieurs autres étapes de la biosynthèse et de la sécrétion de la dopamine. Ainsi, *Nurr1* module la transcription de l'enzyme décarboxylase AADC, de la protéine de transport vésiculaire VMAT2, ainsi que du transporteur membranaire de la dopamine DAT (180,416). Notons aussi que *Nurr1* est essentiel à l'expression du récepteur tyrosine kinase Ret, un récepteur de neurotrophines, dans les neurones dopaminergiques (494). Il est intéressant de noter que dans ces neurones, qui dégèrent dans la maladie de Parkinson, *Nurr1* est le seul membre de la famille à être exprimé. L'hypothèse d'un rôle de *Nurr1* dans cette maladie a été renforcée par l'identification dans le gène *NURR1* de mutations associées avec des formes héréditaires de la maladie de Parkinson (269). Ces mutations semblent affecter la stabilité de la protéine ainsi que sa capacité à transactiver le gène de la tyrosine hydroxylase (voir plus bas). Ces observations ont incité plusieurs groupes à tenter la fabrication *in vitro* de neurones dopaminergiques. Ceci a été réussi en surexprimant *Nurr1* dans des cellules souches neuronales (229,491). Toutefois, la surexpression de *Nurr1* n'est pas en soi suffisante pour induire le phénotype dopaminergique à partir de cellules souches; il faut pour cela traiter ces cellules avec un extrait d'astrocytes de type1 provenant du mésencéphale ventral (491). Ces manipulations ont été faites dans l'optique de greffer ces neurones à des patients atteints de Parkinson. Ceci a été réussi dernièrement sur des souris ayant subies l'ablation pharmacologique du système dopaminergique (229). Dans ces souris, les neurones greffés, fabriqués *in vitro* en surexprimant *Nurr1*, se comportent comme des neurones dopaminergiques endogènes.

### 1.3.2.2 Mécanismes d'action des facteurs Nur

Les facteurs Nur ont la particularité de pouvoir lier l'ADN sous forme de monomères, d'hétérodimères avec RXR, de même qu'en hétéro- ou homodimères entre membres de la famille. Outre cette versatilité mécanistique, l'activité des facteurs Nur est modulée par diverses modifications post-traductionnelles et interactions avec d'autres régulateurs transcriptionnels.



### 1.3.2.2.1 Liaison à l'ADN des facteurs Nur

Au sein de la superfamille des NRs, NGFI-B a été le premier récepteur nucléaire pour lequel il a été montré que l'activation de la transcription pouvait être due à un monomère (508,511). La séquence d'ADN spécifiquement reconnue par NGFI-B a été identifiée par sélection génétique dans la levure et désignée NBRE (pour NGFI-B response element). Cette séquence de huit paires de bases contient un motif de reconnaissance conservé pour plusieurs récepteurs nucléaires (309), soit l'hexanucléotide AGGTCA, précédé par deux adénines (A). Ces deux dernières sont très importantes et la structure cristallographique du LBD de NGFI-B lié au NBRE a montré que ces adénines sont reconnues par le CTE de NGFI-B (321,511). Nurr1 et NOR-1 peuvent également lier le NBRE *in vitro* et activer la transcription d'un gène rapporteur contenant cette séquence (540). On a d'abord cru qu'il s'agissait du seul mode d'action des facteurs Nur et ce mécanisme a été présenté comme un nouveau paradigme d'action de cette classe de facteurs. Il fut donc étonnant de découvrir que DHR38, l'homologue de NGFI-B chez la drosophile, peut interagir fortement avec *usp*, l'homologue du récepteur de l'acide 9-cis rétinolique RXR. Peu après, il fut démontré que la formation d'hétérodimères NGFI-B/RXR est possible (374). Ces hétérodimères lient des séquences d'ADN formées de répétitions directes espacées par cinq nucléotides, désignées DR5 dans la nomenclature habituelle (309). Fait unique en comparaison des autres hétérodimères formés par RXR, l'activité transcriptionnelle de NGFI-B/RXR dépend de la présence de l'acide 9-cis rétinolique (374). Il semble que cet hétérodimère puisse activer la transcription via un élément NBRE, et dans ce cas, NGFI-B serait le seul partenaire de dimérisation à lier l'ADN. Notons que ces propriétés ne s'appliquent pas à NOR-1 qui ne peut interagir avec RXR (540).

Récemment, notre équipe a identifié un nouveau mécanisme d'action pour les facteurs Nur. Nous avons montré que des homodimères de NGFI-B peuvent lier un nouvel élément de réponse aux facteurs Nur, le NurRE (Nur response element). Cet élément a été identifié dans la région régulatrice du gène POMC (379). Le NurRE a une structure palindromique constituée de deux demi-sites de huit paires de bases chacun, tous deux apparentés au NBRE (concordance de six paires de bases sur huit). *In vitro*, le NurRE lie préférentiellement des dimères de NGFI-B et cette liaison, de même que la

réponse transcriptionnelle au CRH, nécessite la présence des deux demi-sites (379). Six nucléotides séparent les demi-sites, ce qui fait donc du NurRE un élément ER10 selon la nomenclature habituelle (309). Le NurRE est beaucoup plus sensible à l'action de NGFI-B que le NBRE, activant jusqu'à cinquante fois plus la transcription de gènes rapporteurs. De même, il est plus sensible aux signaux physiologiques tels la stimulation par le CRH de cellules AtT-20 ou le déclenchement du programme apoptotique par activation du TCR d'hybridomes (379). Enfin, mentionnons que le chapitre 2 de cette thèse portera sur la formation d'hétérodimères entre membres de la famille Nur sur le NurRE.

#### **1.3.2.2 Modulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur**

Il est généralement admis que la capacité d'un récepteur nucléaire à activer la transcription lui est conférée par la liaison de son ligand. Toutefois, dans le cas de la famille Nur, la nature et même l'existence d'un tel ligand restent équivoques. La nature de ce ligand est d'autant plus énigmatique que des expériences ont montré que NGFI-B est transcriptionnellement actif même en absence complète de sérum; ceci suggère donc que, s'il existe un ligand, ce pourrait être une molécule intracellulaire. Des études structurales récentes semblent même indiquer que les facteurs Nur sont des orphelins 'purs'. En effet, la structure cristallographique du LBD de Nurr1 et de DHR38 a révélé l'absence de la cavité classiquement retrouvée chez les autres NRs où se logent normalement les ligands. En effet, plusieurs résidus hydrophobiques projettent leurs chaînes latérales dans cette région, rendant l'accès d'un ligand à cette 'poche' impossible à cause de l'encombrement stérique. De plus, ces études ont montré que le LBD des facteurs Nur ne contient pas de site de liaison classique aux coactivateurs (28,496). Mentionnons qu'il a été rapporté que le 6-mercaptopurine (6-MP), une petite molécule liposoluble largement utilisée pour traiter divers types de leucémie, est capable de moduler l'activité transcriptionnelle de NOR-1 et de Nurr1. Toutefois, dans les deux cas, c'est le domaine N-terminal qui semble médier l'activité du 6-MP et celui-ci ne semble pas lier directement le récepteur (359,499).

Malgré l'absence apparente de ligand naturel, les facteurs Nur sont au centre de mécanismes intracellulaires finement régulés et dont l'activation semble dépendre de modifications post-traductionnelles (136,176). Ainsi, les facteurs Nur sont des

phosphoprotéines ciblées par de multiples voies de signalisation intracellulaire. Par exemple, il a été montré que des sérines localisées en amont des doigts de zinc dans le DBD de NGFI-B, particulièrement la sérine 316 (Sér316), sont sujettes à phosphorylation et que cette phosphorylation inhibe la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de NGFI-B (111,184). Ainsi, le traitement de cellules PC12 avec le facteur neurotrophique NGF (Nerve Growth Factor) induit la phosphorylation de la Sér316, ce qui réprime l'activité transcriptionnelle de NGFI-B (220). De plus, le domaine N-terminal de NGFI-B est fortement phosphorylé dans les cellules COS, ce qui semble requis pour l'activité transcriptionnelle du récepteur, tandis que le domaine C-terminal est dépourvu de phosphorylation (111). Dans les surrénales, l'activation de NGFI-B par l'ACTH semble corrélée avec une phosphorylation accrue du domaine N-terminal de la protéine et une déphosphorylation de la Sér316 (111,371).

Bien que la nature exacte des kinases et phosphatases médiant ces signaux intracellulaires reste largement inconnue, plusieurs études ont identifié des enzymes capables de modifier les facteurs Nur et d'ainsi moduler leurs activités transcriptionnelles. Par exemple, PKA et pp90<sup>rsk</sup> peuvent phosphoryler la Sér316 *in vitro* (111,184). De plus, le NGF induit une kinase qui phosphoryle la Sér316 dans les cellules PC12, et cette kinase semble être identique à la Fos kinase et à la pp90<sup>rsk2</sup> (185,454). La kinase Akt (PKB) cible également la Sér316 *in vitro* et *in vivo*, ce qui inhibe les effets pro-apoptotiques de NGFI-B dans les fibroblastes et les lymphocytes T (313,372). Outre son action sur la Sér316 dans les cellules PC12, le NGF induit la phosphorylation de la sérine 105 de NGFI-B. Cette phosphorylation, médiée par la voie MAPK, induit l'exportation de NGFI-B (et de son partenaire RXR) du noyau vers le cytoplasme (221). Nurr1 est aussi ciblé par des kinases et il a récemment été démontré que le récepteur tyrosine kinase Ret réprime l'activité transcriptionnelle de Nurr1 dans les cellules 293. Cet effet répressif est médié par la voie MAPK et dépend du LBD de Nurr1, dont la phosphorylation semble induire le passage d'une conformation active à un état inactif (496). Mentionnons aussi que Nurr1 peut être sumoylé sur deux résidus lysines et que ces modifications régulent différenciellement son activité : tandis que la sumoylation de la lysine 91 inhibe son activité, celle de la lysine 577 la rehausse (150).

Les facteurs Nur interagissent avec plusieurs autres protéines qui ainsi modulent l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs. Par exemple, outre RXR (voir plus haut), les facteurs Nur interagissent avec d'autres NRs, tels COUP-TF et GR (voir section 1.4.1). Dans ces deux cas, l'activité transcriptionnelle des facteurs est réprimée (311,518). NGFI-B interagit aussi avec la protéine promyélocytaire PML, ce qui inhibe l'activité de liaison à l'ADN du NR (520). Le même phénomène est observé entre NGFI-B et le domaine intracellulaire du récepteur Notch-1 (209). Cette interaction est très intéressante car elle pourrait expliquer l'effet anti-apoptotique de Notch-1 lors de l'activation du TCR. PIAS $\gamma$ , une SUMO-E3 ligase, interagit avec Nurr1 et réprime son activité sur le NBRE, et ce de manière indépendante de la sumoylation de Nurr1 (150). L'activité transcriptionnelle de NOR-1 est régulée notamment par l'homéoprotéine Six3, qui agit différemment selon le contexte cellulaire. En effet, tandis que Six3 réprime l'activité de NOR-1 dans des chondrocytes (355), elle rehausse les effets transcriptionnels de ce NR dans la lignée cellulaire MCF-7, dérivée d'une tumeur de glande mammaire (257).

Contrairement à la majorité des autres NRs, on a cru un certain temps que les facteurs Nur ne recrutent pas de cofacteurs transcriptionnels classiques (voir section 1.3.3). Ceci est surtout venu de l'observation que les facteurs SRCs ne rehaussent pas l'activité Nur sur le NBRE (73), et que classiquement les coactivateurs sont recrutés par l'AF-2 des NRs, un domaine généralement moins important pour les facteurs Nur que l'AF-1. Les travaux qui feront l'objet du chapitre 3 de cette thèse ont donc pour la première fois identifié les facteurs SRCs et CBP/p300 comme des coactivateurs spécifiques aux dimères de facteurs Nur en réponse à l'activation de la voie de l'AMPc. Au même moment, un groupe a rapporté que la CamK IV module le recrutement du coactivateur ASC-2 et du corépresseur SMRT par NGFI-B (445). Depuis, le recrutement des coactivateurs SRCs, CBP/p300, p/CAF et DRIP-205 par NGFI-B et NOR-1 a été documenté (498,499). De plus, notre équipe a récemment montré que le régulateur transcriptionnel Rb interagit avec NGFI-B et qu'il rehausse l'effet coactivateur des facteurs SRCs sur la transcription induite par les facteurs Nur (29).

### 1.3.3 Les cofacteurs transcriptionnels

Les cofacteurs transcriptionnels peuvent être définis comme étant des facteurs ne liant pas l'ADN que les NRs et les autres types de facteurs de transcription recrutent pour compléter leurs fonctions transcriptionnelles. L'idée que l'action des NRs impliquait l'interaction avec des facteurs accessoires autres que la machinerie basale de transcription date de plusieurs décennies. Cette notion de facteurs intermédiaires a été renforcée par des études montrant que l'activité d'un NR peut être titrée par la surexpression d'un autre récepteur, de même que la démonstration que les domaines d'activation, lorsque greffés à une chimère, montrent une activité histo-spécifique (318). À ce jour, plus d'une trentaine de cofacteurs transcriptionnels des NRs ont été catalogués. Ceux-ci peuvent être grossièrement divisés en deux grandes classes; les corépresseurs qui atténuent l'activité transcriptionnelle lorsque recrutés au promoteur et les coactivateurs qui la rehaussent (315,318,319).

### 1.3.3.1 Les coactivateurs transcriptionnels

Diverses approches biochimiques et de clonage par expression ont permis d'identifier un grand nombre de facteurs capables d'interagir et de potentialiser la transcription induite par les NRs. Ces coactivateurs, qui se lient aux NRs en présence ou en absence de ligands, font souvent partie de complexes multiprotéiques. Bien que de nature très diverses, ces coactivateurs contiennent souvent un motif LxxLL, aussi appelé boîte NR (178). Ce motif, présent en une ou plusieurs copies, médie l'interaction du coactivateur avec le LBD du holo-récepteur, rehaussant ainsi l'activité AF-2-dépendante.

Outre cette particularité structurale, les cofacteurs présentent peu de caractéristiques communes et accomplissent souvent des fonctions très distinctes. Ainsi, certains cofacteurs servent principalement d'échafaudage moléculaire entre les NRs et la machinerie de transcription de base. C'est le cas notamment des facteurs du complexe Médiateur qui interagissent avec les NRs, spécifiquement en présence du ligand, via le motif LxxLL de la composante TRAP220/DRIP205 du complexe (338). Parmi les autres coactivateurs de ce type, mentionnons ASC-2 qui peut faire le pont entre les NRs, CBP/SRC-1 et le complexe Médiateur (276), de même que SRA, un ARN qui rehausse spécifiquement l'activité AF-1-dépendante de plusieurs NRs (262). D'autres coactivateurs exercent leurs activités grâce à leurs fonctions enzymatiques. Par exemple,

la convergence entre le système ubiquitine-protéosome et la signalisation par les récepteurs nucléaires se manifeste également au niveau des coactivateurs. Ainsi les ubiquitine-ligases E6-AP et RPF1, de même que l'ubiquitine-conjugase Ubc9, sont des coactivateurs pour plusieurs récepteurs nucléaires (315). Enfin, plusieurs cofacteurs agissent en tant que remodeleurs de la chromatine. C'est le cas du complexe SWI/SNF, qui cause des changements structuraux sur la chromatine et facilite la liaison des NRs à l'ADN nucléosomale de manière dépendante de l'ATP (338). D'autres coactivateurs modifient de manière covalente les histones, tel les méthylases CARM-1 et PRMT-1 (318). Toutefois, les mieux étudiés parmi les coactivateurs de cette dernière classe sont les acétyltransférases, dont les familles CBP/p300 et SRC/p160 sont les prototypes.

#### 1.3.3.1.1 Les cofacteurs CBP/p300

Contrairement aux facteurs ATPase qui tel SWI/SNF affectent des domaines entiers de chromatine, les acétyltransférases agissent plus localement, en modulant l'interaction des histones entre eux ou avec l'ADN. Il existe ainsi une relation étroite entre acétylation et transcription, illustrée par l'observation que les régions hyperacétylées du génome correspondent aussi à celles le plus activement transcrites (315). CBP et le facteur apparenté p300, qui comptent parmi les premiers coactivateurs identifiés, possèdent une activité HAT intrinsèque et il a été rapporté qu'ils participent à l'activité de centaines de facteurs de transcription différents (pour revue, voir référence (488)). Outre son activité enzymatique, CBP/p300 semblent exercer leurs fonctions en servant de plate-forme entre les facteurs de transcription, certaines composantes de la machinerie de transcription de base, tel TFIID et TFIIB, et la RNA pol II. De plus, la capacité de CBP/p300 à interagir avec plusieurs facteurs de transcription à la fois rend possible son recrutement coopératif par ceux-ci, ce qui souvent été cité comme base mécanistique potentielle de la synergie transcriptionnelle.

Les facteurs CBP/p300 interagissent directement avec les NRs en présence de ligands, via un motif LxxLL dans l'extrémité N-terminale (76). Toutefois, il apparaît que les NRs soient le plus souvent recrutés par d'autres coactivateurs ayant plus d'affinité pour les NRs et qui forment, avec CBP/p300, un grand complexe HAT. Parmi les plus importants de ces autres coactivateurs figurent les membres de la famille SRC/p160 qui

interagissent directement avec CBP/p300 (voir plus bas). Au sein de ces complexes, CBP/p300, de même que certains facteurs associés tel p/CAF, semblent principalement responsables de l'activité HAT. La perte de l'activité acétyltransférase de CBP par des mutations dans le motif PHD a été impliquée dans syndrome Rubinstein-Taybi, confirmant ainsi l'importance de sa fonction HAT (216). De plus, CBP et p300 semblent jouer des rôles importants au cours du développement embryonnaire, puisque l'inactivation génique de ces facteurs mène à des effets pléiotropiques qui dépendent du dosage génique et qui affectent divers processus de morphogenèse, de prolifération et de différenciation cellulaire (248,533).

#### 1.3.3.1.2 La famille SRC/p160

L'utilisation du LBD (contenant le domaine d'activation autonome AF-2) de divers NRs dans des expériences de clonage par double-hybride a rapidement mené plusieurs laboratoires à identifier la famille de coactivateurs SRC/p160 (SRCs). Cette famille comprend trois membres, SRC-1/NCoA-1, SRC-2/GRIP-1/TIF2 et SRC-3/p/CIP/ACTR/RAC3/AIB-1, qui partagent une structure modulaire commune (pour revues voir références (277,523,525)). Ainsi, le côté N-terminal des SRCs contient un domaine bHLH-PAS, suivi par un groupe de 3 boîtes NR au centre de la protéine (domaine RID). Le côté C-terminal comprend un domaine Q riche en glutamine, flanqué par deux domaines d'activation autonomes, AD1 et AD2, qui chevauchent les sites d'interactions avec CBP et CARM-1 respectivement. L'extrémité C-terminal comprend également le domaine conférant l'activité enzymatique HAT. Notons qu'il existe deux isoformes de SRC-1, soit SRC-1a et SRC-1e, qui varie uniquement dans l'extrémité C-terminale. Ces isoformes semblent être fonctionnellement distincts puisque SRC-1e rehausse beaucoup plus fortement l'activité de ER $\alpha$  (215).

Les membres de la famille SRC/p160 modulent l'activité transcriptionnelle d'un large spectre de NRs, en interagissant via le domaine RID avec l'AF-2 des récepteurs activés par les ligands. De plus, de nombreux NRs interagissent avec les SRCs via l'AF-1, souvent suite à la phosphorylation de ce domaine du récepteur. Dans le cas de l'interaction entre ER $\alpha$  et SRC-2, l'AF-1 contacte directement le domaine Q de SRC-2, tandis que l'AF-2 peut interagir indépendamment avec le domaine RID, ce qui explique

la synergie observée entre l'AF-1 et l'AF-2 de ce récepteur (34). Outre les NRs, les SRCs rehaussent l'activité de plusieurs autres types de facteurs de transcription. SRC-1 interagit ainsi avec NF- $\kappa$ B, SMAD3 et AP-1, tandis que SRC-2 interagit avec c-jun, myogenin et MEF2c (277,525). Ces observations suggèrent donc que les SRCs peuvent servir d'intégrateurs de multiples voies de signalisation intracellulaires.

Les diverses études ayant adressé les rôles physiologiques des SRCs par inactivation génique ont permis de confirmer leur pertinence en tant que coactivateurs des NRs (voir revue dans référence (523)). Ainsi, les souris SRC-1<sup>-/-</sup> sont partiellement résistantes aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, et souffrent d'anormalités de croissance et de développement de certains tissus-cibles de ces hormones (526). L'inactivation de SRC-2 entraîne une hypofertilité, une mobilisation accrue des graisses et une résistance à l'obésité (381). Les souris SRC-3<sup>-/-</sup> quant à elles présentent des défauts de croissance généralisés, d'infertilité chez les femelles et de développement aberrant des glandes mammaires (524). La nature subtile des phénotypes observés (surtout pour SRC-1 et SRC-2) suggère une redondance fonctionnelle entre les membres de la famille SRC/p160. Les SRCs jouent également des rôles dans certains cancers, ce qui confirme leur implication dans la croissance cellulaire. Ainsi SRC-3 est amplifié dans 5 à 10% des tumeurs mammaires et dans 7 à 8% des cancers ovariens (15). De plus, la translocation chromosomique inv(8)(p11q13) fusionne SRC-2 au gène MOZ, ce qui contribue à la pathogenèse des leucémies myéloïdes aigues (67).

Étant donné leurs structures modulaires et leur forte affinité pour les NRs en présence ou absence de ligands, il a été suggéré que les SRCs servent surtout d'adaptateurs moléculaires recrutant le complexe HAT formé de CBP/p300 et de p/CAF. En effet, leur activité HAT intrinsèque n'est pas requise pour exercer leurs fonctions de coactivateurs, et il semble d'ailleurs que SRC-2 n'en possède tout simplement pas (523). En plus des HATs, les SRCs recrutent d'autres coactivateurs aux promoteurs des gènes-cibles via des interactions directes. Ces coactivateurs incluent la méthyltransférase CARM-1, les adaptateurs RIP140, ASC-2, SRA et PGC-1, de même que BAF57, un membre du complexe SWI/SNF (525). De plus, il a été montré que les membres de la famille SRC/p160 peuvent hétéro- et homomultimériser (316). Toutefois, les conséquences fonctionnelles de cette multimérisation ne sont pas encore connues.



### 1.3.3.2 Les corépresseurs transcriptionnels

De nombreux NRs, notamment ceux formant des hétérodimères avec RXR, exercent des fonctions importantes en réprimant activement la transcription. La quête de facteurs interagissant avec ces NRs a mené à l'identification de SMRT et N-CoR, les deux corépresseurs des NRs les mieux étudiés (84,192). SMRT et N-CoR sont recrutés aux NRs en absence de ligands ou en présence d'antagonistes tel le tamoxifène ou le RU486. La reconnaissance par les NRs de ces corépresseurs se fait au travers d'un motif en hélice amphipatique LxxxIxxx(I/L), appelé boîte CoRNR (196). SMRT et N-CoR sont structurellement apparentés et possèdent tous deux de multiples domaines de répression indépendants. À l'instar des coactivateurs SRC/p160, SMRT et N-CoR exercent leurs fonctions transcriptionnelles en recrutant des complexes multiprotéiques. Dépourvus d'activité enzymatique intrinsèque, les corépresseurs doivent attirer au promoteur des facteurs possédant des fonctions d'histones déacétylases tel Sin3 et les HDACs (211). La délétion du locus N-CoR a confirmé son rôle de corépresseur puisque de nombreux gènes-cibles des NRs se trouvent dérprimés chez ces souris (210). De plus, ces souris présentent des défauts dans le développement du CNS, des érythrocytes et des thymocytes, suggérant que la répression active par les NRs est essentielle au cours du développement embryonnaire.

Parmi les nombreux autres corépresseurs identifiés à ce jour, signalons REA qui atténue spécifiquement l'activité de ER $\alpha$  en compétitionnant la liaison de SRC-1 en présence de ligand (327). Mentionnons également le complexe ATPase NURD, de même que Trip1/SUG1, une hélicase faisant partie de la sous-unité PA700 du protéosome 26S, et qui se comporte en corépresseur de NRs (315). Enfin, mentionnons que certains coactivateurs peuvent parfois se comporter en corépresseur. C'est le cas de SRC-2 qui rehausse l'activité répressive de GR sur le promoteur de la collagénase-3, via des domaines distincts de ceux impliqués dans la coactivation (408,409).

### 1.3.3.3 La régulation des régulateurs

Une quantité sans cesse croissante d'études suggèrent que les coactivateurs et les corépresseurs soient la cible de multiples voies de signalisation qui régulent ainsi leurs

propriétés transcriptionnelles. La phosphorylation est depuis longtemps associée à la modulation de l'activité des NRs. Or, plusieurs études ont montré qu'en plus des NRs, les kinases ciblent aussi directement les coactivateurs. Le cas classique est CBP/p300, sur lequel convergent plusieurs voies de signalisation. Par exemple, il est connu que la capacité de CBP à servir de coactivateur pour le facteur CREB est rehaussée en réponse au calcium ou à un activateur de l'AMPC, par des voies impliquant les kinases CamKIV et PKA respectivement (488). De plus, les propriétés enzymatiques de CBP semblent être sous le contrôle des kinases dépendantes des cyclines (CDKs). En effet, CBP/p300 n'est pas phosphorylé dans les cellules en phase G1, et la phosphorylation par cyclinE/CDK2 entraîne le passage G1/S, ce qui corrèle avec l'accroissement de leur activité HAT (9). Une même voie de signalisation peut affecter l'activité d'un coactivateur de plusieurs manières, tel qu'illustré par SRC-3 dont la phosphorylation par les MAPKs entraîne sa redistribution du cytoplasme vers le noyau, tout en favorisant aussi son interaction avec CBP/p300 (138,497). La relocalisation subcellulaire des cofacteurs transcriptionnels suite à la phosphorylation semble être un mécanisme privilégié de régulation. Par exemple, la phosphorylation de SMRT par les MAPKs entraîne la redistribution du corépresseur du noyau vers le cytoplasme ou vers un compartiment périnucléaire (188). Enfin, mentionnons que la MAPK p38 cible le coactivateur PGC-1 pour induire son relâchement d'un complexe qui le maintient séquestré dans un état inactif (235).

La conjugaison de SUMO-1 peut également moduler l'activité de certains coactivateurs. Ainsi, il a été rapporté que SRC-1, SRC-2 et p300 peuvent être sumoylés. Dans le cas de SRC-1, la sumoylation sur les résidus Lys-732 et Lys-774 augmente son potentiel de coactivation de l'activité de PR et ER $\alpha$ . La conjugaison de SUMO-1 sur SRC-1 augmente l'interaction physique entre PR et SRC-1 et prolonge la rétention de SRC-1 dans le noyau. De plus, la sumoylation n'empêche pas l'ubiquitination de SRC-1 et ne semble pas non plus affecter la stabilité de la protéine (81). À l'inverse, la sumoylation des résidus lysine 731 et 788 de SRC-2 semble interférer avec sa capacité à rehausser l'activité de AR (237). Les sites Lys-731 et Lys-788 sont localisés dans le domaine NID de SRC-2 et leur substitution en arginines empêchent l'interaction du coactivateur avec AR. Conséquemment, la sumoylation de SRC-2 semble être requise pour que SRC-2 puisse fonctionner en tant que coactivateur de AR. Enfin, il a récemment

été montré que la répression médiée par p300 dépend de la sumoylation du domaine de transrépression CRD1, qui lorsque modifié par SUMO-1 recrute la déacétylase HDAC6 (162).

L'acétylation peut également moduler l'activité des cofacteurs puisqu'il a été montré que SRC-3 est une acétylase acétylée par CBP/p300 sur des lysines avoisinant le domaine RID d'interaction avec les NRs. Cette modification interfère avec la capacité de SRC-3 à interagir avec ER $\alpha$  sur les promoteurs de pS2, CathepsineD et c-myc (83). L'ubiquitination semble également affecter l'activité de divers coactivateurs en modulant la stabilité de ceux-ci. Ainsi, SRC-1, SRC-2, SRC-3 et CBP sont probablement des cibles de dégradation par la voie ubiquitine-protéosome puisque les niveaux de tous les quatre sont augmentés suite au traitement par le MG132, un inhibiteur spécifique du protéosome 26S. De plus, lorsque fusionnés au DBD de Gal4, l'activité transcriptionnelle de ces quatre coactivateurs est rehaussée par le MG132, surtout dans le cas de CBP (298). Mentionnons qu'une autre étude a déjà démontré que le corépresseur N-CoR est une cible pour la dégradation protéosomale et cette dégradation est modulée par l'interaction avec mSiah2 (541). L'ensemble de ces observations suggère donc que les modifications post-traductionnelles soient impliquées à deux niveaux de la voie de signalisation des NRs, soit en régulant les niveaux de récepteurs ainsi que ceux des cofacteurs transcriptionnels.

#### **1.4 Mécanismes de la régulation hormonale de la transcription de POMC**

Une multitude de facteurs extrinsèques exerce une fine régulation de la transcription du gène POMC au niveau de l'hypophyse. Souvent, il s'agit des mêmes hormones et cytokines qui régulent la sécrétion de l'ACTH (voir section 1.1.3.4). Ainsi, diverses études ont montré que les catécholamines (16), les hormones peptidiques de la famille glucagon/sécrétine VIP et PACAP (17) ainsi que divers sulphonylurées (329), rehaussent la transcription hypophysaire de POMC. De plus, plusieurs cytokines semblent en mesure de moduler l'expression de POMC puisqu'un effet stimulateur par les interleukines IL-1 $\beta$  et IL-6, de même qu'un fort effet répresseur par INF $\alpha$  et INF $\gamma$  ont été rapportés (222). Par contre, certains sécrétagogues importants comme l'AVP et l'AngII ne semblent pas être en mesure d'influencer significativement la transcription de POMC (16). Même des

composantes de la matrice extracellulaire, telles la fibronectine, la lamine et le collagène I peuvent inhiber la transcription de POMC dans les AtT-20, suggérant un rôle pour la signalisation par les intégrines dans la modulation de l'expression de POMC (247).

Toutefois, la transcription de POMC est principalement régulée positivement par le CRH et négativement par les glucocorticoïdes, soit les deux mêmes hormones qui commandent la sécrétion de l'ACTH. De plus, le gène POMC est sous le contrôle du facteur LIF, qui synergise avec le CRH pour activer la transcription de POMC. La section qui suit portera sur ces trois voies de signalisation, en se penchant plus particulièrement sur les éléments de réponse et les facteurs de transcription qui médient leurs effets sur le promoteur du gène POMC.

#### 1.4.1 Régulation négative par les glucocorticoïdes

Bien qu'il soit connu depuis une soixantaine d'années que les Gc abaissent les niveaux d'ACTH sanguin, ce n'est que depuis le milieu des années 1980 qu'un rôle au niveau de la transcription de POMC hypophysaire, en plus de celui sur la sécrétion d'ACTH, a été impliqué. En effet, en 1983 Birnberg et coll. ont montré par hybridation *in situ* que les niveaux d'ARNm de POMC hypophysaire augmentaient dramatiquement chez des rats adrénalectomisés, et que cette augmentation pouvait être renversée par l'administration de Gc (42,93). Puis, par des expériences de transcription *in vitro* d'extraits nucléaires (nuclear run-off), il a été démontré que la répression de l'expression de POMC par les Gc se fait au niveau de la transcription (131).

Les premières études portant sur les séquences régulatrices de POMC ont montré que dans un système de transcription *in vitro*, la délétion de la séquence entre -59 et -53 du promoteur augmente l'activité transcriptionnelle de 3 fois, et ce spécifiquement en utilisant un extrait d'AtT-20 et non de HeLa, qui sont des cellules d'origine fibroblastique (324,347). Subséquemment, la dissection du promoteur POMC de rat a mené à l'identification d'un élément de réponse négative aux Gc, le nGRE, dans la région proximale du promoteur POMC (-70/-56) (128). Ainsi, il a été montré que cet élément de régulation est compris dans les séquences nécessaires à la répression par les Gc en souris transgéniques (128,339) et qu'il confère une réponse aux Gc lors d'expériences de transfection dans les cellules AtT-20 (128,339). Trois molécules de GR peuvent lier le

nGRE pour former un complexe ADN/protéines plutôt inhabituel où un dimère de GR fait face à un troisième récepteur qui se lie sur le côté opposé de l'ADN (122,127). Le mécanisme par lequel ce trimère de GR exerce son action répressive par le nGRE reste à être élucidé. En effet, bien que GR pourrait dans ce contexte recruter des corépresseurs, il a aussi été proposé que GR déplace le NGFI-B lié au site NBRE, qui chevauche le nGRE, sur le promoteur de POMC (335).

Notre équipe a aussi montré que l'activité du NurRE peut être réprimée par les Gc (380). Dans ce cas, GR ne se lierait pas à l'ADN (il ne peut lier le NurRE), mais il antagoniserait plutôt l'activité des facteurs Nur. En effet, l'activation transcriptionnelle due aux facteurs Nur est renversée par l'action des Gc autant sur le NurRE que sur le NBRE (311,380). De manière réciproque, NGFI-B antagonise GR et l'activation transcriptionnelle dépendante des Gc sur un GRE, l'élément de réponse positive aux Gc. Cet antagonisme pourrait être la conséquence d'une interaction directe entre GR et les facteurs Nur, puisque ces récepteurs peuvent interagir dans un essai d'interaction *in vitro* de même que par co-immunoprécipitation à partir d'extraits d'AtT-20 (311). L'interaction de même que l'antagonisme mutuel entre GR et les facteurs Nur requièrent les DBDs des deux récepteurs (311). De plus, la liaison de GR sur un élément GRE est inhibée progressivement par des quantités croissantes de NGFI-B et le même effet inhibiteur est observé avec des quantités croissantes de GR sur la liaison de NGFI-B au NurRE. L'ensemble de ces observations suggèrent que le mécanisme de répression de l'activité Nur par GR soit très similaire à celui impliqué dans l'antagonisme entre GR et AP-1 (380,530).

#### **1.4.2 Régulation positive par le LIF**

Le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) est une cytokine à effets pléiotropiques qui régule positivement l'axe HPA et semble promouvoir l'ontogenèse des corticotropes au dépend des autres lignées, en plus d'induire l'accumulation de l'ARNm de POMC et la sécrétion de l'ACTH (10,531). Chez l'humain comme chez le rat, l'expression de LIF et de son récepteur spécifique, LIFR $\alpha$ , a été détectée dans les corticotropes de l'hypophyse embryonnaire et adulte, de même que dans la lignée AtT-20 (10,436). De plus, le LIF est sécrété par les cellules folliculo-stellates de l'hypophyse en réponse à la stimulation

hormonale (par le PACAP) ou immunitaire (par les LPS) (19). Le LIF agit en se liant à son récepteur LIFR $\alpha$ , dépourvu d'activité kinase intrinsèque, ce qui entraîne la dimérisation de ce dernier avec une sous-unité gp130, commune à tous les récepteurs de la famille IL-6. Cette dimérisation entraîne l'activation de tyrosine kinases de la famille Jak, constitutivement associées à la portion cytoplasmique de la sous-unité gp130. Les Jaks phosphorylent ensuite les facteurs de transcription STAT1 et STAT3, ce qui induit leur homo- ou hétérodimérisation puis leur translocation vers le noyau où ils se lient à leur élément de réponse, dont le consensus est TTCNNGAA (19).

Le LIF semble jouer un rôle en tant que modulateur autocrine ou paracrine de la transcription de POMC, puisqu'outre son effet activateur propre, le LIF rehausse également les effets du CRH sur la transcription de POMC dans les AtT-20 (57,396). L'action de LIF sur le promoteur POMC est indépendante de l'AMPc mais dépend plutôt de l'activation de STAT3, tel que démontré à l'aide de mutant dominant-négatif de STAT3 (56,396). Divers éléments dans le promoteur ont été proposés comme médiateurs de la réponse directe au LIF. Une première étude a suggéré que STAT1/3 se lient à deux sites de faible affinité chevauchant le NurRE, soit à -399/-389 et -390/-379 sur le promoteur de rat (58). Toutefois, il a récemment été démontré que seul le site -390/-379 est lié par STAT1 et STAT3 et qu'il est suffisant et nécessaire pour médier la réponse au LIF (337). Outre son action directe par STAT1/3, le LIF agit indirectement via le site AP-1 (+41/+47) en induisant l'expression des facteurs CREB, jun et fos (58). De plus, le LIF semble agir sur la région -166/-96, mais les facteurs liant cet élément restent toutefois inconnus (337). Enfin, la synergie entre LIF et CRH semble médiée par la région -173/-160, un élément lié par le facteur PCRH-REB-1 (voir plus bas), de même que par le site AP-1 du promoteur (57,58,212).

#### **1.4.3 Régulation positive par le CRH**

Outre son rôle de principal sécrétagogue de l'ACTH, l'hormone hypothalamique CRH agit également en stimulant l'expression du gène POMC. Ainsi, il a été démontré que le CRH augmente le taux de transcription de POMC, ce qui mène à une augmentation de la concentration de l'ARNm cytoplasmique de POMC (147,148). Étant donné son rôle central dans la régulation hormonale de l'expression de POMC, les prochaines sections

s'attarderont sur les mécanismes d'action du CRH de même que sur ses divers rôles physiologiques.

#### 1.4.3.1 Les voies de signalisation induites par le CRH

Le CRH est une hormone peptidique de 41 aa qui a d'abord été identifiée en tant que sécrétagogue de l'ACTH (482). Depuis sa découverte, de nombreuses études ont permis de préciser les mécanismes d'action du CRH dans les corticotropes. Ainsi, il a été démontré que le CRH active rapidement la production d'AMPc (255), un second messenger dont la capacité à stimuler la sécrétion de l'ACTH était déjà connue (481). D'autres ont ensuite montré que les effets du CRH et de l'AMPc passent, du moins en partie, par l'activation de la PKA, puisque l'activité de celle-ci est augmentée de manière dose-dépendante dans des cellules hypophysaires ou des cellules AtT-20 stimulées au CRH (8,325). L'implication de la voie AMPc/PKA ne se limite pas à la sécrétion de l'ACTH (voir section 1.1.3.4.1) puisque l'incorporation de PKI, l'inhibiteur spécifique de PKA, dans des cellules AtT-20 bloque l'accumulation de l'ARNm de POMC induite par le CRH ou le 8-bromo-AMPc (401). De plus, un analogue de l'AMPc, le 8-Br-AMPc, ainsi qu'un activateur de l'adénylyl cyclase, la forskoline, produisent les mêmes effets activateurs que le CRH sur le taux de transcription et l'accumulation de l'ARNm de POMC (147,148). Ces études ont également montré que l'action du CRH est rapide (atteignant un maximum entre 15 et 30 minutes) et qu'elle ne requiert pas de synthèse protéique *de novo*, puisque le traitement au cycloheximide ne contrecarre nullement les effets du CRH sur la transcription de POMC (147,148).

Le CRH mobilise également la voie du calcium pour faire augmenter les niveaux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Les corticotropes expriment trois types de canaux calciques, soit les canaux de type L, T et D (251). Or, il a été montré que le CRH induit principalement l'entrée de calcium extracellulaire (301) et que 90% de cet effet est médié par les canaux calciques de type L, le reste étant surtout attribuable aux canaux de type P (252). L'importance des canaux de type L a été démontrée grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, la nifédipine, qui bloque non seulement la sécrétion de l'ACTH mais également l'accumulation de l'ARNm de POMC induite par le CRH, ainsi que la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur POMC (242,490). La

mobilisation de calcium semble être largement dépendante de la voie AMPc/PKA. En effet, le traitement de corticotropes en culture ou de cellules AtT-20 par la forskoline ainsi que par divers analogues de l'AMPc produisent le même effet que le CRH sur la mobilisation du calcium et sur l'accumulation de l'ARNm de POMC (301,490). De plus, l'inhibition de l'activité de la PKA par le H-89 bloque en grande partie l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (250). Au point de vue mécanistique, l'activation de la voie AMPc/PKA semble favoriser la mobilisation du calcium en phosphorylant directement la sous-unité  $\beta_2$  des canaux de type L (152). De plus, le CRH et l'AMPc peuvent induire l'expression des canaux calciques de type L dans des corticotropes en culture, de même que dans les AtT-20 (152,522). Bien que la nature exacte des voies de signalisation médiant les effets du calcium sur le promoteur de POMC reste inconnue, un rôle a récemment été proposé pour la calcium/calmodulin-dépendante kinase II (CamKII), qui agirait en induisant l'expression des facteurs Nur (242).

Finalement, notons que les effets du CRH sur les corticotropes sont variés puisqu'outre son action sur la sécrétion de l'ACTH et la transcription de POMC, il a été suggéré que le CRH puisse jouer un rôle dans la prolifération des corticotropes (20,171) et il est connu que le CRH induit également la prolifération des cellules AtT-20 (486). Plus généralement, mentionnons que les effets physiologiques du CRH sont médiés par deux récepteurs couplés aux protéines  $G_s$ , soit le CRH-R1 et le CRH-R2, qui outre l'hypophyse, se retrouvent également dans une variété de tissus, notamment dans le système nerveux central et dans les systèmes immunitaire, cardiovasculaire et reproductif (167). L'ablation génique du CRH de même que celle du récepteur des corticotropes CRH-R1 a confirmé le rôle essentiel de cette hormone dans la réponse au stress et le comportement anxieux (333,466).

#### 1.4.3.2 Éléments et facteurs médiant la réponse au CRH

De nombreux facteurs de transcription ainsi que divers éléments de réponse ont été proposés comme médiateurs des voies de signalisation élicitées par le CRH sur le promoteur de POMC. Les effets transcriptionnels des voies de signalisation du calcium et de PKA impliquent classiquement les facteurs de transcription CREB ou ATF1/2. Ces facteurs se lient à des éléments de réponse à l'AMPc (CRE) ou au calcium (CaRE) qui



sont des variations de la séquence TGACGTCA. Bien que le promoteur de POMC humain, tout comme celui du rat, ne contienne pas de CRE ni de CaRE classique, quelques études ont impliqué CREB dans la régulation de l'expression de POMC en réponse au CRH. Sur le promoteur de POMC humain d'abord, il a été montré que la séquence entre -344 et -319 répond à la stimulation par la forskoline ainsi qu'à la surexpression de la sous-unité catalytique de PKA. Cette séquence peut être liée par le facteur CREB produit *in vitro*, tandis que la liaison obtenue à partir d'un extrait nucléaire est partiellement surretardée par un anticorps dirigé contre la forme active de CREB, soit celle phosphorylée sur la sérine 133 par PKA (245). Notons toutefois que cette séquence n'est pas conservée à travers les espèces. D'autres études ont montré que le site AP-1 dans l'exon 1 du promoteur de POMC de rat (+41/+47) pouvait également conférer une réponse au CRH, à la forskoline et à la sous-unité catalytique de PKA (59,60). Or, la stimulation de cellules AtT-20 par le CRH induit la phosphorylation de CREB, de même que la formation d'un complexe liant le site AP-1 qui semble, du moins en partie, contenir le facteur CREB actif (59). De plus, la surexpression d'un mutant dominant négatif de CREB réduit la réponse du promoteur, et surtout du site AP-1, à l'activation de la voie de l'AMPc par la forskoline (59). Ces résultats corrélerent avec l'observation faite *in vivo*, à partir d'hypophyses antérieures de souris, qui montre l'activation de CREB et l'induction de sa liaison à un CRE suite à l'ablation pharmacologique de la synthèse de Gc, ce qui simule l'activation de l'axe HPA (506).

Les facteurs de transcription des familles jun et fos, dont la dimérisation constitue le complexe AP-1, ont également été impliqués dans la réponse du promoteur POMC au CRH. Il a été montré que l'induction de POMC dans l'hypophyse de rats soumis à un stress est concomitante avec l'induction de c-Fos et de JunB, ainsi qu'à l'induction de l'activité de liaison du complexe AP-1 à l'ADN (23). De plus, le traitement de cellules AtT-20 au CRH induit rapidement et transitoirement l'expression de c-Fos, FosB et JunB, tandis que c-Jun semble exprimé de manière constitutive (24). Dans les cellules AtT-20, le CRH, de même que la surexpression de c-Fos, induit la liaison de ces facteurs au site AP-1 dans l'exon 1 du gène POMC et mène à l'activation de la transcription de POMC (60). De plus, l'expression d'un ARNm antisens de c-fos réduit la réponse transcriptionnelle de POMC au CRH (60). L'ensemble de ces résultats montre que le site

AP-1 peut conférer une réponse au CRH, notamment à travers l'action des facteurs CREB et c-Fos. Toutefois, la mutation du site AP-1 n'affecte pas la réponse du promoteur POMC au CRH, ce qui implique que la réponse via ce site ne constitue certainement pas le mécanisme unique.

Deux groupes ont également montré que la région -173/-160 du promoteur de POMC confère une réponse transcriptionnelle au CRH et médie également une partie de la réponse synergique entre le CRH et le LIF (57,212). Le CRH induit la liaison d'un complexe protéique sur cet élément, et cette liaison dépend d'évènement de phosphorylation sur des sérines (57,212). Un facteur liant cet élément a été cloné à partir d'une banque d'expression d'AtT-20 et il fut baptisé PCRH-REB (POMC CRH Responsive Element Binding factor) (212). PCRH-REB contient neuf sites potentiels de phosphorylation par PKA et la protéine produite *in vitro* peut lier l'élément -173/-160. PCRH-REB s'est avéré être identique à la grande sous-unité du complexe de réplication C, RFC140, un facteur important pour la réplication et l'élongation de l'ADN, notamment au cours de la réparation suite à des dommages de l'ADN (64). Outre ces fonctions, PCRH-REB/RFC140 est également un régulateur transcriptionnel. En effet, des études ont montré que ce facteur rehausse l'activité transcriptionnelle, via des interactions directes, de C/EBPa dans le foie et les adipocytes et de la sous-unité p65 (RelA) de NF-kB dans les lymphocytes (14,190). De plus, PCRH-REB/RFC140 interagit avec d'autres régulateurs transcriptionnels, tel Rb, p53 et l'histone déacétylase HDAC1 (13,14,373). PCRH-REB/RFC140 est exprimé dans une grande variété de tissus périphériques, de même que dans l'hypophyse et certaines régions du CNS, qui ont toutes la particularité d'exprimer le CRH (212,286). Ces résultats suggèrent que PCRH-REB/RFC140 puisse être important pour la réponse du promoteur POMC au CRH, bien qu'il n'ait pas été montré directement que cette protéine active la transcription de POMC ou qu'elle fait partie du complexe liant la séquence -173/-160 à partir d'extrait d'AtT-20. Enfin, mentionnons qu'un autre groupe a rapporté que la région -141/-106 peut également répondre au CRH dans les cellules AtT-20, mais qu'elle est insensible à la stimulation de la voie de l'AMPc par la forskoline (43). Les facteurs nucléaires médiant cette réponse n'ont toutefois pas été identifiés.

Enfin, les membres de la famille Nur ont également été impliqués dans la réponse transcriptionnelle de POMC au CRH. En effet, Murphy et Conneely ont rapporté que NGFI-B et Nurr1 peuvent lier un site NBRE présent dans la région proximale du promoteur (-70/-63, chevauchant le nGRE). Ce site répond à la stimulation par la forskoline et à la surexpression de Nurr1, et la mutation de cet élément atténue fortement la réponse globale du promoteur à Nurr1, mais peu la réponse à la forskoline. De plus, la forskoline induit la liaison d'un complexe au NBRE qui contient le facteur Nurr1 (335). Au même moment, la caractérisation de séquences médiant la réponse au CRH a mené notre laboratoire à l'identification du NurRE, présent dans la région distale du promoteur POMC (-383/-404) (379). Le NurRE, qui est lié par des dimères de facteurs Nur, répond fortement à un traitement au CRH, à la forskoline, de même qu'à la surexpression de NGFI-B dans les cellules AtT-20 (379). Le CRH stimule l'expression de l'ARNm de NGFI-B et de Nurr1 dans ces cellules (335,379) et l'importance de cette stimulation a été mise en exergue par l'utilisation d'un mutant dominant négatif de NGFI-B. En effet, ce mutant renverse l'effet de la stimulation du promoteur de POMC, ainsi que du NurRE, par le CRH et la forskoline, suggérant que les signaux induits par le CRH convergent sur la famille Nur et sur le NurRE du promoteur POMC. Les mécanismes transcriptionnels par lesquels les facteurs Nur activent l'expression de POMC à travers le NurRE feront l'objet des chapitres 2 et 3 de cette thèse. De plus, la caractérisation de Tpit et du Tpit/Pitx-RE comme nouvel élément de réponse au CRH feront l'objet du 4<sup>ème</sup> chapitre.

### **1.5 Hypothèses et objectifs de travail**

Bien que les étapes initiales de l'effet du CRH sur l'expression du gène POMC aient été étudiées exhaustivement, la nature des effecteurs nucléaires des voies de signalisation élicitées par le CRH reste encore évasive. J'ai donc entrepris d'étudier les mécanismes moléculaires qui médient les effets du CRH sur le promoteur POMC et les résultats de mes études constitueront le corps de cette thèse de doctorat.

À mon arrivée au laboratoire, des études du promoteur de POMC avaient identifié une séquence, le NurRE, qui médie l'activation transcriptionnelle en réponse au CRH de

même que la répression par les glucocorticoïdes. De plus, il avait été montré que le NurRE est une cible pour des homodimères du facteur de transcription NGFI-B, le membre fondateur de la sous-famille Nur, auparavant considéré comme le prototype du NR activant la transcription sous forme de monomère via le NBRE. Je me suis donc d'abord intéressé au rôle potentiel des autres membres de la famille Nur, soit Nurr1 et NOR-1, dans la régulation de la transcription de POMC en réponse au CRH. En effet, il avait été documenté dans d'autres systèmes que plusieurs membres de la famille Nur pouvaient être induits par un même stimulus. J'ai démontré que le traitement de cellules AtT-20 par le CRH induit l'ARNm des trois membres de la famille Nur et que tous activent la transcription de POMC. J'ai aussi montré que les trois membres de la famille Nur activent fortement la transcription dépendante du NurRE de POMC et j'ai démontré que ce site est lié préférentiellement par des dimères contenant NGFI-B. En effet, j'ai démontré que les hétérodimères de facteurs Nur pouvaient activer la transcription de manière synergique et que Nurr1 et NGFI-B pouvait interagir directement indépendamment de la présence du NurRE. Ces travaux feront l'objet du chapitre 2 de cette thèse et ont été publiés dans *Molecular and Cellular Biology*.

Je me suis également intéressé aux modifications post-traductionnelles pouvant modifier l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur. Des études préalables ont impliqué la voie de l'AMPC comme médiateur des effets du CRH. Mes résultats présentés au chapitre 3 de cette thèse et publiés dans *Molecular and Cellular Biology* indiquent que ces signaux convergent sur les membres de la famille Nur, et qu'ils régulent l'activité de facteurs Nur préexistants dans les corticotropes. Aussi, j'ai démontré que l'action des facteurs Nur sur le NurRE, et non pas sur le NBRE, est spécifiquement potentialisée par la voie PKA qui favorise la liaison de dimères de facteurs Nur au NurRE. De plus, j'ai montré que les cofacteurs de la famille SRC/p160 sont spécifiquement recrutés par les dimères de facteurs Nur, un phénomène induit par le CRH dans les cellules AtT-20. J'ai aussi démontré que les effets de la PKA et des coactivateurs SRCs sont médiés par l'AF-1 de NGFI-B.

Finalement, le chapitre 4 portera sur la caractérisation de Tpit en tant que nouveau médiateur transcriptionnel des effets du CRH sur le gène POMC. En effet, la recherche d'autres facteurs ciblés par les coactivateurs SRCs sur le promoteur de POMC m'a

ammené à l'observation que l'activité de Tpit est rehaussée par le recrutement des facteurs SRCs, et que cet effet est potentialisé par la PKA. De plus, j'ai observé que le Tpit/Pitx-RE confère une réponse transcriptionnelle au CRH et à l'activation de la voie de l'AMPC, et que ces effets sont largement médiés par l'entremise de la voie MAPK. Enfin, cette étude a aussi révélé que les facteurs Tpit, NGFI-B et les coactivateurs SRCs coopèrent pour médier l'activation transcriptionnelle du gène POMC induite par le CRH. Cette étude a été publiée dans *Journal of Biological Chemistry*.

Mentionnons aussi que les résultats présentés ici ont été obtenus par le candidat (moi!) à l'exception de :

- des transfections présentées à la figure 2.5 A) (obtenues par Christine Martens et Alexandre Philips)
- des transfections présentées à la figure A), B) et C) de la figure 3.5 (obtenues par Christine Martens)
- de la transfection présentée à la figure 3.6 E) (obtenue par Éric Batsché)
- des essais d'interaction protéique présentés à la figure 6.1 B) et E) ainsi que 6.5 C) (obtenus par Catherine Couture)
- des résultats présentés à la figure 6.4 F) (obtenus par Catherine Couture, Anne-Marie Pulichino et Steve Bilodeau)

**CHAPITRE 2****HETERODIMERIZATION BETWEEN MEMBERS OF THE NUR SUBFAMILY  
OF ORPHAN NUCLEAR RECEPTORS AS A NOVEL MECHANISM FOR GENE  
ACTIVATION****Maira, M. H., C. Martens, A. Philips, and J. Drouin.**(1999) *Mol.Cell.Biol.* **19**:7549-7557.

Laboratoire de génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal  
110 des Pins Ouest  
Montréal QUÉBEC  
Canada, H2W 1R7

and

Department of Biochemistry  
Université de Montréal

**Keywords:** nuclear receptors, Nur77, NGFI-B, transcription

**\*Corresponding author:** Dr Jacques Drouin  
Laboratoire de génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal  
110 des Pins Ouest  
Montréal QUÉBEC Canada H2W 1R7  
Tel: 514-987-5680  
Fax: 514-987-5575  
[drouinj@ircm.qc.ca](mailto:drouinj@ircm.qc.ca)

## 2.1 Résumé du chapitre

Le NurRE est un élément identifié dans le promoteur du gène POMC qui confère une réponse transcriptionnelle à l'hormone CRH et qui est lié par des homodimères du facteur de transcription NGFI-B. Or, la vaste majorité des tissus expriment plus d'un membre de la famille Nur, qui compte également Nurr1 et NOR-1. Cet article caractérise donc les propriétés transcriptionnelles des trois membres de la famille Nur et se penche aussi sur les mécanismes par lesquels les facteurs Nur médient les signaux élicités par le CRH sur le promoteur du gène POMC.

Cette étude montre que le CRH induit l'ARNm des trois membres de la famille Nur et que cette induction est partiellement bloquée par les glucocorticoïdes. Les trois facteurs peuvent activer la transcription médiée par le promoteur de POMC ou par une construction contenant uniquement le NurRE. Le NurRE s'est avéré une cible beaucoup plus sensible que le NBRE dans un contexte de surexpression des facteurs Nur, Nurr1 et NOR-1 activant toutefois moins que NGFI-B, ce qui corrèle avec leur capacité moindre à former des homodimères sur le NurRE. Il semble en effet que le NurRE de POMC soit une cible préférentielle de NGFI-B, tandis qu'un NurRE 'consensus', c'est-à-dire formé de deux séquences AAAGGTCA organisées en répétitions renversées, répond de manière équivalente aux trois facteurs Nur. Cet article démontre également que des paires de facteurs Nur peuvent activer la transcription du NurRE de manière synergique et que ceci est probablement dû à la formation d'hétérodimères puisque ces récepteurs peuvent interagir physiquement en solution ainsi que sur l'ADN.

## 2.2 ABSTRACT

We have recently shown that the orphan nuclear receptor, Nur77 (NGFI-B), is most active on transcription when it is interacting with a cognate DNA sequence as a homodimer. Further, we have shown that the target for Nur77 dimers, the Nur response element (NurRE), is responsive to physiological stimuli both in endocrine and lymphoid cells, whereas other DNA targets of Nur77 action are not. The Nur77 subfamily also includes two related receptors, Nurr1 and NOR-1. Often, more than one member of this subfamily is induced in response to extracellular signals. We now show that Nur77 and Nurr1 form heterodimers *in vitro* in presence and absence of NurRE, and we have documented interactions between these proteins *in vivo* using a two-hybrid system in mammalian cells. These heterodimers synergistically enhance transcription from NurRE reporters by comparison to homodimers. The naturally occurring NurRE from the pro-opiomelanocortin (POMC) gene preferentially binds and activates transcription in the presence of Nur77 dimers (homo- or hetero-) in contrast to a consensus NurRE sequence that does not show this preference. Taken together, the data indicate that members of the Nur77 subfamily are most potent as heterodimers and that different dimers exhibit target sequence preference. Thus, we propose that a combinatorial code relying on specific NurRE sequences might be responsible for the activation of subsets of target genes by one or the other member of the Nur77 subfamily of transcription factors.



## 2.3 INTRODUCTION

Nur77 and its closely related genes Nurr1 and NOR-1 form of a subfamily (the Nur subfamily) of transcription factors belonging to the superfamily of nuclear receptors (NR) (126,309). Nur77 was the first to be cloned as a serum inducible gene expressed during the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> transition phase in cultured mouse fibroblast cells (177,264). It was also identified as a NGF-inducible gene in differentiating rat PC12 cells, for this reason Nur77 is also known as NGFI-B (Nerve Growth Factor inducible-factor B) (323). Nurr1 (Nur-related factor 1) was cloned as a predominantly brain specific gene whose expression is rapidly induced by membrane depolarization (265). Similarly, NOR-1 (Neuron-derived Orphan Receptor) was identified as a gene strongly expressed in apoptotic neuronal cells of the forebrain (352). Nur77 (NGFI-B), Nurr1 and NOR-1 are highly homologous in the zinc finger DNA binding domain (DBD), moderately homologous in the ligand binding domain (LBD) and somewhat divergent in the N-termini (134).

Comparative tissue distribution studies revealed similarities and differences in the temporal and spatial patterns of expression of mRNAs for Nur subfamily members (352,503,521,540). Nur77 and NOR-1 are fairly widely expressed, with Nur77 showing a later onset. They are both constitutively expressed in various peripheral tissues and in some regions of the brain where their patterns of expression are quite similar (265,352,503). In contrast, basal expression of Nurr1 appears to be restricted to the central nervous system (CNS) (265) where it has a pattern that is roughly complementary to that of Nur77 and NOR-1. Nurr1 plays an essential role for the development and maintenance of midbrain dopaminergic neurons, as inactivation of the Nurr1 gene results in agenesis of these neurons (71,420,539). Nurr1 is the only member of the Nur subfamily that is expressed in the affected dopaminergic neurons of the substantia nigra and in the ventral tegmental area. Nur subfamily members are also important in the development of the T-cell repertoire. Indeed, Nur77 and NOR-1 (but not Nurr1) are strongly induced following stimulation of the T-cell receptor (TCR) which leads to apoptosis of self-reactive immature thymocytes (88,296,517). Signals elicited by TCR activation and leading to negative selection by apoptosis appear to converge on the Nur

signaling pathway, since either the overexpression of a dominant-negative Nur77 mutant or use of an antisense Nur77 mRNA abrogates TCR-mediated apoptosis (296,517). In this particular system, Nur77 and NOR-1 appear to play functionally redundant roles (88), which may explain the lack of phenotype in Nur77-deficient mice (275).

Nur subfamily members are also implicated at multiple levels of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. Indeed, Nur77 expression is strongly induced by a variety of stress stimuli in corticotropin-releasing hormone (CRH)-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) (191,368). Nur77 and Nurr1 may be implicated in CRH transcription, as they were both shown to transactivate a reporter plasmid driven by the CRH promoter (335). Stress-induced signals also strongly stimulate Nur factor expression in the pituitary and adrenal cortex (112,335,379,510). In adrenal-derived Y1 cells, ACTH treatment induces Nur77 and Nurr1 leading to enhancement of steroid-21 $\alpha$ -hydroxylase gene transcription (112,510), a rate-limiting enzyme in steroidogenesis. In the anterior pituitary the stimulatory effect of CRH on pro-opiomelanocortin (POMC) gene transcription appears to be mediated through Nur77 and Nurr1 activation (335,379). In addition, negative feedback regulation of POMC transcription by glucocorticoids (Gc) and their receptors (GR) appears to be, at least in part, exerted on the Nur signaling pathway (335,380).

The Nur subfamily members are orphan nuclear receptors because no ligand has yet been identified for them (134). The existence of such ligand remains elusive, considering that these transcription factors are constitutively active in numerous cell lines, even in the absence of serum or any other exogenous agent (371). Nur77 was the first NR shown to bind DNA and to activate transcription as a monomer. The target binding site of Nur77, the NBRE (NGFI-B response element), was identified by genetic selection in yeast (508); it is an octanucleotide that contains the canonical nuclear receptor binding motif AGGTCA preceded by two adenines. Recognition of these adenines was shown to depend on non-zinc finger residues of NGFI-B, a domain called the A box (511). Nurr1 and NOR-1 were later shown to activate transcription upon binding the NBRE (88,370,540). In addition, Nur77 and Nurr1 (but not NOR-1) mediate retinoid signaling by heterodimerization with RXR (140,374,540). These heterodimers bind and activate transcription through a DR-5 element and, unlike other RXR

heterodimerization events where RXR is a silent partner, transcriptional activation depends upon the presence of 9-cis retinoic acid (9-cis RA). It has also been demonstrated that Nur77 interacts with COUP-TF, another orphan NR, and that this interaction modulates retinoic acid sensitivity in human lung cancer cells (518). We recently reported the identification of a novel Nur77 target sequence, the NurRE (Nur response element). This naturally occurring response element was identified in the POMC promoter and it was shown to bind homodimers of Nur77 (379). The NurRE is much more responsive than the NBRE to Nur77 and to physiological stimuli, such as CRH treatment in POMC cells or TCR activation in T-cell hybridomas.

In view of the parallel induction of more than one Nur member in many systems, the aim of this study was to investigate the possibility of a concerted action by different Nur subfamily members. We have indeed found that Nur factors cooperate with each other to synergistically activate NurRE-dependent transcription and that this synergism likely results from heterodimerization between Nur subfamily members. Further, we have shown that the POMC NurRE sequence is a preferential target for Nur77 by comparison to a consensus NurRE which is equally sensitive to all three Nur subfamily members.

## 2.4 MATERIALS AND METHODS

### 2.4.1 Plasmids and oligonucleotides

The various reporter plasmids were constructed in pXP1-luc (346) containing the minimal (-34/+63) POMC promoter. The -480 POMC promoter was previously described (464). Oligonucleotides corresponding to NBRE (5'-GATCCTCGTGCGAAAAGGTCAAGCGCTA-3'), NurRE<sub>POMC</sub> (5'-GATCGTGATATTTACCTCCAAATGCCA-3') or NurRE<sub>CON</sub> (5'-GATCCGTGACCTTTATTCTCAAAGGTCA-3') were cloned in either one or three copies in the BamHI site of the minimal POMC-pXP1-luc plasmid. The DR-5 (-RE) and (UAS)<sub>4</sub>-TK-luc reporter plasmids as well as the CMX-GAL4, CMX-GAL4/Nur77, CMX-GAL4/Nurr1 and CMX-VP16 expression vectors were previously described (374). CMX-Nurr1, CMX-NOR-1 and CMX-Nur77 expression vectors contain complete cDNA

sequences cloned into pCMX (480). CMX-Nur77 $\Delta$ C-term encodes a C-terminal truncation (aa 1-380) of Nur77. CMX-VP16/Nur77 and CMX-VP16/Nurr1 contain the entire Nur77 and Nurr1 coding sequences cloned in phase into CMX-VP16 (374). MBP-Nur77 was obtained by insertion of the Nur77 coding sequences into the pMal-C (New England Biolabs) plasmid.

#### **2.4.2 Cell culture and transfections**

CV1 cells were grown in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% bovine fetal serum and maintain at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. AtT20 D16v cells were grown in the same conditions, except that charcoal-stripped fetal bovine serum was used. CV1 cells were transfected using the calcium phosphate co-precipitation method, whereas AtT-20 cells were transfected by lipofection using LipofecAMINE (Gibco BRL), as previously described (380). Results are presented as the means of 3 to 5 experiments performed in duplicate. When reported as fold activation, the basal levels of activity were always at least 50 times over background. RSV-GH was used as an internal control for transfection efficiency.

#### **2.4.3 Electrophoretic migration shift assays (EMSA)**

The electrophoretic migration shift assays were performed using proteins produced with the TNT® coupled reticulocyte lysate system (Promega). Binding reactions were performed in 20  $\mu$ l containing 10 mM Tris.HCl pH 8.0, 40mM KCl, 1mM DTT, 6% glycerol, 0.05% NP-40, 5ng poly (dI-dC), and about 10 ng of in vitro-synthesized Nur77, Nurr1 or NOR-1. We used 50 000 cpm per reaction (~20 fmol) of double-stranded oligonucleotide probes, end-labeled by filling-in with Klenow in the presence of <sup>32</sup>P- $\alpha$ -dATP, and purified on G-25 Sephadex column. The reactions were incubated for 10 minutes at 25°C prior to loading. The samples were separated by electrophoresis using 5% polyacrylamide gels (29:1 acrylamide:bis-acrylamide) in 0.5X TBE at 25°C for 2 to 2.5 h. For supershift experiments, the antibodies were preincubated with the nuclear extracts for 15 minutes on ice prior to probe addition.

#### 2.4.4 Recombinant proteins production and pull-down assays

The Nur77-MBP and MBP-LacZ fusion proteins were produced as described earlier (472). <sup>35</sup>S-labeled in vitro-synthesized Nurr1 and luciferase were obtained using the TNT® coupled reticulocyte lysate system (Promega). Protein-protein interaction assays were performed using 1 µg of fusion protein coupled to amylose beads (New England Biolabs) and about 80 ng of <sup>35</sup>S-labeled protein as described in (472).

#### 2.4.5 AtT-20 nuclear extracts and co-immunoprecipitations

After 1 hour treatment with 10 µg forskolin, approximately  $4 \times 10^7$  AtT-20 cells were washed once with cold PBS and harvested in cold PBS containing 1mM EDTA. The cells were then centrifuged and resuspended in 500 µl of buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 20 mM NaF, 1mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.25 mM Na<sub>2</sub>MbO<sub>4</sub>, 0.5 mM PMSF, 1mM DTT and 10 µg/ml of each of the protease inhibitors, leupeptin, aprotinin and pepstatin). Cells were allowed to swell on ice for 15 minutes before addition of 50 µl NP-40 followed by vigorous vortexing. After centrifugation, the nuclear pellet was resuspended in 400 µl of buffer B (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EGTA, 0.4 M NaCl, 5% glycerol, 0,5 mM PMSF, 1mM DTT, and 10 µg/ml of each protease inhibitor as above) and shaken vigorously at 4°C for 30 minutes. The extract was then centrifuged and the supernatant dialyzed against 100 volumes of buffer C (20 mM HEPES pH7.9, 75 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20% glycerol, 1mM DTT, and 0,5 mM PMSF) overnight at 4°C with a change of buffer after 4 hours. The dialyzed extract was then centrifuged and the protein concentration of the supernatant estimated using the Bradford assay. Co-immunoprecipitation experiments were performed essentially as described (129), except that 300 µg AtT-20 nuclear extract was used per sample and that extracts were pre-cleared for non-specific interactions with 2 µg purified rabbit IgG (Sigma). 1 µg of Nur77 antibody (N19, Santa-Cruz Biotechnology) was used for the immunoprecipitation. Nurr1 was revealed by Western blotting using a Nurr1 antibody (T. Perlman) and anti-rabbit-horseradish peroxidase (Sigma). Revelation was performed by chemiluminescence as described by the manufacturer (ECL+plus, Amersham Pharmacia).

#### 2.4.6 Northern blots

Total AtT-20 RNA was extracted and was used in Northern blot experiments as previously described (259). Hormone treatment was performed using  $10^{-7}$  M CRH,  $10^{-7}$  M Dex or both.

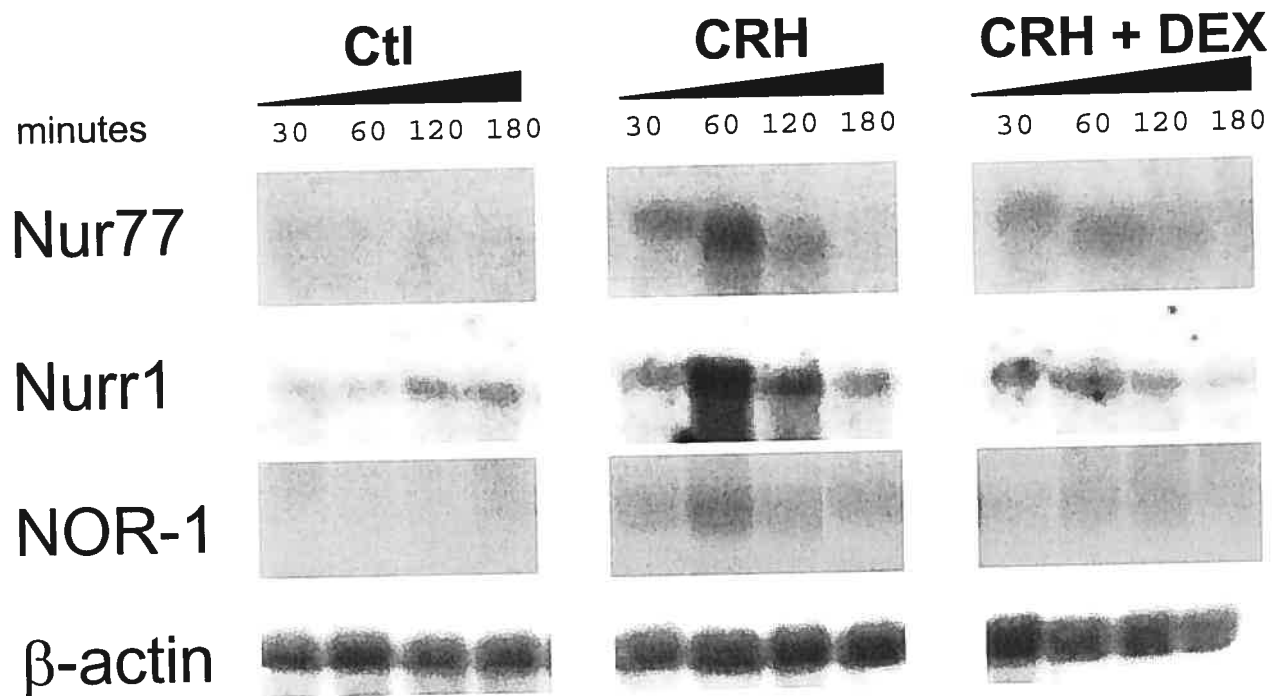
### 2.5 RESULTS

#### 2.5.1 CRH induces all three Nur factors

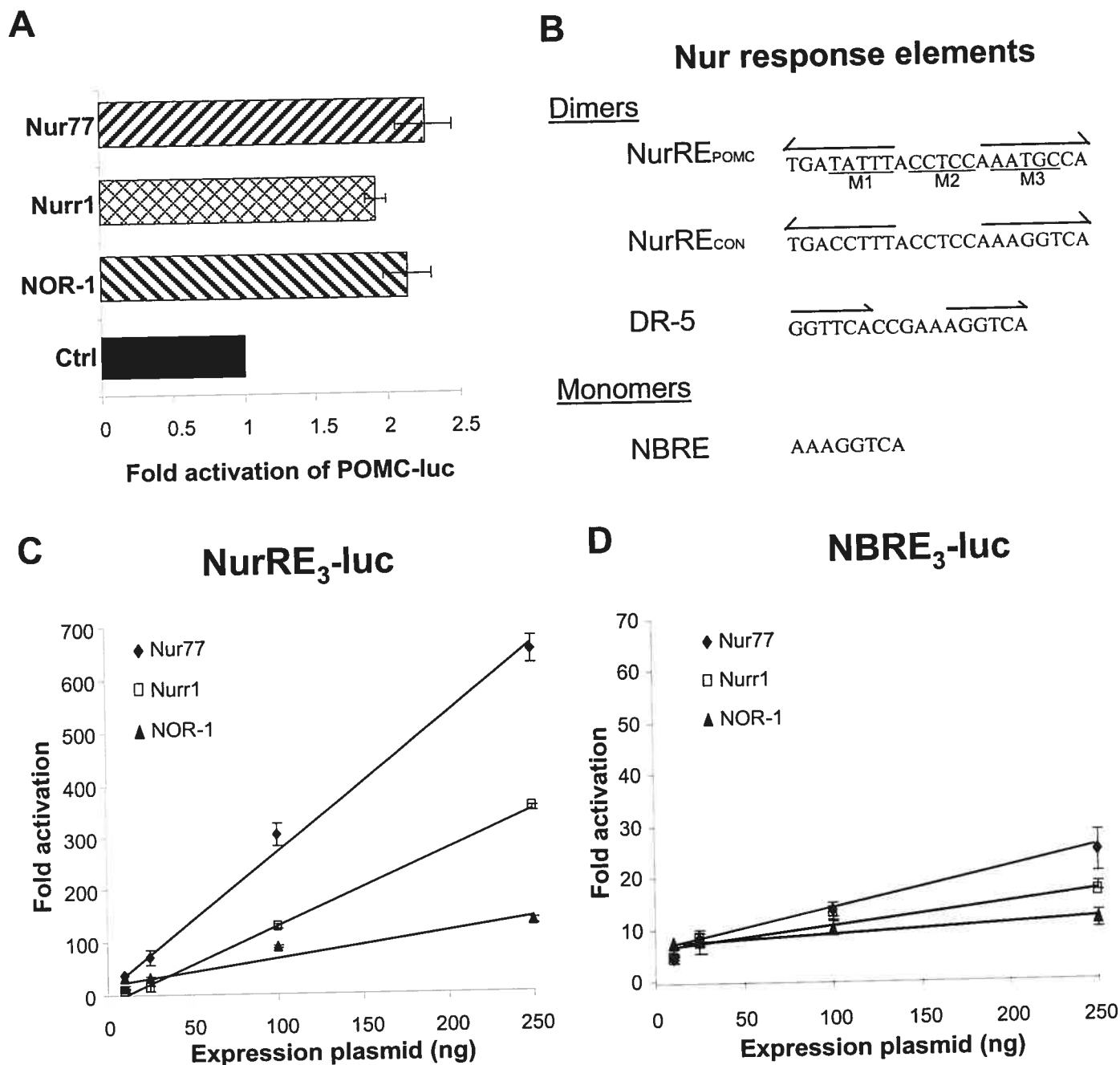
Since previous studies have implicated Nur77 in the regulation of the HPA axis (112,191,368,510), particularly at the pituitary level where Nur77 mRNA is rapidly and transiently induced in response to CRH in both isolated pituitary cells (335) and POMC-expressing At-T20 cells (379), we tested whether Nurr1 and NOR-1 are also inducible in this system. All three Nur family members were found to be rapidly and transiently induced upon CRH treatment (Fig.1), reaching maximum expression around 1 hour after stimulation. Treatment with the synthetic Gc dexamethasone (Dex) severely reduced the CRH induction of both NOR-1 and Nurr1 mRNA (Fig.1), but only blunted the Nur77 increase (Fig. 1 and (380)). In basal conditions, only Nurr1 mRNA could be detected by Northern blot, suggesting that Nurr1 may contribute to basal activity whereas all three factors may be involved in CRH response.

#### 2.5.2 The POMC NurRE is highly responsive to all Nur factors

Since all three Nur family members are induced by CRH, we tested whether they can activate POMC transcription. Forced expression of all three Nur factors activated transcription of a luciferase reporter driven by the POMC promoter (Fig. 2A). Previous analyses of the POMC promoter had identified a target sequence responsive to both CRH and Nur77 (379). This sequence, the NurRE<sub>POMC</sub> (Fig 2B), is highly responsive to Nur77, up to 50 times more in our conditions than the NBRE, the previously described target for Nur monomers (379). The NurRE<sub>POMC</sub> is an everted repeat of an octameric motif separated by six nucleotides. Each motif is related to the NBRE, with two mismatches in each half-site by comparison to a consensus NBRE (Fig 2B). The ability of Nurr1 and NOR-1 to activate NurRE<sub>POMC</sub> and NBRE reporters (379) was compared to



**FIGURE 2.1** Induction of Nur77, Nurr1 and NOR-1 mRNA by CRH in pituitary-derived AtT-20 cells. The effect of CRH ( $10^{-7}$  M) alone and in combination with dexamethasone (Dex  $10^{-7}$  M) was measured on Nur77, Nurr1 and NOR-1 mRNA by Northern blot. RNA was extracted from cells treated for the indicated time.  $\beta$ -actin mRNA was used as loading control.



**FIGURE 2.2** Transcriptional effects of Nur77 (NGFI-B), Nurr1 and NOR-1 on various promoter targets. **A)** The effect of the three Nur subfamily members (126) on transcription driven from the POMC (-480 bp) was assessed by lipofection into AtT-20 cells using expression vectors for each transcription factor and a POMC-luc reporter as described previously (380). Results are shown relative to basal expression as the means  $\pm$  SEM of three experiments, each performed in duplicate. **B)** DNA sequence of various Nur response elements. The POMC NurRE (380) sequence is present in the rat POMC promoter at position -382 bp. The position of three NurRE<sub>POMC</sub> mutants (labeled M1-M3) used in the present work is shown under the sequence. The NurRE<sub>CON</sub> is constituted of two NBRE canonical sites organized as in the NurRE<sub>POMC</sub>. The NBRE sequence was described by (509) and the Nur-responsive DR5 by (375). **C)** Dose response curves of NurRE<sub>POMC</sub>-luc activation by the three Nur family members. The reporter was co-transfected with expression vectors for each Nur factor in CV1 cells as described previously (380). **D)** Dose response curves similar to those in (C) performed with a NBRE reporter. Both sets of data were obtained in the same experiments.



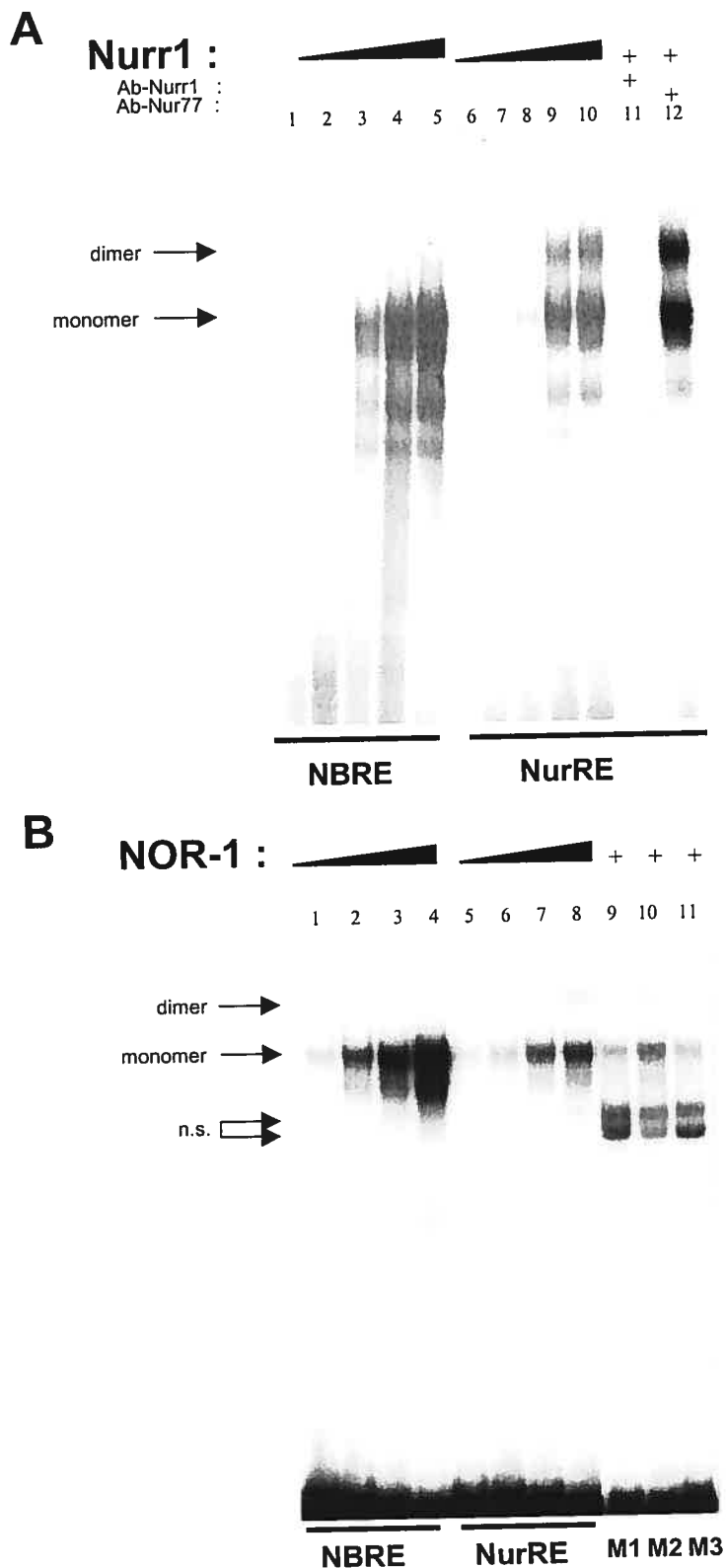
that of Nur77 (Fig. 2C and D). All three Nur factors activated both reporters, the NurRE<sub>POMC</sub> reporter (Fig. 2C) being at least 10 times more sensitive than the NBRE (Fig. 2D, note the 10-fold difference in scale). Nur77 was the most potent activator on both reporters, followed by Nurr1 and NOR-1. Similar results were obtained in POMC-expressing AtT-20 cells (data not shown). These data suggest that Nurr1 and NOR-1 may also bind the NurRE as homodimers.

### 2.5.3 Nurr1 and NOR-1 bind the NurRE as homodimers

We previously showed that homodimers of Nur77 bind the NurRE<sub>POMC</sub> and that this binding appeared cooperative, in contrast to the binding of monomers to the NBRE (379). Gel retardation experiments showed that Nurr1 forms two major complexes with a NurRE<sub>POMC</sub> probe (Fig. 3A, lanes 6-10); one that comigrated with Nurr1 monomers bound to a NBRE probe (Fig. 3A, lanes 1-5) and the other slower migrating complex that likely consist of Nurr1 homodimers. Both complexes are blocked by pre-treatment with a Nurr1 antibody, but not by a Nur77 antibody (Fig. 3A, lanes 11-12). Interestingly, Nurr1 appeared to form less dimer than monomer complexes, in comparison to Nur77 (379). Similarly, NOR-1 formed monomer complexes with both NBRE (Fig. 3B, lanes 1-4) and NurRE<sub>POMC</sub> (Fig. 3B, lanes 5-8). However, it formed even less dimer complexes with the NurRE<sub>POMC</sub> than Nurr1. Nonetheless, each NurRE<sub>POMC</sub> half-site was bound by NOR-1 and both were required for dimer binding. This was shown by using mutated NurRE<sub>POMC</sub> oligonucleotides (379) in which mutation in either half-site abolished dimer formation (mutants M1 and M3, Fig. 3B, lanes 9 and 11) whereas mutation of the spacer nucleotides did not affect NOR-1 dimer binding to the NurRE (M2, Fig. 3B lane 10). Similar results were obtained using Nur77 (379) and Nurr1 (data not shown).

### 2.5.4 The NurRE<sub>POMC</sub> is preferentially bound and activated by Nur77 homodimers

Unlike Nur77, Nurr1 and NOR-1 less readily formed homodimer complexes on the NurRE<sub>POMC</sub> (379) and Fig. 3). This correlates with their weaker potency to activate transcription of the NurRE<sub>POMC</sub> reporter (Fig. 2C). We wondered whether this reflected an intrinsic difference between Nur members or whether this is a particularity of the

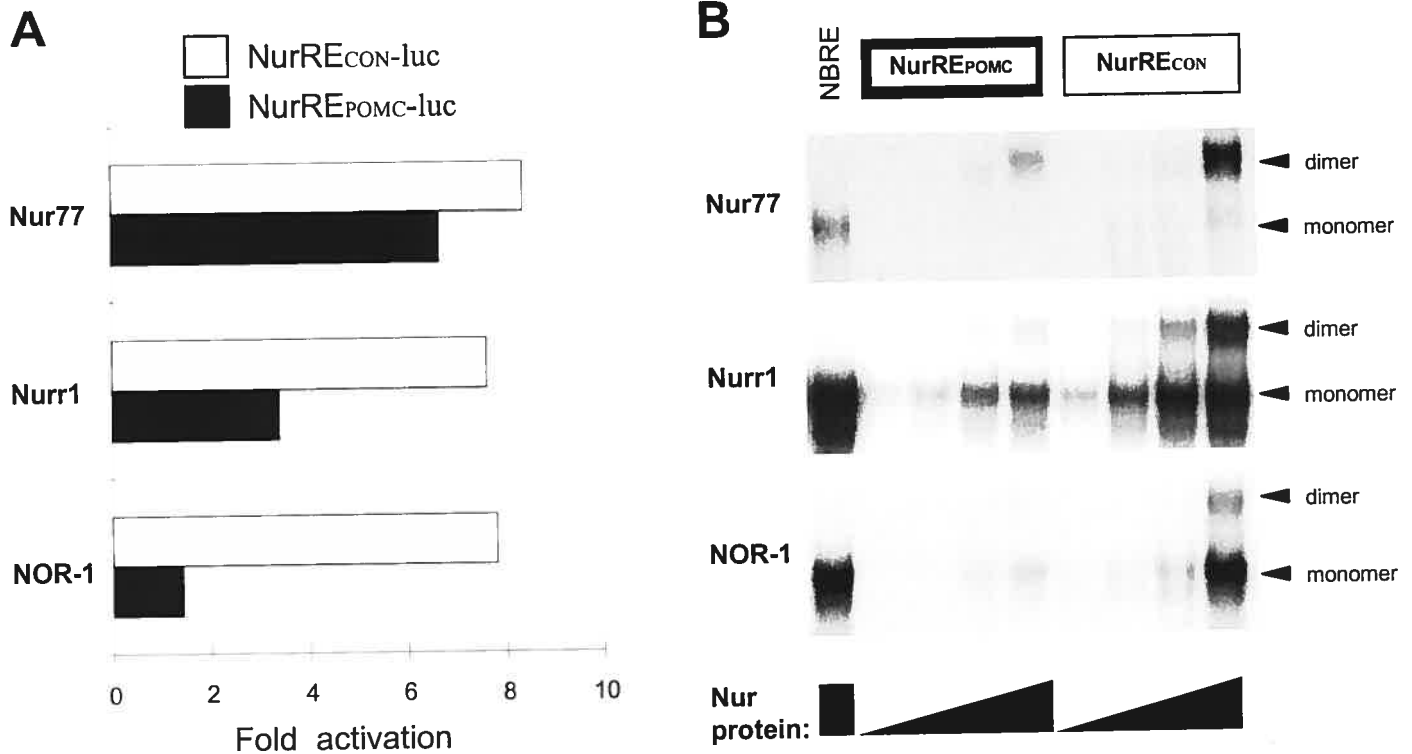


**FIGURE 2.3 Nurr1 and NOR-1 can also form homodimers bound to a NurRE DNA sequence.** As for Nur77 (380), both *in vitro* translated Nurr1 (A) and NOR-1 (B) form monomeric complexes with the NBRE (lanes 1-5, and 1-4, respectively). Both also form homodimers with the NurRE/POMC probe (lanes 6-10 and 5-8, respectively). The Nurr1 antiserum (lane 11) but not the Nur77 antiserum (lane 12) specifically blocks formation of Nurr1-dependent complexes. As for Nur77 (380), formation of NOR-1 homodimers required each half site as indicated by the absence of dimeric complexes using probes containing mutations of either half site (mutants M1 and M3, lanes 9 and 11) but not mutation of the intervening nucleotides (mutant M2, lane 10); the mutant sequences are shown in Fig. 2B. **n.s., non-specific binding.**

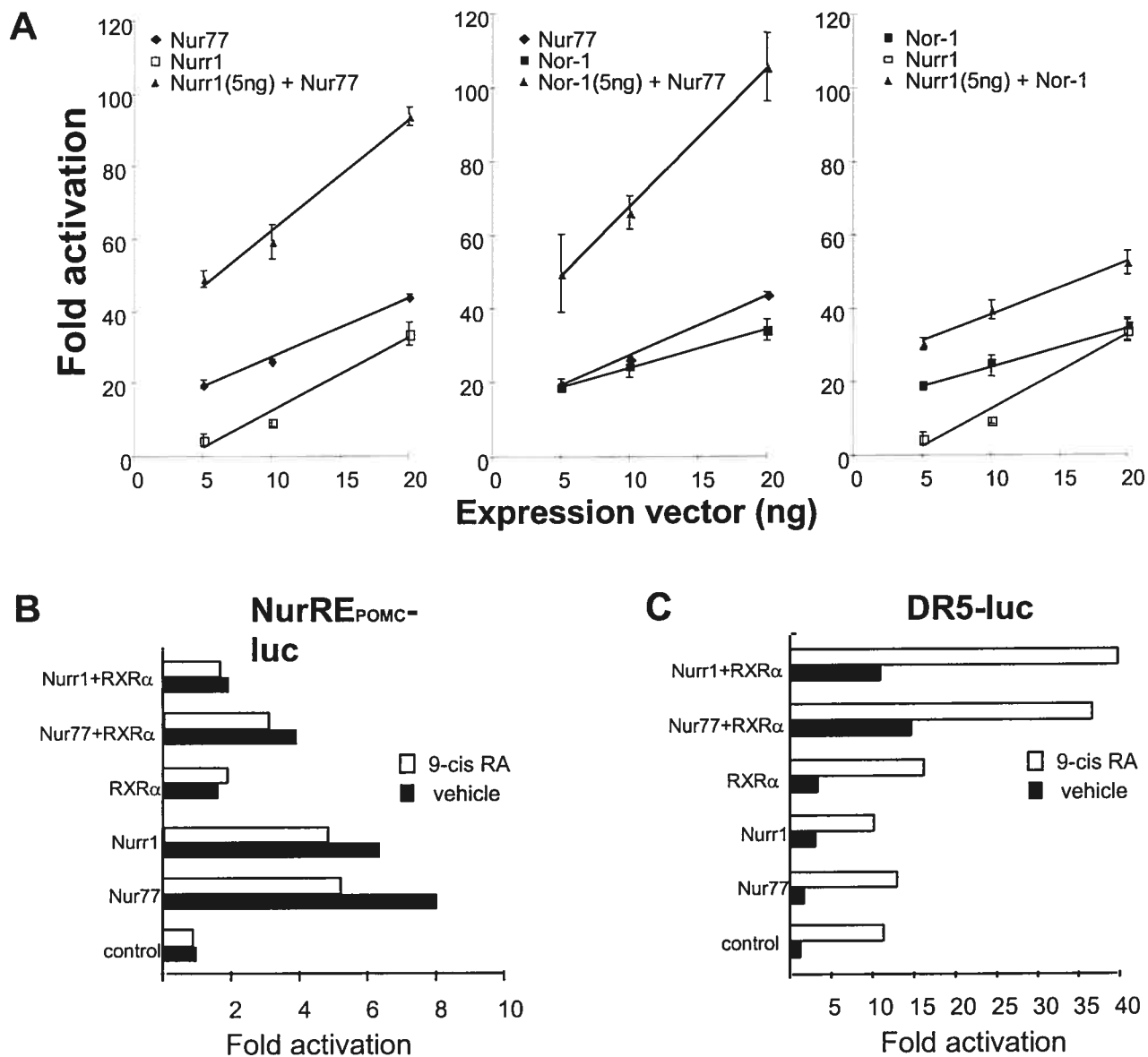
NurRE<sub>POMC</sub> target sequence. In order to address this question, we constructed reporter plasmids containing a single NurRE target sequence corresponding either to the NurRE<sub>POMC</sub> or to a synthetic NurRE (NurRE<sub>CON</sub>) that has two perfect consensus half-sites identical to the NBRE (Fig. 2B). In contrast to the NurRE<sub>POMC</sub> reporter which is less responsive to Nurr1 or NOR-1 (Fig. 2C and Fig. 4A), the NurRE<sub>CON</sub> was activated by all three Nur factors as effectively as Nur77 activated the NurRE<sub>POMC</sub> reporter (Fig. 4A). The greater transcriptional responsiveness of the NurRE<sub>CON</sub> correlated with an increased ability to form homodimers *in vitro*. Indeed, gel retardation experiments showed that all three receptors effectively formed homodimers with the NurRE<sub>CON</sub> whereas Nur77 is the only one to readily form homodimers with the NurRE<sub>POMC</sub> (Fig. 4B).

### 2.5.5 Nur dimers exhibit transcriptional synergy on NurRE<sub>POMC</sub> target

Since all three Nur subfamily members are induced in response to CRH and given that all three can bind the naturally occurring POMC promoter NurRE, we tested whether Nur subfamily members exhibit transcriptional synergy. When combining pairs of receptors in dose-response experiments, we observed a synergistic response when Nur77 is present. Indeed, the dose-response curve to Nur77 was enhanced and steeper when either Nurr1 or NOR-1 were present at a minimally active concentration (Fig. 5A, left and central panels). The synergy between Nurr1 and NOR-1 was somewhat less striking (Fig. 5A, right panel). No synergy was observed when the same experiments were performed with the NBRE-luciferase reporter (data not shown). Since it has been reported that both Nur77 and Nurr1 can heterodimerize with RXR to activate transcription driven by a DR-5 response element (374) or by a NBRE (140), we tested whether these heterodimers could activate NurRE-dependent transcription. Rather than enhance Nur77 or Nurr1-dependent activity, the addition of RXR decreased reporter activity (Fig. 5B), presumably because of Nur factor squelching by RXR. Thus, Nur/RXR heterodimers did not activate the NurRE<sub>POMC</sub> target as they do on a DR-5-reporter (Fig. 5C).



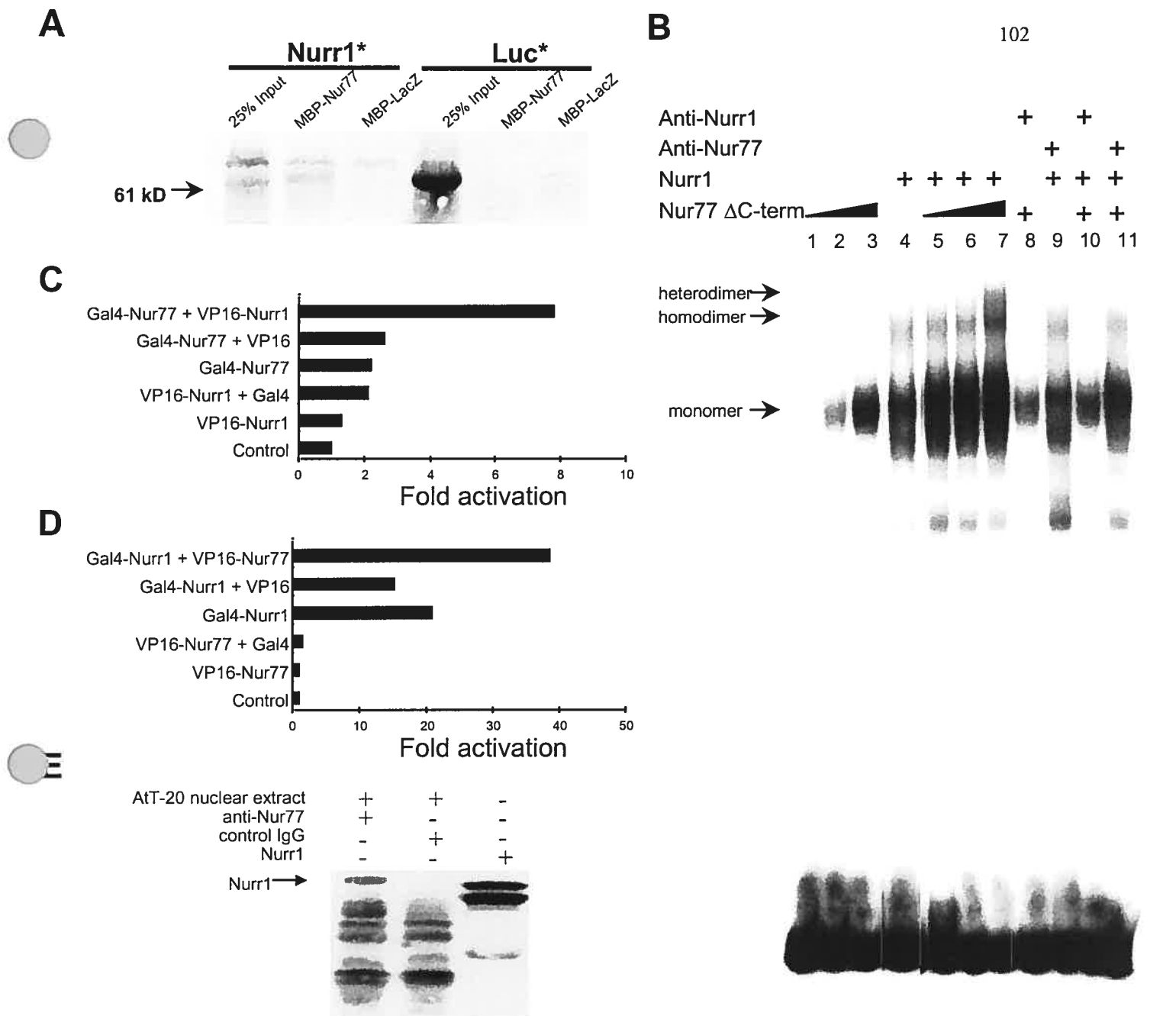
**FIGURE 2.4** The POMC gene NurRE is preferentially activated and bound by Nur77 whereas a consensus NurRE does not exhibit this preference. **A)** The ability of the three Nur subfamily members to activate transcription from luciferase reporters containing one copy of either the POMC gene NurRE (NurRE<sub>POMC</sub>) or a consensus NurRE (NurRE<sub>CON</sub>) constituted of two half sites of canonical NBREs was tested by transfection in CV1 cells. **B)** DNA binding of increasing amounts of *in vitro* translated Nur subfamily proteins to either NBRE, NurRE<sub>POMC</sub> or NurRE<sub>CON</sub> probes. The position of homodimer and monomer complexes is indicated.



**FIGURE 2.5 Synergistic activation of NurRE reporter by pairs of Nur subfamily factors. A)** The activity of the three possible pairs of Nur77 subfamily members was assessed in comparison to each factor on its own using the same NurRE reporter as in Figure 2.2 after co-transfection in CV1 cells. **B)** The effect of RXR with or without its ligand 9-cis-retinoic acid (9-cis-RA) was assessed in the presence of Nur77 or Nurr1 on the activity of the NurRE reporter. **C)** Effect of RXR with and without 9-cis RA, together with Nur77 or Nurr1 on a DR5 reporter.

### 2.5.6 Heterodimerization between Nur77 and Nurr1

The formation of heterodimers binding the NurRE is the simplest way to explain the transcriptional synergy exerted by Nur subfamily members on NurRE reporters (Fig. 5A). We therefore investigated the possibility of direct protein-protein interaction using an *in vitro* pull-down assay (Fig. 6A) in which a resin-bound MBP-Nur77 fusion protein was tested for interaction with *in vitro* translated Nurr1 (right panel) or luciferase as negative control (left panel). Nurr1 specifically bound the MBP-Nur77 column but not the control MBP-LacZ column. Next, the ability of Nur77 and Nurr1 to form heterodimers on the NurRE was analyzed by gel retardation. Initial attempts to do so with the intact proteins were difficult to interpret because of similar electrophoretic migration (data not shown). We could separate hetero- from homo-dimer complexes using a mutant Nur77 deleted of its LBD (Fig. 6B). This mutant Nur77 formed less dimers (lanes 1-3) than Nurr1 (lane4). When mixed together, they formed a new complex that contains heterodimers of the two factors (lane 7). The presence of both Nur77 and Nurr1 in the new complex was verified using specific antisera against Nur77 (lane 11) and Nurr1 (lane 10). Since the pull-down assay suggested interaction even in the absence of NurRE, we setup a mammalian two-hybrid system to ascertain protein interaction *in vivo* (Fig. 6C and D). Using an UAS-containing reporter, we observed that the activity of a Gal4-DBD/Nur77 fusion protein was greatly enhanced in presence of a VP16/Nurr1 chimera which contains the VP16 activation domain fused to Nurr1 (Fig. 6C). Conversely, the activity of a Gal4-DBD/Nurr1 fusion was specifically enhanced in the presence of a VP16/Nur77 chimera (Fig. 6D). In order to determine whether Nur proteins do exist as heterodimers *in vivo*, we performed co-immunoprecipitation experiments using AtT-20 cells nuclear extracts and antibodies against Nur77 (Fig. 6E). The immune precipitates were analyzed by Western blot using an antiserum against Nurr1. This experiment clearly showed that Nurr1 is precipitated with Nur77 from AtT-20 nuclei (Fig. 6E, lane 1) but not with control IgG (lane 2). Taken together, these results indicate that Nur77 and Nurr1 can form heterodimers by direct protein-protein interactions and that these heterodimers are present in cell nuclei.



**FIGURE 2.6 Nur77 and Nurr1 form heterodimers.** **A)** The ability of Nur77 and Nurr1 to interact *in vitro* was assessed using a pull-down assay. Fusion proteins of MBP and Nur77 or lac Z as control were bound to a maltose column and either *in vitro* translated Nurr1 or luciferase as control, were tested for binding. The position of full-length Nurr1 (64 kd) is indicated by an arrow. **B)** Formation of Nurr1/Nur77 heterodimer complexes upon binding of NurREcon probe in gel retardation assay. Since native proteins co-migrated in gel retardation (not shown), we used a mutant Nur77 truncated of its C-terminal domain for the experiment; this mutant preferentially binds as monomer on its own (lanes 1-3) whereas Nurr1 binds both as monomer and homodimers (lane 4). In the presence of increasing amounts of mutant Nur77 (lanes 5-7) and Nurr1, a new complex (labeled heterodimer) appears (lane 7). Formation of these heterodimers is blocked by an antiserum specific for Nurr1 (lane 10) or Nur77 (lane 11). The anti-Nurr1 does not recognize Nur77 (lane 8) and the anti-Nur77 does not recognize Nurr1 (lane 9). **C,D)** Two-hybrid assays were performed in CV-1 cells to show that the chimeric proteins Gal4-Nur77 and VP16-Nurr1 (C) or Gal4-Nurr1 and VP16-Nur77 (D) interact *in vivo*. Cells were co-transfected with a UAS-containing luciferase reporter plasmid. **E)** Presence of Nur77/Nurr1 complexes revealed by co-immunoprecipitation of AtT-20 cell nuclear extracts. Extracts were immunoprecipitated with antibodies against Nur77 (lane 1) or control IgG (lane 2) and analyzed by Western blot using Nurr1 antiserum. *In vitro* translated Nurr1 protein was used as reference (lane 3).

## 2.6 DISCUSSION

The present work demonstrates for the first time that Nur subfamily members form heterodimers (Fig. 6) and that these heterodimers can be more potent transcriptional activators than homodimers of the same factors (Fig 5). We have also shown that Nur dimers (homo- or hetero-) are far more active than monomers on their respective cognate target sequences, the NurRE or NBRE [(379) and Fig. 2C and D]. Significantly, we showed that Nur dimers exhibit target sequence preference (Fig. 4). Thus, a combinatorial code for downstream gene-specific effects may result from both the tissue-specific expression of Nur subfamily members and the presence of specific NurRE sequences on subsets of target genes.

Consistent with this model, Nur subfamily factors exhibit expression patterns that are partly overlapping and partly complementary. For example, exclusive expression of *Nurr1* in the midbrain dopaminergic system is consistent with the absence of these neurons in *Nurr1*-deficient mice (71,420,539). Also, *Nur77* is specifically induced by light in the suprachiasmatic nucleus, where the mammalian circadian clock is located (289,330,414). Recently, a wide screen of genes induced by serum in fibroblast revealed that human NOR-1 (MINOR) is a major serum-responsive gene (204). In other tissues, their expression pattern is overlapping, as in the case of *Nur77* and NOR-1 in immature thymocytes, where these factors seemingly play functionally redundant roles (88). We now report that all three Nur subfamily members are rapidly but transiently induced by CRH in POMC-expressing pituitary cells and that this induction is antagonized by glucocorticoids. These results may explain the lack of pituitary and HPA axis phenotype in both *Nur77* and *Nurr1* null mice (100,104).

We have recently shown the importance of dimer formation for *Nur77*-dependent transcriptional activation (379); this work suggested that *Nur77* dimer action on the NurRE might constitute the physiological mechanism of action for this NR. We now extend this model to *Nurr1* and NOR-1, and we further show that Nur factor heterodimers are even more potent transcriptional activators than homodimers. This was particularly true for heterodimers containing *Nur77* and less so for *Nurr1*/NOR-1 heterodimers (Fig. 5A). The *Nur77* preference appears to be unique to the NurRE<sub>POMC</sub> since it was not observed for the NurRE<sub>CON</sub> which contains consensus half-sites (Fig. 4). Indeed, the *in*



*vitro* affinity of the three homodimers correlated well with their *in vivo* ability to activate the NurRE<sub>POMC</sub>. This observation is very interesting because it suggests that some NurRE could have evolved to respond preferentially to one specific member of the subfamily (Fig. 4) or to heterodimers containing this Nur factor (Fig.5). Recent data suggests that this model may also apply for T-cell target genes. Indeed, forced expression of Nur77 or NOR-1 in the T cells of transgenic mice results in upregulation of CD25 in CD4+CD8+ T cells and in thymocyte apoptosis (88). In contrast, this was not observed in transgenic mice overexpressing Nurr1. Thus, it appears that CD25 may respond specifically to Nur77 or NOR-1 but not Nurr1 and this specificity may be due to a NurRE preferentially activated by homo- or heterodimers of Nur77 and/or NOR-1.

Coupled with the existence of factor-specific target sequences, the multiple mechanisms (monomers, homodimers or heterodimers) by which Nur factors affect transcription provide for great versatility in fine-tuning target cell/gene response to particular stimuli. For example, Nurr1 is constitutively expressed in the PVN suggesting it participates in basal expression of some genes (419). In response to stress, Nur77 is rapidly induced (191) and it could therefore either specifically activate transcription of other genes or together with Nurr1 synergistically activate transcription of common target genes. Our results in the POMC-expressing AtT-20 cells (Fig. 1) suggest that similar mechanisms could take place in the anterior pituitary since only Nurr1 mRNA is detected in basal conditions whereas all three Nur subfamily members are induced upon CRH treatment. Transcriptional regulation by differential expression of Nur members could also take place in PC12 cells, where Nur77 and Nurr1 are induced upon membrane depolarization but only Nur77 is induced in response to NGF (265). The finding that RXR represses Nur-dependent activation of the NurRE was somewhat surprising, as transcriptional cooperativity between the two subfamilies had been demonstrated (140,374). However, this could provide an additional mechanism for cross-talk between retinoid signaling and the Nur signaling pathway. For example, retinoids are known to inhibit TCR-induced apoptosis (44,203,414), which is absolutely dependent on Nur activation (296,517). Thus, it is plausible that RXR could heterodimerize with Nur77 to block NurRE-dependent activation of pro-apoptotic genes downstream the Nur pathway, while the same heterodimers could activate cell survival promoting genes containing DR-

5 elements in their promoter. Despite its critical importance in T cell apoptosis, very little is known about the target genes lying downstream of the Nur signaling pathway. The search for NurREs, whether degenerate or not, in the regulatory regions of putative target genes may prove to be instructive.

The demonstration provided in this work that dimers of the Nur subfamily exhibit strong and target sequence-specific transcriptional activity further highlight the importance of NurRE targets for gene regulation. In addition, the ability of Nur factors to heterodimerize with other NR like RXR and COUP-TF provides the basis for cross-talk between the Nur signaling pathway and retinoid action. And, we have already shown antagonism between Gc and the Nur signaling pathway. Taken together, these multiple interactions offer hypotheses to account for the diverse effects of the Nur signaling pathway on hormone response, proliferation, differentiation and programmed cell death.

## 2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We are very thankful to Dr Thomas Perlman, Stockholm, for providing antisera against Nur77 and Nurr1, as well as the UAS reporter, the GAL-4/Nur77 and GAL-4/Nurr1 constructs. We are grateful to Drs O. Conneeley and N. Ohkura for the Nurr1 and NOR-1 cDNAs, respectively. Dr J. Milbrandt generously provided the C-terminal deletion of NGFI-B, and Dr Vincent Giguère the NGFI-B expression vector and the DR5 reporter plasmid. The help of Michel Chamberland for Northern blots was appreciated. And we thank Lise Laroche for her expert secretarial assistance. This work was funded by the Medical Research Council of Canada and M. Maira is the recipient of a doctoral research award from the Medical Research Council of Canada.

**CHAPITRE 3****DIMER-SPECIFIC POTENTIATION OF NGFI-B (NUR77) TRANSCRIPTIONAL  
ACTIVITY BY THE PROTEIN KINASE A PATHWAY AND AF-1-DEPENDENT  
COACTIVATOR RECRUITMENT**

Mario Maira\*, Christine Martens\*, Éric Batsché, Yves Gauthier and Jacques Drouin\*  
Mol Cell Biol. (2003) Feb;23(3):763-76.

Unité de recherche en Génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110 des Pins Ouest  
Montréal QC, Canada H2W 1R7

and

\* Département de biochimie  
Université de Montréal

**\*Corresponding author:** Dr Jacques Drouin  
Unité de recherche en Génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110 des Pins Ouest  
Montréal QC, Canada H2W 1R7  
Tel: 514-987-5680  
Fax: 514-987-5575  
[drouinj@ircm.qc.ca](mailto:drouinj@ircm.qc.ca)

### 3.1 Résumé du chapitre

Ce chapitre portera sur la modulation de l'activité transcriptionnelle de NGFI-B par la voie de la l'AMPC/PKA et le recrutement de coactivateurs de la famille SRC/p160. Au moment d'entreprendre cette étude, nous avons bien établi que NGFI-B pouvait activer la transcription de POMC en se liant au NurRE et que ce site conférait une réponse transcriptionnelle au CRH. Or, bien que j'avais démontré que le CRH induit l'ARNm des trois facteurs Nur, il avait été démontré auparavant que l'activation transcriptionnelle de POMC par le CRH ne requiert pas de synthèse protéique *de novo*. Ces résultats suggéraient donc que les voies de signalisation élicitées par le CRH rehaussent l'activité transcriptionnelle des protéines Nur préexistantes.

Je démontre donc dans cet article que le CRH n'augmente pas les niveaux de NGFI-B ou Nurr1 endogènes et que le CRH cible le NurRE et les facteurs Nur à travers la voie de l'AMPC/PKA. Cette voie de signalisation semble agir à plusieurs niveaux pour réguler l'activité de NGFI-B. D'abord, le CRH induit la déphosphorylation de la Sér316 de NGFI-B, ce qui induit la liaison des dimères de récepteurs au NurRE, mais non au NBRE. Cet effet exclusif du CRH sur les dimères de facteurs Nur est également observé en surexprimant PKA puisque celle-ci induit spécifiquement la liaison à l'ADN ainsi que l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur sur le NurRE et non sur le NBRE. Le CRH favorise aussi le recrutement des coactivateurs SRCs au NurRE, et ces coactivateurs rehaussent la transcription des facteurs Nur spécifiquement sur le NurRE. Enfin, l'étude structure-fonction a révélé que les effets de PKA et de SRC-2 passent par l'AF-1 de NGFI-B et de Nurr1.

### 3.2 ABSTRACT

The NGFI-B (Nur77) subfamily of orphan nuclear receptors (NRs), which also includes Nurr1 and NOR1, bind the NurRE regulatory element as either homo- or heterodimers formed between subfamily members. These NRs mediate the activation of pituitary POMC gene transcription by the hypothalamic hormone CRH, an important link between neuronal and endocrine components of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. CRH effects on POMC transcription do not require *de novo* protein synthesis. We now show that CRH signals activate Nur factors through the cAMP/PKA pathway. CRH and PKA rapidly increase nuclear DNA binding activity of NGFI-B dimers but not monomers. Accordingly, CRH- or PKA-activated Nur factors enhance dimer (but not monomer) target response elements. We also show that p160/SRC coactivators are recruited to Nur dimers (but not to monomers) and that coactivator recruitment to the NurRE is enhanced in response to CRH. Moreover, PKA- and coactivator-induced potentiation of NGFI-B activity are primarily exerted through the N-terminal AF-1 domain of NGFI-B. The TIF2 (SRC-2) glutamine-rich domain is required for this activity. Taken together, these results indicate that Nur factors behave as end point effectors of the PKA signaling pathway acting through dimers and AF-1 dependent recruitment of coactivators.

### 3.3 INTRODUCTION

NGFI-B (also known as Nur77/TR3/NAK-1) is a transcription factor belonging to the superfamily of nuclear receptors (NR) (126). NGFI-B was cloned as an immediate-early gene inducible by serum in mouse fibroblasts (177,264) and was also identified as a NGF-inducible gene in differentiating rat PC12 cells (323). NGFI-B is constitutively expressed in various peripheral tissues and in some regions of the brain (265,352,503). NGFI-B is closely related to Nurr1 (RNR-1, TINUR, HZF-3) and NOR-1 (MINOR), together forming a distinct subfamily (the Nur factors) of orphan NRs (265,352). NGFI-B, Nurr1 and NOR-1 are highly homologous in their DNA binding domain (DBD), moderately homologous in the ligand-binding domain (LBD) and divergent in the N-termini (134). Nurr1 is predominantly brain specific (265) and genetic inactivation of Nurr1 results in impaired development and maintenance of midbrain dopaminergic neurons (71,420,539). NOR-1 exhibits a similar expression pattern as NGFI-B and they appear to play partly redundant roles in T-cells and adrenals (88,137).

NGFI-B was implicated at multiple levels of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis that ultimately controls adrenal glucocorticoid synthesis through the pituitary hormone ACTH. ACTH is processed from a precursor, proopiomelanocortin (POMC), which is itself under control of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH). NGFI-B expression is strongly induced by a variety of stress stimuli in CRH-producing neurons of the hypothalamus where it may be implicated in CRH gene transcription (191,335,368). In the anterior pituitary, the stimulatory effect of CRH as well as the negative feedback regulation of POMC transcription by glucocorticoids (at least, in part) appear to be mediated through NGFI-B (335,379,380). In the adrenals, ACTH treatment induces NGFI-B leading to enhancement of steroid-21 $\alpha$ -hydroxylase gene transcription (112,510), a rate-limiting enzyme in steroidogenesis. NGFI-B also appears to be an important regulator of apoptosis in different cells. In T-cells, it was shown to be essential for apoptosis of self-reactive immature thymocytes following stimulation of the T-cell receptor (TCR) (88,296,517). In response to apoptotic stimuli, NGFI-B translocates from the nucleus to mitochondria to induce cytochrome c release and apoptosis of LNCaP human prostate cancer cells (281).

NGFI-B, Nurr1 and NOR-1 were first shown to activate transcription and to bind DNA as monomers on a target site, the NBRE, that consists of an octanucleotide AAAGGTCA containing the canonical nuclear receptor hexanucleotide binding motif preceded by two adenines (88,370,508). In addition, NGFI-B and Nurr1 (but not NOR-1) can heterodimerize with RXR and activate transcription through a DR-5 element in a 9-cis retinoic acid-dependent manner (140,374,540). We reported that Nur family members can bind DNA and activate transcription as dimers (306,379). The transcriptional target of these dimers, the NurRE, consists of everted repeats of the octanucleotides AAAT(G/A)(C/T)CA which are related to the NBRE. Whereas the naturally occurring NurRE from the POMC promoter is preferentially bound and activated in the presence of NGFI-B, a synthetic consensus NurRE sequence (consisting in two perfect NBRE half-sites) does not exhibit this preference and is equally responsive to all three Nur factors (306).

NGFI-B is known to be a phosphoprotein and increasing evidence suggests that the transcriptional activity of NGFI-B is tightly regulated by phosphorylation events. NGFI-B expressed in COS cells is heavily phosphorylated in the N-terminus, which is primarily responsible for its transactivating activity, while its C-terminus is almost devoid of phosphorylation (111). NGFI-B is rapidly modified posttranslationally in PC12 cells, mainly by phosphorylation on serine residues (136,176). Interestingly, the extent of these phosphorylations depends on the nature of the stimulus, resulting in differential regulation of its transcriptional activity (176,220). Indeed, while membrane depolarization induces the transcriptional activity of NGFI-B, NGF treatment represses this activation presumably through phosphorylation at Ser316 which impairs NGFI-B binding to the NBRE (184,220). Although this serine can be phosphorylated *in vitro* by PKA and pp90<sup>rsk</sup> (111,184), the nature of the kinase phosphorylating Ser316 *in vivo* is still unclear. It might be NGFI-B kinase I, a NGF-induced cytosolic kinase that phosphorylates Ser316 in PC12, and which is very similar or identical to Fos kinase and pp90<sup>rsk2</sup> (185,454). The Akt (PKB) kinase has also been shown to target Ser316 *in vivo* and *in vitro* in a PI<sub>3</sub>-kinase-dependent manner, thus inhibiting DNA binding and transcriptional activity of NGFI-B and resulting in suppression on NGFI-B-induced apoptosis in fibroblasts and TCR-mediated cell death in T cell hybridomas (313,372).



NGF induces additional phosphorylation at Ser105 by the Trk/Ras/MAPK pathway and results in nuclear export of NGFI-B (221). ACTH also regulates NGFI-B phosphorylation status in adrenal-derived Y1 cells. Indeed, ACTH treatment produces dephosphorylation of Ser316, thus allowing for DNA binding of NGFI-B; in addition, ACTH action results in hyperphosphorylation of the N-terminus which may lead to enhancement of transcriptional potency (112,285).

The transcriptional activity of many NR dimers is dependent on binding of a ligand to the C-terminal LBD and the molecular mechanism of ligand-induced transcriptional activity requires recruitment of coactivator protein to the C-terminal AF2 activation domain. A large group of NR coactivators have been identified [reviewed in (132,315,407)]. One of the best-studied classes of coactivators is the p160 family of coactivators that includes SRC-1/NCoA-1, SRC-2/TIF2/GRIP1/NCoA-2 and SRC-3/pCIP/ACTR/AIB-1. The p160 coactivators mediate ligand-dependent transactivation through recruitment at the AF-2 domain. In addition, these coactivators interact with the carboxy terminal region of CBP/p300 (217,532), another transcriptional cofactor which itself interacts with NRs and which appears to play the role of a transcriptional integrator (151,282). Until recently, it was thought that AF-2-dependent recruitment of coactivators was sufficient to account for ligand-dependent activity; however, recent results have also implicated the N-terminal AF-1 domain in the process (11,186,358,504). Most notably, coactivator recruitment following phosphorylation events in the AF-1 has been shown to be important in ligand-independent transcriptional activation by NRs (174,470). Although most NRs studied for coactivator dependence activate transcription as dimers, a similar paradigm was proposed for SF-1 acting as a monomeric activator of transcription (536). Also, it was recently demonstrated that CamKinase IV modulates recruitment of cofactors ASC-2 and SMRT by both NGFI-B monomers and dimers (445). However, the p160 coactivators do not appear to be involved in transcription activation by NGFI-B monomers (73).

The main physiological regulators of corticotrope cells and POMC transcription are hypothalamic CRH, that stimulates POMC transcription, and glucocorticoids that repress POMC expression, thereby exerting a negative feedback on the HPA axis (147). Upon binding its receptor on corticotrope cells, CRH induces a rapid increase in cAMP

levels (255) followed by activation of protein kinase A (PKA) (401). CRH induction of the cAMP pathway also results in increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels through an enhancement of L- and P-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels activity, which are known to be modulated by PKA (250,252). Previous work has shown that CRH and cAMP stimulate POMC gene transcription, and that this induction is rapid, transient and does not require de novo protein synthesis (147,148). However, whereas glucocorticoids are known to exert their transcriptional repression through the glucocorticoid receptor (GR) (127,311,380), the nature of factors mediating the nuclear events elicited by cAMP and resulting in POMC transcription remain elusive. Classically, cAMP and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced transcription is mediated through responsive elements, the CRE and CaRE respectively, that are both variations of the TGACGTCA palindromic sequence (273). However, no such sequence is found in the rat POMC promoter. Instead, the POMC NurRE was shown to be important for CRH-induced transcription in POMC-expressing AtT-20 cells (379) and to confer strong transcriptional responsiveness to both CRH and NGFI-B.

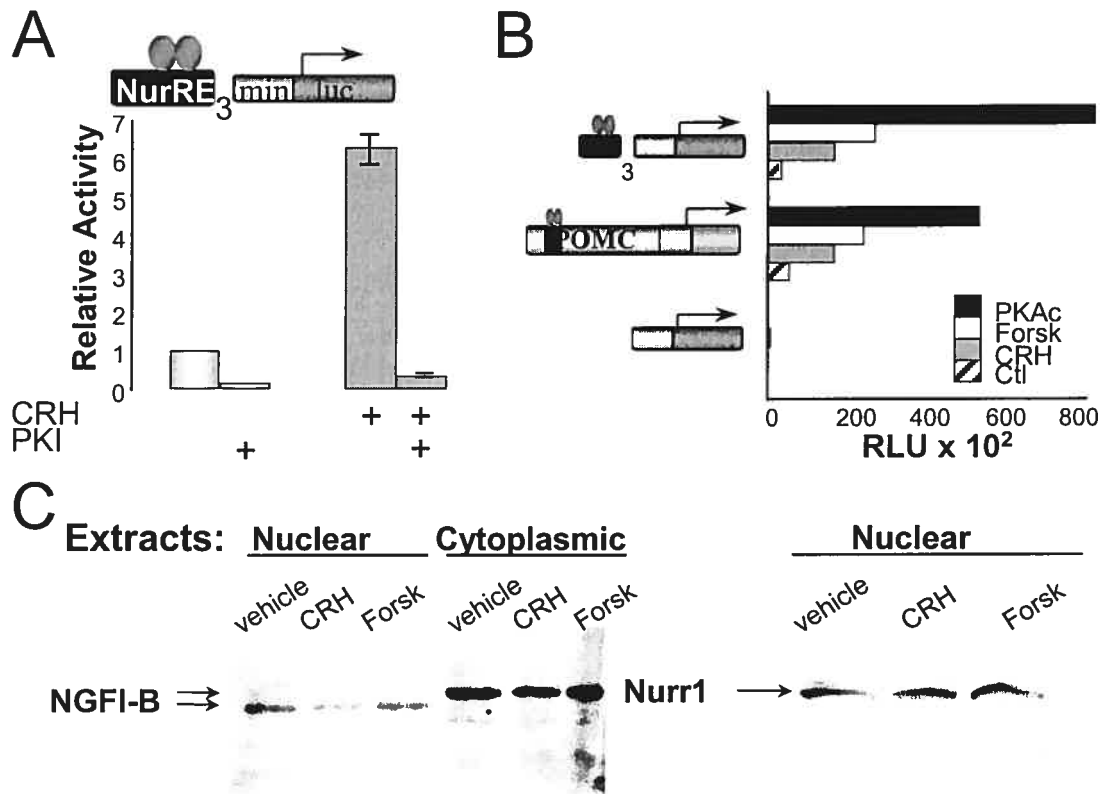
We now report that the cAMP/PKA pathway elicited by CRH in AtT-20 cells sharply enhances DNA binding activity of Nur dimers, coactivator recruitment to NurRE (Nur dimers) and NurRE-dependent transcription. In contrast, these effects are not exerted on the NBRE target sequence of Nur monomers. The dependence on Nur dimers for cAMP/PKA-dependent NGFI-B activity was not previously recognized. Both PKA and SRC coactivator effects are mediated through the N-terminal AF-1 domains of NGFI-B and Nurr1. The present work defines the action of the PKA pathway through the orphan NRs of the Nur subfamily and highlights the roles of dimerization and of the N-terminal AF-1 domain for transcriptional activity, potentiation by PKA and coactivator recruitment.

### 3.4 RESULTS

#### 3.4.1 The CRH/cAMP/PKA pathway strongly enhances NurRE-dependent activity

Previous studies from our laboratory have identified the NurRE as the major mediator of CRH action on the POMC promoter (379). We demonstrated that CRH induces NurRE-dependent transcription, and that a dominant-negative mutant of NGFI-B can abrogate this activation. Since cAMP is known to mediate CRH-induced signaling, we tested whether inhibition of this second messenger pathway would also abrogate CRH effects on NurRE-dependent transcription. AtT-20 cells were transfected with a luciferase reporter plasmid driven by three copies of the NurRE, and as expected this construct is responsive to CRH treatment (Fig. 1A). However, coexpression of PKI (a peptidic inhibitor of PKA) repressed basal activity of this reporter and completely abrogated CRH-induced activation (Fig. 1A). We then tested whether the NurRE is also responsive to direct activation by the cAMP/PKA pathway. Both NurRE and intact POMC promoter-driven reporters were activated by CRH or forskolin (an adenylate cyclase activator) treatment, as well as by coexpression of the catalytic subunit of PKA (Fig. 1B). However, these treatments had no effect on the minimal POMC promoter.

A simple explanation for the effects of the CRH/cAMP/PKA pathway on NurRE-dependent transcription would be an induction of Nur factor gene transcription. Indeed, we reported that CRH induces mRNA levels of all three Nur factors (306). However, this could not account for the acute CRH effect on POMC transcription, since we previously demonstrated that it did not require *de novo* protein synthesis (148). We therefore tested if CRH or forskolin treatment affected Nur protein levels by Western blot. After a 30 minutes treatment with CRH or forskolin, which corresponds to the peak of POMC responsiveness, neither NGFI-B nor Nurr1 levels were upregulated (Fig. 1C). Similar results were obtained after 1 h treatments and with a variety of antibodies against NGFI-B and Nurr1 (data not shown). Interestingly, the NGFI-B antibody revealed a protein of slower migration in cytosolic extracts, suggesting that as seen in PC12 and Y1 cells (220,285), NGFI-B is also present in the cytoplasm in an hyperphosphorylated form (Fig. 1C).

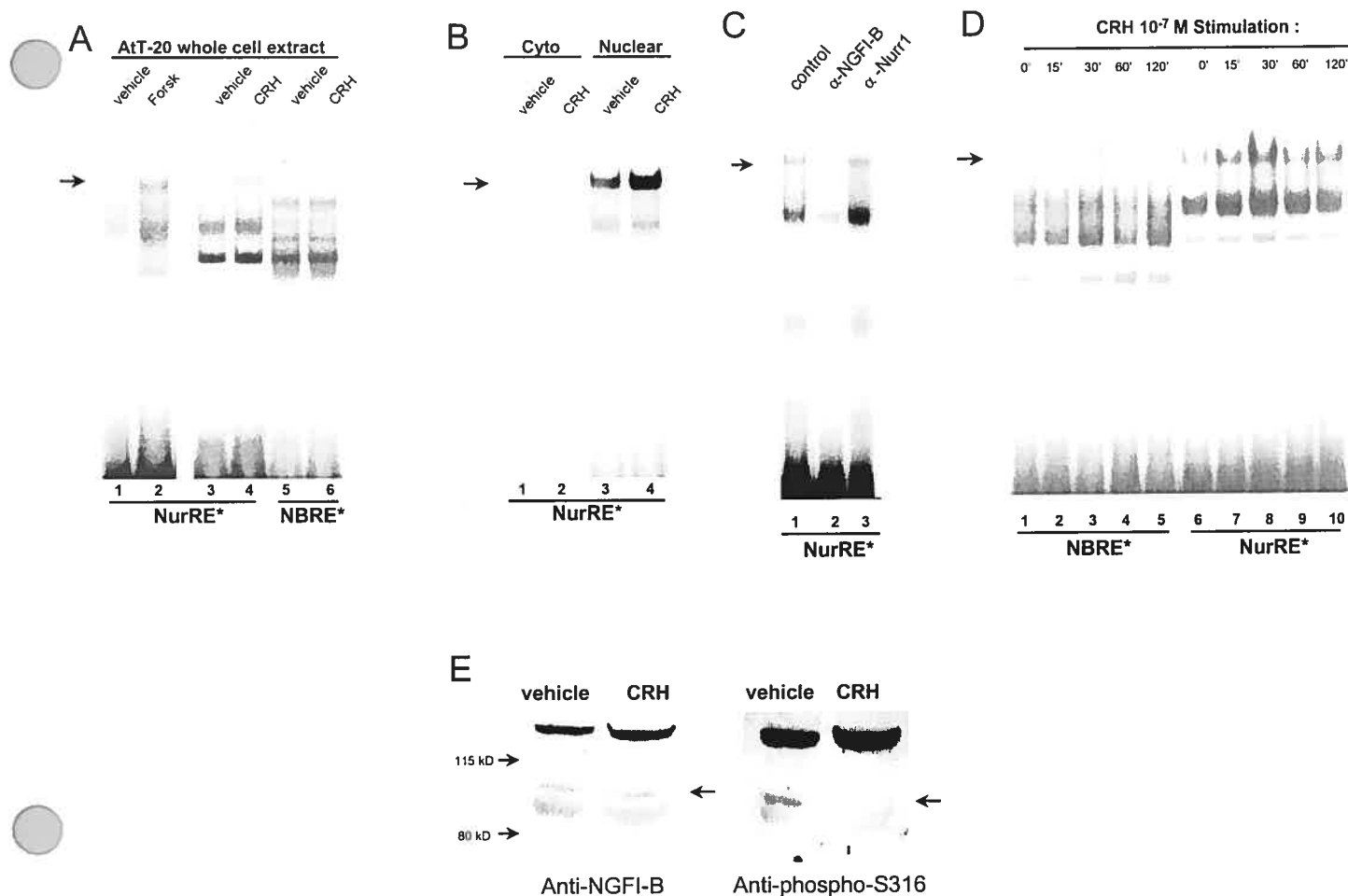


**FIGURE 3.1** The CRH/cAMP/PKA pathway strongly enhances NurRE-dependent activity without affecting NGFI-B protein levels. **A)** The effect of PKI, the peptidic inhibitor of PKA, on basal (light bars) and CRH (10<sup>-7</sup> M)-induced (dark bars) activity was assessed by lipofection into AtT-20 cells of a reporter plasmid consisting of three copies of the NurRE sequence cloned upstream of the luciferase gene. An expression vector for PKI (100 ng) was cotransfected as indicated. **B)** The effects of CRH or of activators of the cAMP/PKA pathway were tested on transcription driven by the minimal (-36/+63) POMC promoter, the intact POMC promoter (-480/+63) or the NurRE reporter. AtT-20 cells were transfected by lipofection with reporter plasmids either alone (hatched bars) or with the constitutively active catalytic subunit of PKA (50 ng) (black bars). Where indicated, transfected AtT-20 cells were treated with CRH (10<sup>-7</sup> M) (grey bars) or forskolin (10<sup>-5</sup> M) (light bars) 4 hours prior to harvesting. **C)** NGFI-B and Nurr1 protein levels were determined by western blotting using either anti-NGFI-B (Geneka) or anti-Nurr1 (Santa Cruz, N-20) antibodies. AtT-20 cells were treated for 30 minutes with either CRH (10<sup>-7</sup> M) or forskolin (10<sup>-5</sup> M) and both nuclear (25  $\mu$ g) and cytosolic (50  $\mu$ g) extracts were prepared and analyzed by SDS-PAGE.

### 3.4.2 The CRH/cAMP/PKA pathway transiently enhances NGFI-B binding to the NurRE

We then tested if the CRH-induced transcriptional activation of the NurRE reporter correlated with an increase in NurRE binding. Whole cell extracts from AtT-20 cells were subjected to electrophoretic mobility shift assays. Pre-treatment with  $10^{-5}$ M forskolin induced the binding of a slow migrating complex when compared with vehicle treatment (Fig. 2A, lanes 1 and 2). This complex was also induced in cells pre-treated with  $10^{-7}$ M CRH (Fig. 2A, lanes 3 and 4). The same extracts did not reveal any difference in DNA binding and activity when assessed with a NBRE probe for Nur factor monomers (Fig. 2A, lanes 5 and 6). Since our western blot analysis revealed the presence of NGFI-B in both cytoplasm and nucleus, we performed gel retardation assays using extracts from both compartments. Little or no bound complex was detected with cytosolic extracts (Fig. 2B, lanes 1 and 2), even after long exposure or when using greater amounts of extract (data not shown). However, nuclear extracts revealed the presence of the CRH-inducible slow migrating complexes (Fig. 2B, lanes 3 and 4). To assess which members of the Nur subfamily are present in this complex, we performed experiments using antibodies previously shown to block binding of either NGFI-B or Nurr1 (306). The addition of anti-NGFI-B, but not of anti-Nurr1, to the nuclear extracts completely blocked the binding of the slower migrating complex (Fig. 2C), indicating that NGFI-B is present in the complex. We then performed time course analyses to determine the kinetics of this CRH-enhanced binding of NGFI-B. Binding of the slower migrating complex to the NurRE probe was rapidly induced, reaching a maximum after 30 minutes of treatment with  $10^{-7}$ M CRH and then decreasing to near basal levels after 1 hour (Fig 2D, lanes 6 to 10). This result correlates very well with the rapid induction of both cAMP levels and POMC transcription rate, which are maximal within 15 and 30 minutes of CRH treatment (147,255). Interestingly, CRH treatment did not enhance the binding of any of the complexes bound to NBRE probe (Fig. 2D, lanes 1 to 5), indicating that CRH specifically modulates NGFI-B when bound to the dimeric NurRE element.

Prior work in adrenal cells had shown dephosphorylation of NGFI-B at Ser316 in response to ACTH, as well as an inhibitory effect of phosphorylation on this residue for DNA binding (112,184,285). We used a NGFI-B Ser316 phospho-specific antibody in



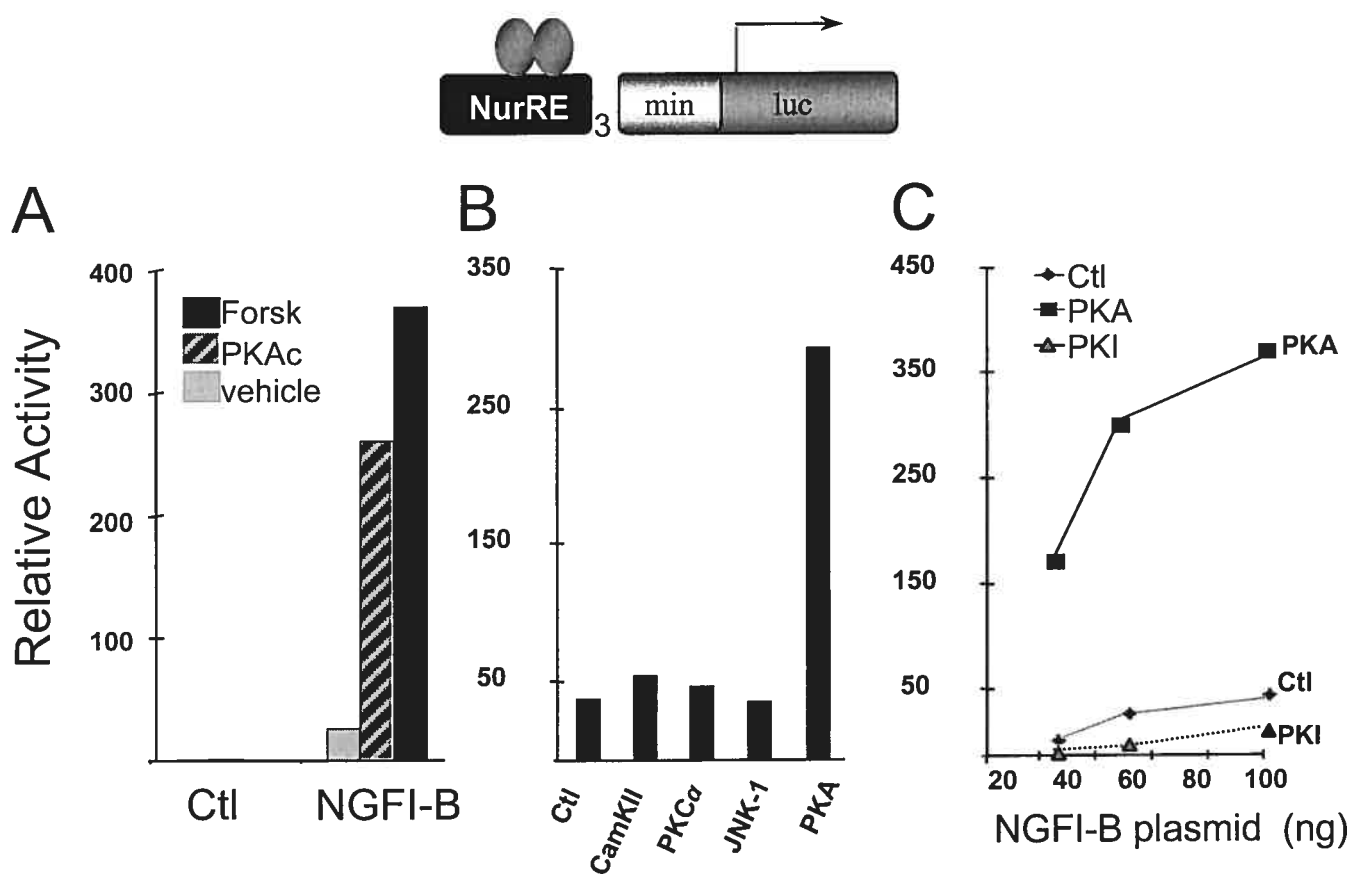
**FIGURE 3.2 The CRH/cAMP/PKA pathway transiently enhances NGFI-B binding to the NurRE.** **A)** NurRE binding activity is increased in whole cell extracts of AtT-20 cells treated for 30 min with forskolin  $10^{-5}$  M (lane 2) or CRH  $10^{-7}$  M (lane 4). These treatments result in a new complex (arrow) in gel retardation experiments using the NurRE probe. This new complex co-migrates with NGFI-B dimers as previously characterized (307,380). **B)** CRH treatment ( $10^{-7}$  M) of AtT-20 cells increases nuclear binding to the NurRE probe (lanes 3, 4) whereas cytoplasmic extracts from the same cells (lanes 1, 2) do not show significant binding. **C)** The NurRE binding activity of AtT-20 cells nuclear extracts is impaired by preincubation with an anti-NGFI-B antibody (provided by J. Milbrandt, lane 2) but not with an anti-Nurr1 antibody (provided by T. Perlmann, lane 3). These antisera were previously shown to block binding of cognate antigens in EMSA (307). The lower band may be monomeric binding or proteolytic degradation. **D)** Time course of CRH stimulation ( $10^{-7}$  M) of NurRE binding activity in nuclear extracts of AtT-20 cells (lanes 6-10). The binding activity of the same extract was also tested using a NBRE probe (lanes 1 to 5). **E)** Western blot analysis of NGFI-B phosphoSer316 (arrow) in whole cell extracts of vehicle and CRH ( $10^{-7}$ M) treated (30 min) AtT-20 cells (right panel). The same blot was also analyzed for control using an anti-NGFI-B antiserum produced in rabbit (left panel).

Western blot experiments to show that CRH induced dephosphorylation of this residue in AtT-20 cells (Fig. 2E). Thus, restoration of NGFI-B's ability to bind DNA may be one of the first effects of CRH. Taken together, these results suggest that in pituitary corticotropes, the CRH/cAMP/PKA pathway enhances NGFI-B transcriptional activity by modulating its DNA binding activity, particularly dimer binding to the NurRE.

### **3.4.3 PKA specifically potentiates NurRE-dependent NGFI-B transcriptional activity**

Since our results suggested that the CRH/cAMP/PKA pathway exerts its effects through preexisting proteins, we tested whether PKA would modulate NGFI-B transcriptional activity in an heterologous context. A NurRE-driven reporter was cotransfected with a CMV-NGFI-B expression plasmid or the empty vector in CV-1 cells. As expected, NGFI-B enhanced NurRE-dependent transcription. Both coexpression of PKA and treatment with forskolin potentiated NGFI-B transcriptional activity (Fig. 3A). PKA also enhanced the transcriptional activity of Nurr1 and NOR-1 (Fig. 4), suggesting a common mechanism of action for PKA on all three Nur factors. PKA and forskolin had no effect on the NurRE reporter alone, nor did they affect the activation of a DR-5 reporter by a CMV-RXR $\alpha$  plasmid, indicating that they were not acting on the CMV promoter of the expression plasmid (data not shown). In order to assess the specificity of PKA action on NGFI-B transcriptional activity, we coexpressed NGFI-B with a variety of kinases (CamK II, JNK-1 and PKC $\alpha$ ), and none of these enhanced NurRE-dependent NGFI-B transcriptional activity (Fig. 3B). We then tested if endogenous PKA activity modulated the transcriptional activity of NGFI-B. Indeed, in conditions where PKA enhanced NGFI-B activity, coexpression of NGFI-B and PKI resulted in approximately 50 % inhibition of NGFI-B transcriptional activity (Fig. 3C). Similar results were obtained with Nurr1 and NOR-1, whereas PKI had no effect on CMV-RXR $\alpha$  activity (data not shown).

Since gel retardation experiments suggested specific PKA action on NGFI-B dimers (Fig. 2), we then tested whether PKA would affect NBRE-dependent activity of monomeric NGFI-B. CV-1 (or COS-1) cells were transfected with a limiting amount of NGFI-B expression plasmid and increasing amounts of PKA along with reporter



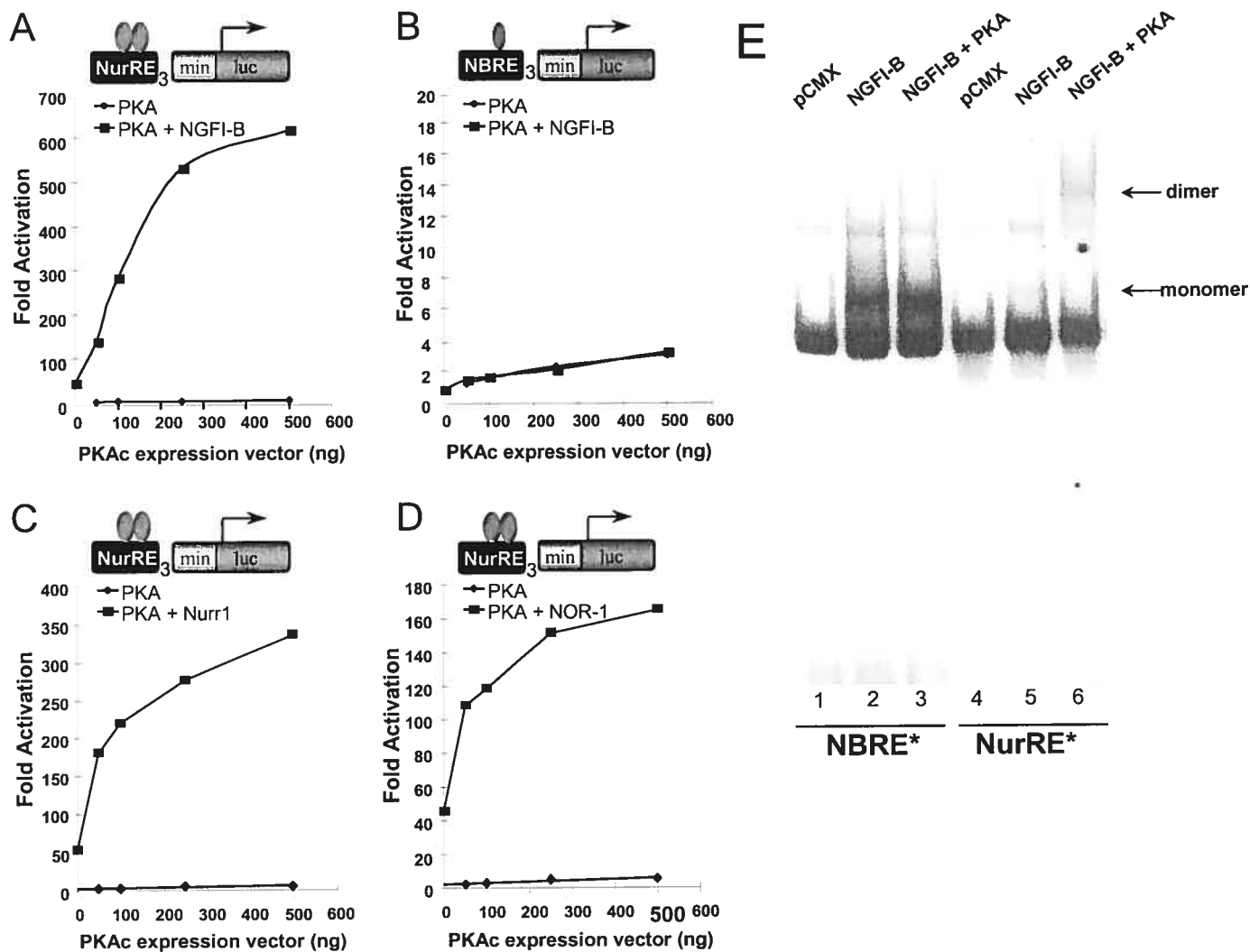
**FIGURE 3.3 Specificity of PKA potentiation of NGFI-B activity.** **A)** NGFI-B-dependent transcription assessed with a NurRE reporter is increased by co-expression of the catalytic subunit of PKA (100 ng of PKAc expression vector) or by forskolin (10<sup>-5</sup> M) treatment of CV-1 cells. **B)** Effect of different regulatory kinases on NGFI-B-dependent transcription using the NurRE reporter. Each kinase was overexpressed in transfected cells using appropriate expression vectors (473). **C)** NGFI-B-dependent transcription is enhanced by PKA and reduced by co-expression of PKA inhibitor, PKI, in CV-1 cells.



plasmids. In conditions where coexpression of PKA induced a ten-fold increase in NGFI-B transcriptional activity on the NurRE reporter (Fig. 4A), PKA has no significant impact on NBRE-driven transcription (Fig. 4B). Similar results were obtained for Nurr1 (Fig. 4C) and for NOR-1 (Fig. 4D). To examine the possibility that this specificity is a reflection of a differential effect of PKA on monomer versus dimer binding, we cotransfected COS cells with PKA and NGFI-B expression plasmids and performed gel retardation essays using whole cell extracts. As predicted, whereas cotransfection of PKA with NGFI-B resulted in a sharp increase in dimer binding on the NurRE, it had no effect on monomer binding on the NBRE (Fig. 4E). Thus, these results suggest that PKA specifically potentiates NurRE-dependent NGFI-B transcriptional activity by increasing dimer binding to the NurRE.

#### **3.4.4 NurRE- (but not NBRE-) dependent transcription is enhanced by SRCs.**

The current paradigm for NR activation of transcription stipulates that NRs recruit coactivator complexes to activate target promoters. However, a previous report concluded that Nurr1 monomers did not recruit the p160/SRC coactivator SRC-1 since Nurr1-dependent activation of a NBRE reporter was not stimulated by this coactivator (73). Given the specificity of PKA action on Nur dimers (but not monomers), we tested whether NurRE-dependent activity of NGFI-B, Nurr1 or NOR-1 would exhibit such a preference for coactivator recruitment. Expression vectors for Nur factors were cotransfected in AtT-20 cells with/without SRC-1 expression plasmid using the NBRE-Luc or NurRE-Luc reporters and SRC-1 did not enhance Nur factors-dependent activity on the NBRE-Luc reporter (Fig. 5A) as previously reported (73). In striking contrast, SRC-1 enhanced up to 10 times the transcriptional activity of all three Nur factors using the NurRE reporter (Fig. 5A). Thus, the ability of SRC-1 to enhance Nur-dependent transcription appears to be restricted to dimers of these factors. We then tested the ability of other p160 coactivators to enhance NGFI-B-dependent transcription (Fig. 5B). Cotransfection experiments conducted in CV-1 cells using either SRC-1, SRC-2 (TIF2) or SRC-3 indicated that all three p160 coactivators enhance NGFI-B-dependent transcription in a dose-dependent manner. Since SRC-1 is able to interact with the



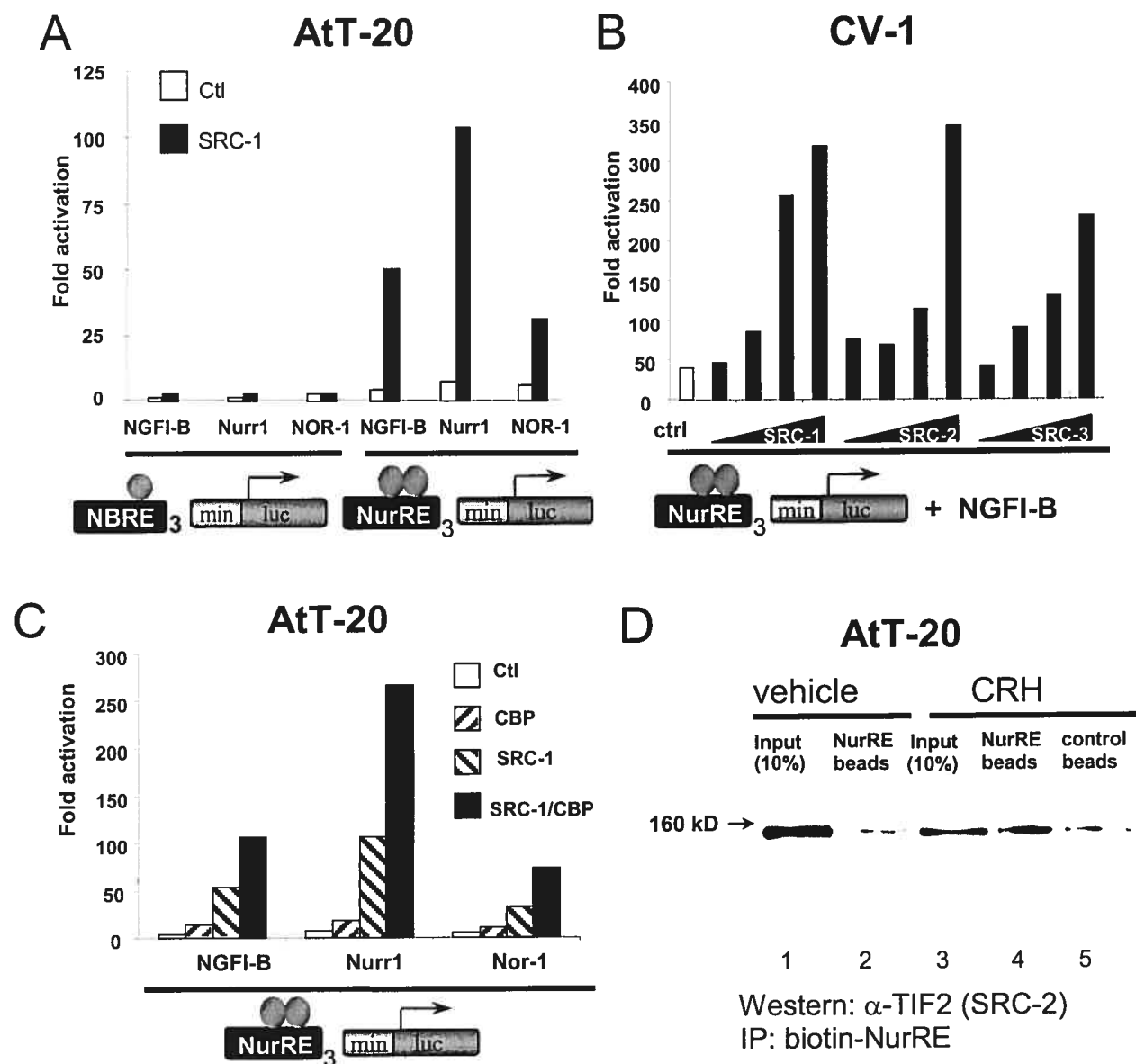
**FIGURE 3.4** PKA-dependent enhancement of NGFI-B activity selectively targets dimer binding NurRE, but not monomer binding NBRE. **A)** Effect of increasing amounts of PKAc expression vector on NGFI-B- (25 ng) induced activity of NurRE reporter transfected in CV-1 cells. **B)** Effect of increasing amounts of PKAc expression vector on NGFI-B- (25 ng) dependent activity of NBRE reporter. **C)** and **D)** Effect of increasing amounts of PKAc expression vector on, respectively, Nurr1- and NOR-1-dependent activation of NurRE. **E)** NurRE and NBRE binding activity present in whole cell extracts from COS cells transfected with expression vectors for NGFI-B alone (lane 2 and 5) or together with PKAc (lane 3 and 6).

C-terminus of CBP/p300 (532), we tested whether CBP and SRC-1 can act together to enhance Nur factor-dependent transcription. Expression vectors for CBP, SRC-1 or both were cotransfected with vectors for Nur factors in AtT-20 cells. On its own, CBP only slightly enhanced Nur factor-dependent activity by comparison to SRC-1, but together, they synergized to enhance the activity of all three Nur factors (Fig 5C). Dimerization of the Nur factors also appeared important for CBP action since no CBP-dependent enhancement was observed with the NBRE reporter [data not shown and (73)]. These data are consistent with the current model of co-recruitment of SRC and CBP coactivators by transcriptionally active NRs (315).

The similarities between coactivator and PKA-induced enhancement of NGFI-B transcriptional activity prompted us to assess if activation of the cAMP pathway results in increased recruitment of SRC family members. We performed an affinity precipitation assay using a biotinylated NurRE probe that was incubated with control or CRH-stimulated AtT-20 whole cell extracts. Complexes bound to streptavidin-agarose beads were analyzed by Western blot for presence of Nur factors and TIF2 (SRC-2). CRH treatment significantly increased the recruitment of TIF2 (SRC-2) in the NurRE-bound protein complexes that also showed increased Nur factors (antibody used recognized NGFI-B and Nurr1, Fig. 5D, compare lanes 2 to 1, and lanes 4 and 3).

#### **3.4.5 The N-terminus of both Nurr1 and NGFI-B mediates PKA potentiation and coactivator recruitment**

In order to gain further insight into the mechanisms of basal and PKA or coactivator-induced transcriptional activity of dimeric NGFI-B, we used a series of truncation mutants (Fig. 6A) in transfection experiments where we tested either their intrinsic transcriptional activity (Fig. 6B), the potentiation effect of PKA (Fig. 6C) or the enhancement by p160 coactivators (Fig. 6D). Deletion of the last 57 amino acids ( $\Delta C2$ ) resulted in a 60% decrease in transcriptional activity, suggesting the presence of an AF-2 activating domain in this vicinity. However, further deletion of aa 380 to 563 restored the activity to wild-type levels (Fig. 6B). Similar results were reported for NBRE-dependent activity of NGFI-B (111,371), suggesting the presence of a repressor domain between aa 380 and 506, which encompasses the LBD (Fig 6A). Progressive deletion of the NGFI-B



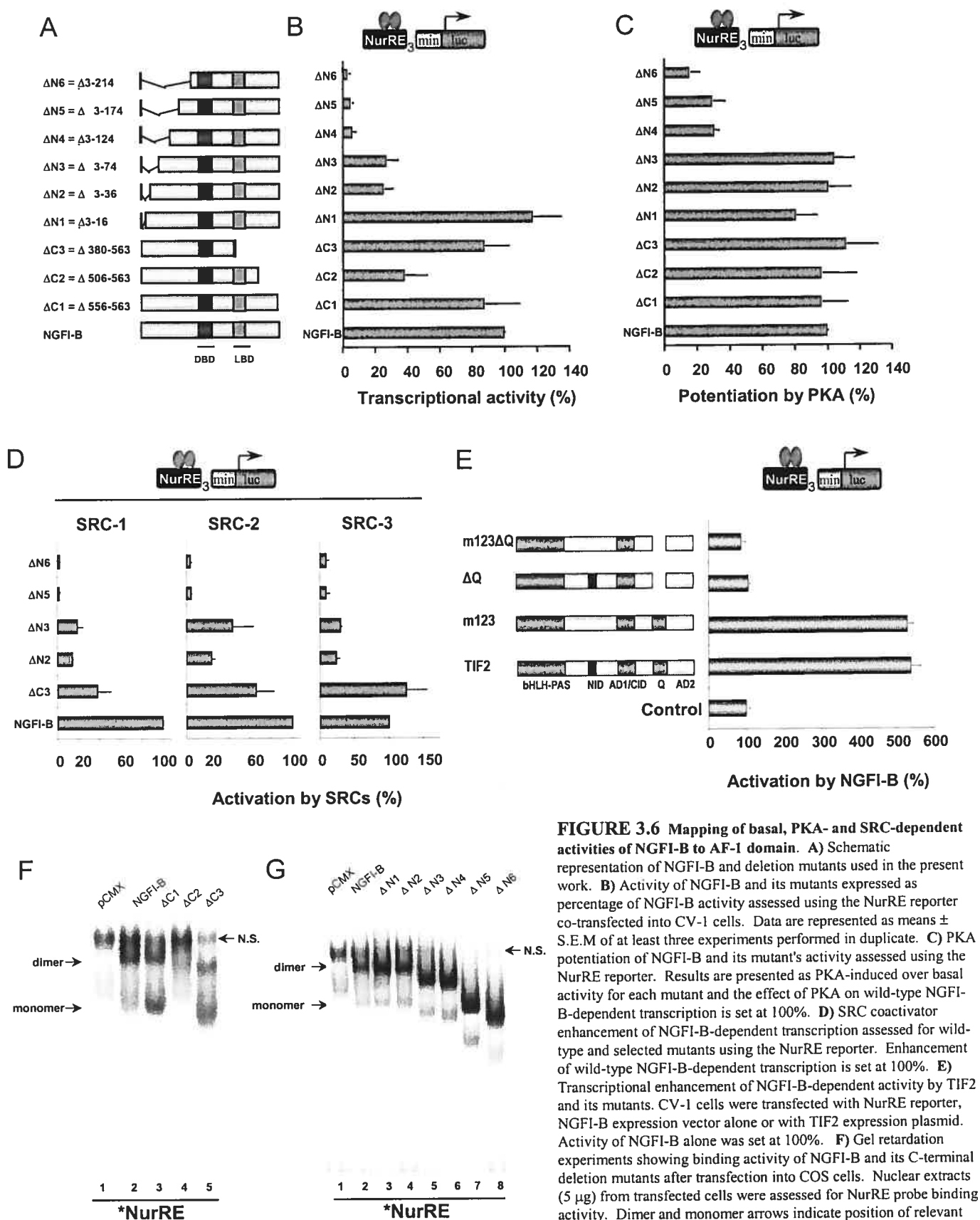
**FIGURE 3.5 All three p160/SRC coactivators enhance NurRE- (dimer) but not NBRE- (monomer) dependent transcription.** **A)** Activity of NGFI-B, Nurr1 or NOR-1 expression vector (25 ng) was assessed in AtT-20 cells using 200 ng of NBRE-reporter or NurRE-reporter in presence or absence of SRC-1 expression vector (1 ug). Data are expressed as ratios of luciferase activity in presence over absence of indicated Nur factor. **B)** Activity of NGFI-B (open bar, 100 ng) is enhanced by increasing amounts (100 to 1000 ng) of SRC-1, SRC-2 (TIF2) and SRC-3 expression vector cotransfected with NurRE-reporter (1 ug) in CV-1 cells. Data are expressed as fold activation compared to activity of reporter in absence of NGFI-B or SRCs. **C)** Nur factor expression vectors (25 ng) were cotransfected in AtT-20 cells with vectors (1 ug) for SRC-1, CBP or both, together with the NurRE reporter (300 ng). **D)** NGFI-B and coactivator recruitment to the NurRE revealed in affinity precipitation assay using antibody against Nur factors (NGFI-B/Nurr1, Santa Cruz) and a monoclonal TIF2 (SRC-2) antibody. AtT-20 cell extracts (500 ug) treated with either vehicle or CRH ( $10^{-7}$  M) for 30 min were subjected to affinity precipitation using a biotinylated NurRE probe and streptavidin-coated agarose-beads. n.s.: non-specific.

N-terminus completely abrogated NurRE-dependent transactivation and revealed the presence of two important domains together forming the AF-1 of NGFI-B (Fig. 6B). A first domain is located between aa 16 and 36, deletion of which can account for a 75% decrease in activity. A second region is located between aa 74 and 124, since the remaining activity was completely lost upon deletion of this region (Fig. 6B). Defective intracellular localization cannot account for the decreased activity of the N-terminal mutants, since all proteins were shown to be nuclear (111,371). Also, they all appeared to be expressed at similar levels ((111,371) and Fig. 6F and 6G).

We then tested the effects of PKA on the activity of these mutants. Neither deletion of the entire C-terminus, nor elimination of aa 3 to 74 of NGFI-B affected PKA potentiation. However, deletion between aa 74 and 124 resulted in a sharp decrease in PKA responsiveness (Fig 6C). Further deletion of the N-terminus had no significant effect. This clearly indicates that most of the effects of PKA are mediated by the region between aa 74 and 124 of NGFI-B.

Dephosphorylation of NGFI-B Ser316 appears to have a permissive role for DNA binding (112,184,285) and Fig. 2). A Ser316Ala NGFI-B mutant (which cannot be phosphorylated) might therefore be expected to have higher basal activity than NGFI-B. This was indeed observed (Fig. 6B) and, consistent with an effect of PKA on the NGFI-B N-terminus, the activity of this mutant was enhanced by PKA (Fig. 6C).

We then performed similar analysis with the three p160 coactivators. Only SRC-1, but not SRC-2 or SRC-3, recruitment/enhancement was affected by deletion of NGFI-B (Fig. 6D) or Nurr1 (data not shown) C-terminus. Progressive deletion of the N-terminal domain of NGFI-B resulted in a complete loss of SRC-dependent enhancement. Deletion of NGFI-B amino acids (aa) 3 to 36 resulted in a first decrease of SRC-dependent activity for all three SRCs and further deletion to position 74 did not further affect activity (Fig. 6D). This localization correlates well with the identification of NBRE- (111,371) and NurRE- (Fig. 6B) dependent AF-1 activity within the aa 20 to 36 interval. The remaining SRC-dependent activity was completely lost upon deletion of sequences between aa 74 and 174. Again, this region was also involved in NBRE- and NurRE-dependent NGFI-B activity (Fig. 6B). The transcriptional activity of AF-1 sequences is thought to depend on physical interaction with coactivators. The putative

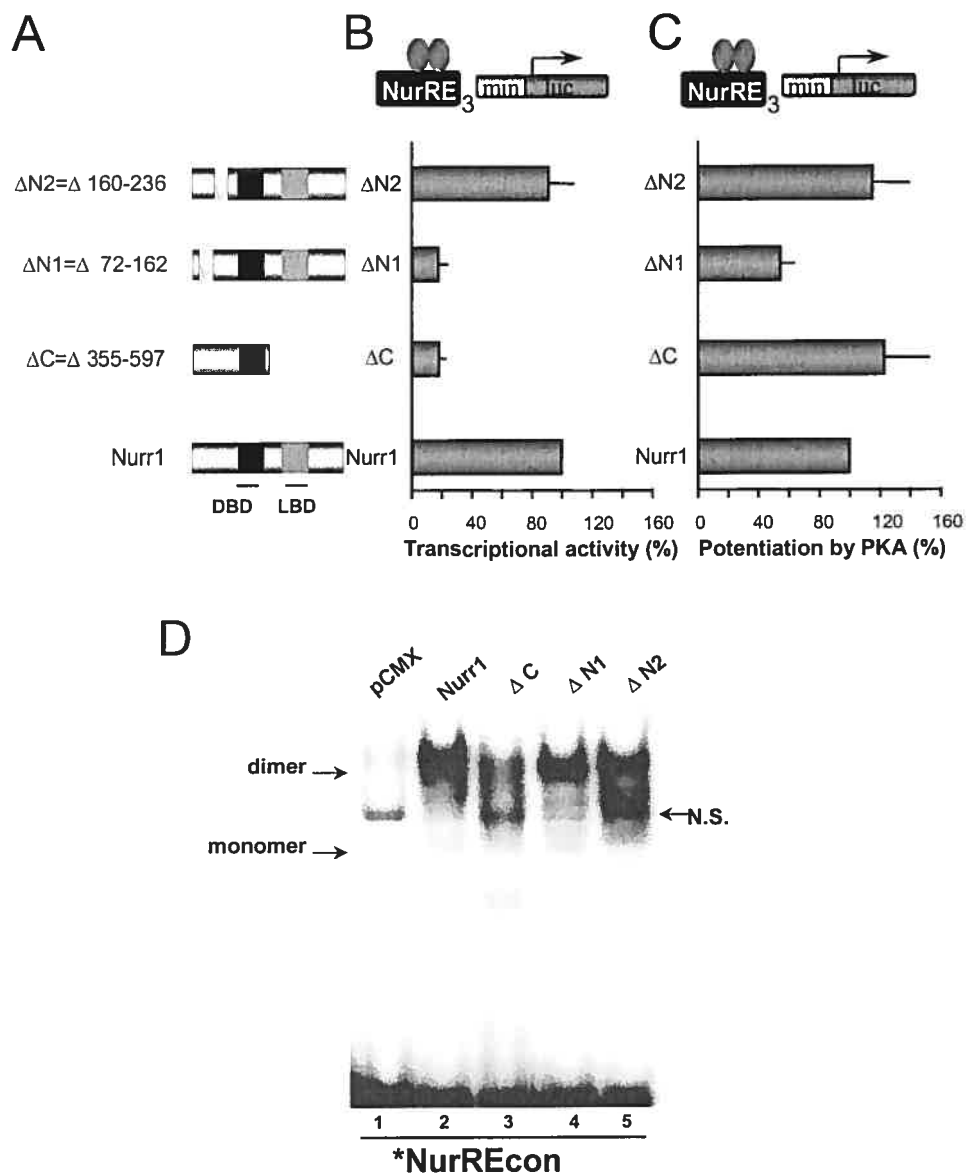


**FIGURE 3.6 Mapping of basal, PKA- and SRC-dependent activities of NGFI-B to AF-1 domain.** **A)** Schematic representation of NGFI-B and deletion mutants used in the present work. **B)** Activity of NGFI-B and its mutants expressed as percentage of NGFI-B activity assessed using the NurRE reporter co-transfected into CV-1 cells. Data are represented as means  $\pm$  S.E.M. of at least three experiments performed in duplicate. **C)** PKA potentiation of NGFI-B and its mutant's activity assessed using the NurRE reporter. Results are presented as PKA-induced over basal activity for each mutant and the effect of PKA on wild-type NGFI-B-dependent transcription is set at 100%. **D)** SRC coactivator enhancement of NGFI-B-dependent transcription assessed for wild-type and selected mutants using the NurRE reporter. Enhancement of wild-type NGFI-B-dependent transcription is set at 100%. **E)** Transcriptional enhancement of NGFI-B-dependent activity by TIF2 and its mutants. CV-1 cells were transfected with NurRE reporter, NGFI-B expression vector alone or with TIF2 expression plasmid. Activity of NGFI-B alone was set at 100%. **F)** Gel retardation experiments showing binding activity of NGFI-B and its C-terminal deletion mutants after transfection into COS cells. Nuclear extracts (5  $\mu$ g) from transfected cells were assessed for NurRE probe binding activity. Dimer and monomer arrows indicate position of relevant complexes for intact NGFI-B. N.S.= non-specific. **G)** DNA binding activity of NGFI-B and its N-terminal deletion mutants after transfection into COS1 cells. Nuclear extracts from these cells were used in gel shift assays using the NurRE probe. Similar results were obtained with in vitro translated proteins (data not shown).

interaction of SRC coactivators with the NGFI-B AF-1 domains was ascertained in recent work showing direct interactions in pull-down assays (498).

Distinct SRC regions mediate the AF-1 and AF-2 activities of NRs. In order to define the domains of TIF2 required for NGFI-B coactivation, we used a series of TIF2 mutants known to specifically impair interaction with either the AF-1 or AF-2 domains of ER $\alpha$  (34). Indeed, the TIF2m123 mutant containing alanine substitutions of critical leucines in all three LxxLL motifs of the NR interacting domain (NID) abrogates stimulation of the ligand-dependent AF-2 function, while the TIF2 $\Delta$ Q deletion mutant lacking the Q-rich domain impairs the ligand-independent AF-1 mediated transcriptional activity of ER $\alpha$  (34,489). In transient transfection experiments, the TIF2m123 mutant was as efficient as wild-type TIF2 in enhancing NGFI-B transcriptional activity whereas mutant TIF2 $\Delta$ Q abrogated TIF2-mediated enhancement (Fig. 6E). As expected, the double mutant TIF2m123 $\Delta$ Q was also deficient in enhancing NGFI-B-dependent activity (Fig. 6E). These results clearly implicate the AF-1 interacting Q-rich domain of TIF2 in NGFI-B coactivation.

Since PKA and SRCs only potentiated the activity of NGFI-B dimers on the NurRE (and not NBRE), the loss of activity by NGFI-B mutants could reflect impaired dimerization. In order to determine what region of NGFI-B is important for dimer binding on the NurRE, we transfected COS cells with expression plasmids for each truncation mutant and gel retardation experiments were performed using whole cell extracts. Two major complexes bind the NurRE in extracts from cells transfected with wild-type NGFI-B, the slower migrating one being predominant and consisting of NGFI-B homodimers (Fig. 6F, lane 2 and (306,379)). The extreme C-terminus appears to play some role in dimer binding, since deletion of the last seven aa resulted in approximately equal binding for both complexes, which was also observed upon deletion of the entire C-terminus (Fig 6F, lanes 3 and 4). Curiously, the mutant lacking the last 57 aa reproducibly exhibited only the slower migrating complex. Western blot analysis did not however support the conclusion that this mutant is expressed at lower level than other NGFI-B proteins (data not shown); inappropriate folding or sorting may account for the difference in DNA binding activity. All N-terminal mutants exhibited predominantly dimeric binding (Fig. 6G), indicating that the loss of basal and PKA-induced



**FIGURE 3.7 Structure/function analysis of Nurr1.** **A)** Schematic representation of Nurr1 and its deletion mutants. **B)** Activity of Nurr1 and its deletion mutants assessed by co-transfection into CV-1 cells using the NurRE reporter. Activity is expressed relative to that of Nurr1. **C)** Potentiation of Nurr1-dependent activity by PKA overexpression assessed by co-transfection into CV-1 cells using the NurRE reporter. **D)** DNA binding activity of Nurr1 and its deletion mutants assessed by gel mobility shift assays using nuclear extracts of transfected COS1 cells and the NuRE consensus probe as described previously (307). N.S = non-specific.



transcriptional activity is not a direct consequence of impaired ability to form dimers on the NurRE. Taken together, these results suggest that the N-terminus modulates the transactivation activities of NGFI-B, while the DBD and the extreme C-terminus appear to contribute to dimer binding to the NurRE.

A similar structure/function analysis reveals that Nurr1 behaves slightly differently than NGFI-B. Indeed, deletion of the C-terminus retained only 20 % of the relative activity of wild-type Nurr1 (Fig. 7B), indicating that it plays a prominent role in NurRE-dependent Nurr1 transactivation, which was not the case for NGFI-B. However, an internal deletion of aa 72 to 162 which removes all but the first three aa of the corresponding region defined as the AF-1 of NGFI-B also abrogated most of the transcriptional activity (Fig. 7B), thus ascribing a major role for the AF-1 of Nurr1 in NurRE-dependent transcription. Deletion of aa 160 to 236 had no effect on Nurr1 transactivation abilities. As seen for NGFI-B, only the mutant lacking the AF-1 showed impaired PKA potentiation (Fig. 7C), although it is still somewhat responsive to PKA, suggesting that other regions are responsible for part of the PKA effects.

All together, the analysis with deletion mutants identified a major role for the AF-1 of Nur factors in basal, PKA-induced and SRC enhancement of Nur dimer activity, and strongly suggests a link between PKA potentiation and coactivator recruitment by Nur factor dimers.

### 3.5 DISCUSSION

Although the primary response to CRH leading to activation of the cAMP/PKA pathway and accumulation of intracellular  $Ca^{2+}$  has been well characterized (252,255,401), a wide variety of POMC gene response elements as well as transcriptional effectors, have been proposed to mediate the nuclear events triggered by these second messengers. These include cFos (60), CREB (245) and PCRH-REB-1 (212). However, these proteins are probably not major factors relaying the effects of CRH since their promoter target sequences don't appear to be essential for CRH responsiveness. Our laboratory has previously identified an element essential for CRH responsiveness in the POMC promoter and shown that it is a target for NGFI-B dimers (306,379). The

demonstration that a dominant negative mutant of NGFI-B abolished CRH-dependent activity of both the NurRE and the intact POMC promoter (379) strongly suggested that this orphan NR was a major integrator of the signals elicited by CRH in pituitary corticotropes.

We now report that the NurRE is highly responsive to activation of cAMP/PKA signaling and that inhibition of PKA abrogates its responsiveness to CRH (Fig.1), thus confirming that the CRH/cAMP/PKA pathway signals in this system through activation of NurRE-dependent transcription by NGFI-B. NurRE responsiveness cannot be due to induction of NGFI-B mRNA transcription, since Nur subfamily protein levels were unaffected by CRH treatment. This is in agreement with our previous observation that CRH effects on POMC transcription do not require *de novo* protein synthesis (148). Rather, CRH enhances NurRE binding by a nuclear complex containing NGFI-B, and we showed that this binding peaks after 30 minutes of CRH treatment. This correlates very well with previous reports which had demonstrated that cAMP levels and POMC transcription reach their maximum within 15 to 30 minutes following CRH treatment (148,255). These results further position NGFI-B as the major mediator of CRH signaling, although other mechanisms might also contribute to CRH responsiveness in certain conditions. Thus, signaling through NGFI-B may involve acute responses mediated through existing protein in addition to effects elicited through NGFI-B gene transcription. It is noteworthy that a variety of genes that are thought to be regulated by NGFI-B are also inducible by the cAMP/PKA pathway. Among these are the salivary-specific R15 gene (288), the steroidogenic p450c21 (21-hydroxylase) (78) and p450c17 (542) genes, as well as a variety of thyrocyte-specific genes (382). It is therefore tempting to propose that modulation of NGFI-B transcriptional activity is a general mechanism by which the cAMP/PKA pathway may exert its effects.

Our results suggest that PKA signaling regulates the transcriptional activity of NGFI-B (Fig. 3 and 4). Indeed, we demonstrated that stimulation of PKA signaling strongly enhanced Nur factor transcriptional activity and DNA binding activity to the NurRE. The potentiation effect of PKA appeared specific to Nur dimers and the NurRE (Fig. 3 and 4). Both dimer binding (Fig. 2 and 4E) and PKA effects are closely associated as shown by activation of the PKA pathway (Fig. 4) or by its blockade (Fig. 1

and 3). This is supported by the observation that CRH does not induce NGFI-B binding to the NBRE (Fig. 2), nor does it significantly increase NBRE-dependent transcription (379). The first level at which PKA signaling may intervene is DNA binding since the NGFI-B DBD is known to be dephosphorylated at Ser316 following activation [(112,285); Fig. 2E] to allow protein:DNA interaction. NGFI-B was also shown to be hyperphosphorylated in the N-terminus in response to some signals (112) and such action would be consistent with the involvement of the AF-1 in PKA action (Fig. 6C). However, it is doubtful that N-terminal phosphorylation plays a major role in dimer formation since only C-terminal deletion affected NGFI-B dimers (Fig. 6F). Thus, PKA signaling may initially have a mostly permissive effect for DNA binding by inducing dephosphorylation of the DBD. In itself, this does not however explain the preference for dimer binding to DNA observed in nuclear extracts of PKAc or CRH-treated cells (Fig. 2 and 4E). In any event, NGFI-B appears to be the end point mediator of PKA signaling initiated by the G-protein coupled CRH receptor.

Nur factor-dependent activation of transcription appeared until recently very atypical in the NR superfamily, not only because of the lack of ligand, but also because of the apparent independence from coactivator recruitment when activating as monomers [(73) and Fig. 5]. Monomer activity *per se* may not however account for Nur factor's inability to recruit p160 coactivators since another monomer acting NR, SF-1, does recruit these coactivators (103,174,201). Classically, NRs ligand binding is thought to induce conformational changes in the LBD that result in association between the AF-2 domain and coactivators, which in turn, contact the basal transcriptional machinery to increase transcription. It is thus of particular interest that coactivators of the p160/SRC and CBP/p300 families are specifically recruited by Nur factors acting as dimers following PKA activation. The specificity of dimer action may depend on the effects of the PKA pathway on the NGFI-B N-terminus and its ability to recruit coactivators. In this context, it is noteworthy that the NGFI-B AF-1, rather than AF-2, is involved in PKA dependence and SRC coactivator recruitment. Dimer specificity may result from stabilization of DNA-bound dimers (but not monomers) by AF-1-dependent interaction with the coactivators. Recent reports showing ligand-independent recruitment of coactivators to NRs through phosphorylation of the AF-1 have implicated the MAPK

pathway (174,470). The striking requirement for dimers also sets this mechanism apart from a recent study reporting both NBRE- and NurRE-dependent transcription enhancement by the coactivator ASC-2 (445).

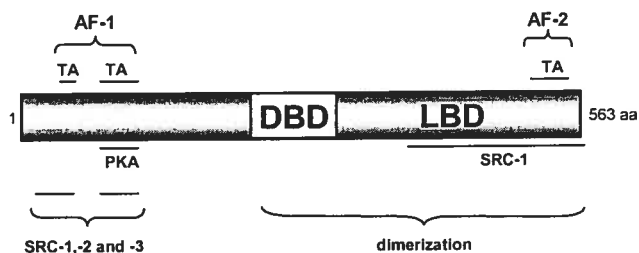
Structure function analysis indicated that the AF-1 domain of NGFI-B and Nurr1 were absolutely required for NurRE-dependent basal and PKA-enhanced transcriptional activity (Fig 6 and 7). A summary of our structure/function results is presented in Figure 8A for NGFI-B. In this case, the AF-1 could be subdivided into two distinct regions: a first one between aa 16 and 36 primarily involved in basal activity and a second one between aa 74 and 124 which conferred most, if not all, responsiveness to PKA. A deletion between aa 72 to 162 of Nurr1, which encompasses the corresponding AF-1 region of NGFI-B impaired both basal activity and PKA potentiation, suggesting a common role for the AF-1 of Nur factors. The Nurr1 C-terminus may have a different role compared to NGFI-B. The stimulatory effects of SRC coactivators on NGFI-B activity were also mapped to the same AF-1 subdomains that are important for basal activity (Fig. 8A). Thus, only one NGFI-B AF-1 subdomain (aa 74-124) is targeted by both PKA signals and SRC coactivators. It is noteworthy that only SRC-1, but not SRC-2 or SRC-3, showed some dependence on the C-terminal AF-2 domain of NGFI-B (Fig. 6D), possibly reflecting differential properties of SRC coactivators. The strong dependence of NGFI-B on its AF-1 function sets it apart from most NRs and may be taken as further indication of its role as end point of a cytoplasmic signaling cascade such as the PKA pathway. This is further highlighted by the fact that only the AF-1-interacting Q-rich domain of TIF2 is important for transcriptional stimulation of NGFI-B activity (Fig. 6E), and that this domain is known to stimulate the ligand-independent activity of NRs following phosphorylation of their AF-1 (34,470).

We do not know whether PKA itself or another downstream kinase is targeting NGFI-B. PKA was reported to modulate the activity of a variety of NRs. However, the transcriptional effects seem to vary depending on the receptor. Indeed, while PKA enhances binding and transcriptional activity of SF-1 (452), GR (395) and MR (312), it has the opposite effect on HNF4 (487). This is interesting since HNF4 has an A box similar to that of NGFI-B, and the negative effects of PKA have been attributed to phosphorylation of a serine (Ser134) that corresponds to Ser316 in the DBD of NGFI-B

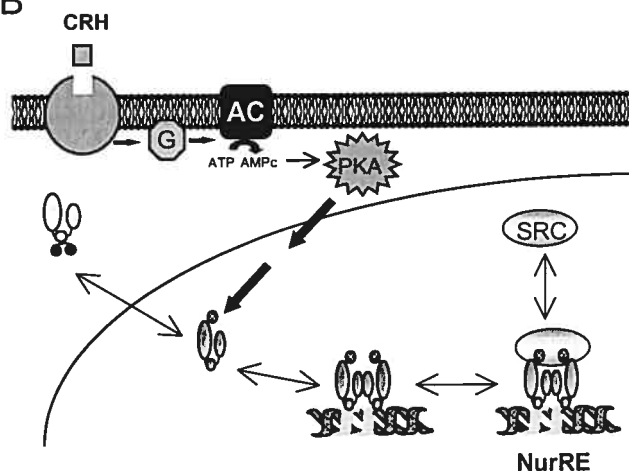
(487). This observation along with the known negative effect of phosphorylated Ser316 on NBRE binding (184,285) suggests that PKA itself might not be directly phosphorylating NGFI-B. An indirect effect of PKA is also supported by the fact that ACTH-induced PKA signaling results in hypophosphorylation of NGFI-B Ser316 in adrenals (112,184). PKA might modulate the activity of phosphatases such as calcineurin; interestingly, the calcineurin inhibitor Cyclosporine A is thought to inhibit T-cell apoptosis by interfering with NGFI-B binding activity (535). Also, the phosphatase 1 and 2A inhibitor okadaic acid prevents dephosphorylation of Ser316 in ACTH-treated Y1 cells (285). In any case, phosphorylation of Ser316 could explain why the cytosolic form of NGFI-B present in AtT-20 cells did not bind the NurRE (Fig. 1 and 2).

In summary, we have shown (Fig. 8B) that CRH stimulation of cAMP/PKA signaling leads to dephosphorylation of NGFI-B Ser316 permitting DNA binding. PKA action also rapidly increases nuclear dimer (but not monomer) NGFI-B DNA binding activity, SRC coactivator recruitment to the AF-1 domain and NGFI-B-dependent transcription. Although not tested in the present work, the coactivators themselves could be targets of CRH/PKA signaling. Such regulatory events have been well documented both for CBP and p160 coactivators (18,116,412). NGFI-B transcriptional enhancement is primarily exerted through the N-terminal AF-1 rather than AF-2 domain, setting Nur factors apart from others NRs. The present work clearly establishes NGFI-B as an effector for the cAMP/PKA pathway. It also highlights the unique features of cAMP/PKA-dependent transcriptional activation by comparison to ligand-dependent NR action.

A

**NGFI-B structure/function**

B



**FIGURE 3.8 Model of NGFI-B structure and activation mechanism. A) Summary of structure/function data for NGFI-B dimer action on NurRE-dependent transcription.** The N-terminus contains a composite AF-1 domain where both subdomains (indicated by bar) confer part of basal transcriptional activity (TA) and SRC coactivator-dependent activity. Only the distal subdomain (aa 74 to 124) is required for PKA potentiation. The C-terminal AF-2 domain only appears to be implicated in SRC-1 recruitment. Homodimerization appears to be mainly mediated through the DBD with some contribution by the C-terminus. **B) Working model for action of CRH/cAMP/PKA pathway on NGFI-B transcriptional activity.** Upon PKA activation, NGFI-B is dephosphorylated on the DBD (Fig. 2E) and the activity of its N-terminal AF-1 domain is enhanced, presumably by phosphorylation (112) and recruitment of SRC coactivators (Fig. 5). Both PKA action and SRC enhancement are preferentially exerted on DNA target of Nur factor dimers.

## 3.6 MATERIALS AND METHODS

### 3.6.1 Plasmids and oligonucleotides

The various reporter plasmids were constructed in pXP1-luc (346) containing the minimal (-34/+63) POMC promoter. The -480 POMC promoter was previously described (464). NBRE (5'-GATCCTCGTGCGAAAAGGTCAAGCGCTA-3') or NurRE<sub>POMC</sub> (5'-GATCGTGATATTTACCT CCAAATGCCA-3') oligonucleotides containing plasmids were cloned as described (306). The same oligonucleotides were used in gel shift experiments; the NurRE<sub>CON</sub> (5'-GATCCGTGACCTTTATTCTCAAAGGTCA-3') was also used in EMSA. CMX-Nurr1 and CMX-NGFI-B expression vectors contain complete cDNA sequences for rat proteins cloned into pCMX (480). NGFI-B N-terminal mutants are deleted between amino acids 3 to 36, 3 to 74, 3 to 174 or 3 to 214 and the  $\Delta$ C mutants are deletions that end at the aa indicated in Figure 6A.  $\Delta$ C Nurr1 mutant is a C-terminal deletion that ends at aa 352 and Nurr1 N-terminal mutants are internal deletion between aa 72 and aa 162, and between aa 160 and aa 236. Full-length SRC-1 expression vector was described previously (471). Full-length TIF2 (SRC-2) was provided by P. Chambon and described in (489) and was subcloned in the pCMX vector within the Kpn1 and BamH1 sites. The various TIF2 mutants were described in (34). Full-length CBP expression vector was previously described (91).

### 3.6.2 Cell culture and transfections

CV-1 cells were grown in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% bovine fetal serum and maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. AtT20 D16v cells were grown in the same conditions, except that charcoal-stripped fetal bovine serum was used. CV-1 cells were transfected using the calcium phosphate co-precipitation method, whereas AtT-20 cells were transfected by lipofection using LipofectAMINE (Gibco BRL), as previously described (380). Results are presented as the means of 3 to 10 experiments performed in duplicate. RSV-GH was used as an internal control for transfection efficiency.

### 3.6.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

The electrophoretic mobility shift assays were performed as described (306). Binding reactions were performed in 20  $\mu$ l containing gel shift binding buffer (10 mM Tris.HCl pH 8.0, 40mM KCl, 1mM DTT, 6% glycerol, 0.05% NP-40), 500 ng poly (dIdC) and about 5  $\mu$ g of cell/nuclear extracts. We used 50 000 cpm per reaction (~20 fmol) of double-stranded oligonucleotide probes, end-labeled by filling-in with Klenow in the presence of  $^{32}$ P- $\alpha$ -dATP, and purified on G-25 Sephadex column. The reactions were incubated for 10 minutes at 25°C prior to loading. The samples were separated by electrophoresis using 5% polyacrylamide gels (29:1 acrylamide:bis-acrylamide) in 0.5X TBE at 25°C for 2 to 2.5 h. For supershift experiments, the antibodies were preincubated with the nuclear extracts for 30 minutes at 25°C prior to probe addition.

### 3.6.4 Preparation of AtT-20 extracts

After CRH or forskolin treatment, approximately  $4 \times 10^7$  AtT-20 cells were washed once with cold PBS and then harvested with cold PBS containing 1mM EDTA. The cells were then centrifuged and then resuspended in 500  $\mu$ l of buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1mM DTT and 10  $\mu$ g/ml of each of the protease inhibitors leupeptin, aprotinin and pepstatin). Cells were allowed to swell on ice for 15 minutes before addition of 50  $\mu$ l of NP-40 followed by vigorous vortexing. After centrifugation, the supernatant (cytosolic fraction) was set aside and the nuclear pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of buffer B (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM EGTA, 0.4 M NaCl, 5% glycerol, 0,5 mM PMSF, 1mM DTT, and 10  $\mu$ g/ml of each of the protease inhibitors) and shaken vigorously at 4°C for 30 minutes. The extract was then centrifuged and the protein concentration of the supernatant (nuclear fraction) estimated by Bradford assay.

### 3.6.5 Biotinylated-DNA affinity precipitation assay

AtT-20 whole cells extracts (500  $\mu$ g) were incubated for 10 minutes at 4°C with gel shift binding buffer (see above), and 20  $\mu$ g of poly dIdC in a final volume of 1mL. A pre-clearing was performed by adding 50  $\mu$ L of a 50% slurry (washed twice with PBS) of



streptavidin-coated agarose beads (Pierce), and incubated for 15 minutes with gentle rocking at 4°C. After centrifugation, the supernatant was incubated with 1 µg of a double stranded biotinylated NurRE probe for 4 hours to overnight at 4°C with gentle rocking. Then 50 µL of streptavidin-coated agarose beads (50% slurry) were added followed with a further 2 hours incubation at 4°C. Beads containing bound complexes were recovered by centrifugation and washed twice with Tris-EDTA (100 mM NaCl), twice with gel shift binding buffer and once with PBS, before being subjected to SDS-PAGE and western blot analysis.

### 3.6.6 Western Blotting

Western blotting of 25 µg of nuclear extract or 50 µg of cytosolic extract was performed using an anti-NGFI-B antibody from Geneka, or an anti-NGFI-B antibody produced in this laboratory (Fig. 2E), anti-Nurr1 antibody (sc-991, Santa Cruz), anti-NGFI-B/Nurr1 antibody (sc-990, Santa Cruz), anti-NGFI-B phosphoSer316 (kindly provided by Dr Y Hirata) or monoclonal anti-TIF2 (generously provided by Dr P. Chambon) and anti-rabbit (or mouse) IgG-horseradish peroxidase conjugate (Sigma). Revelation was performed by chemiluminescence as described by the manufacturer (ECL+plus; Amersham Pharmacia).

### 3.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Vincent Giguère, Sylvain Meloche and colleagues of the laboratory for critical comments on the manuscript. We are very thankful to Dr. Jeffrey Milbrandt for NGFI-B antisera, Dr Thomas Perlman for providing antisera against Nurr1, to Dr Pierre Chambon for the TIF2 antibody, and to Dr Yoko Hirata for the NGFI-B phosphoSer316 antibody. We are grateful to Drs Vincent Giguère, O. Conneeley and N. Ohkura for the NGFI-B, Nurr1 and NOR-1 cDNAs, respectively. Dr S. McKnight generously provided the expression plasmids for PKAc and PKI as did Dr Pierre Chambon for the TIF2 expression vector and mutant constructs. The help of Amin Ismael and Véronique Montplaisir for EMSA, and Yoko Schreiber for transient transfections was helpful. And we thank Lise Laroche for her expert secretarial assistance. This work was funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and M. Maira is the recipient of a doctoral research award from CIHR.

**CHAPITRE 4****THE T-BOX FACTOR TPIT RECRUITS SRC/p160 COACTIVATORS AND  
MEDIATES HORMONE ACTION****Maira M, Couture C, Le Martelot G, Pulichino AM, Bilodeau S, Drouin J \***

J Biol Chem. 2003 Nov 21;278(47):46523-32. Epub 2003 Sep 11

Laboratoire de génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal  
110 des Pins Ouest  
Montréal QUÉBEC  
Canada H2W 1R7

and

Université de Montréal  
Département de biochimie  
C.P. 6128, Succ. Centre-ville  
Montréal, Canada H3C 3J7

**Keywords:** T-box, Tpit, Tbx19, SRC-2, NGFI-B, PKA, POMC, CRH

**\*Corresponding author:** Dr Jacques Drouin  
Laboratoire de génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110, avenue des Pins Ouest  
Montréal QUÉBEC Canada H2W 1R7  
Tel: 514-987-5680  
Fax: 514-987-5575  
[drouinj@ircm.qc.ca](mailto:drouinj@ircm.qc.ca)

## 4.1 Résumé du chapitre

Ce chapitre portera sur l'identification d'un nouveau médiateur de l'action du CRH sur le promoteur POMC, soit le facteur à boîte T Tpit, ainsi que sur l'étude des mécanismes transcriptionnels impliqués dans ce nouveau rôle. Cette étude découle des observations, rapportées au chapitre précédent, qui montrent que le coactivateur SRC-2 est recruté au promoteur de POMC par NGFI-B en réponse à la stimulation par le CRH. J'ai donc entrepris de tester l'hypothèse que SRC-2 pouvait également cibler les autres régulateurs de POMC, étant donné qu'il avait été montré que les coactivateurs de la famille SRC peuvent rehausser l'activité de divers types de facteurs de transcription.

Les études présentées dans ce chapitre montrent que le coactivateur SRC-2 rehausse l'activité transcriptionnelle du couple Tpit/Pitx en interagissant spécifiquement avec Tpit via son domaine Q-riche, soit le même qui médie l'interaction avec NGFI-B. De plus, il est montré que Tpit est une cible de voies de signalisation intracellulaire, puisque son activité est augmentée par PKA et que le Tpit/Pitx-RE confère une réponse transcriptionnelle au traitement par le CRH. La PKA semble agir en potentialisant l'effet coactivateur de SRC-2 sur l'activité transcriptionnelle de Tpit, et les effets activateurs de PKA/SRC-2 requièrent l'extrémité N-terminale de Tpit. Ces travaux montrent également que le CRH active la voie MAPK Erk1/2, qui est en aval de l'AMPC/PKA, et que la réponse transcriptionnelle du NurRE, du Tpit/Pitx-RE ainsi que du promoteur POMC peut être bloquée en inhibant la voie MAPK. Enfin, Tpit et NGFI-B interagissent physiquement et activent la transcription de manière synergique, ce qui suggère que ces deux facteurs font partie d'un même complexe formé au promoteur et qui active la transcription du gène POMC en réponse à la stimulation par le CRH.

## 4.2 SUMMARY

Tpit (Tbx19) is a transcription factor belonging to the T-box family and it is essential for late differentiation of pituitary pro-opiomelanocortin (POMC)-expressing corticotroph and melanotroph cells. Tpit is also required, both in humans and mice, for cell-specific expression of the POMC gene in cooperation with the homeoprotein Pitx1. Despite their important roles as developmental regulators, the molecular mechanisms underpinning the functions of T-box factors in general, and of Tpit in particular, are still poorly defined. We now report that Tpit functions as an activator of transcription by recruiting SRC/p160 coactivators to its cognate DNA target in the POMC promoter, the Tpit/Pitx-RE. We also show that Tpit is a mediator of hormone signalling and that the Tpit/Pitx-RE is responsive to signals elicited by the hypothalamic hormone CRH. These signals are mediated by the PKA and MAPK pathways and activation of PKA also enhances Tpit and SRC-dependent transcription. We have previously shown that CRH action is also exerted at the POMC promoter through the orphan nuclear receptor NGFI-B and its recruitment of SRC coactivators. Given that Tpit exhibits transcriptional synergy with NGFI-B, our results suggest that Tpit, along with NGFI-B and SRC-2, is part of a transcription regulatory complex assembled on the POMC promoter in response to hormonal stimulation.

### 4.3 INTRODUCTION

Tpit (also known as Tbx19) is a member of the T-box family of transcription factors. These transcriptional regulators play critical roles in development and the prototypical and founding member of the family is Brachyury or Tail (T) (364,365,443). Within the family, Tpit is most similar to T and exhibits a highly restricted pattern of expression; indeed, it is solely expressed in a subset of pituitary lineages, the POMC-expressing corticotrophs and melanotrophs. Its expression starts at day e12.5 and is maintained throughout adulthood (258). Tpit was shown to be crucial for cell-specific expression of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene, in cooperation with the homeoprotein Pitx1 (258). Gain-of-function experiments showed that Tpit could induce uncommitted pituitary cells into POMC-expressing cells (258). Gene inactivation studies revealed a failure of prospective corticotrophs and melanotrophs to reach terminal differentiation (as defined by POMC expression) but no effect on their precursors: thus, Tpit is required for late differentiation but not for lineage commitment (391). Tpit is also a negative regulator of gonadotroph differentiation, as inactivation of the Tpit gene switches cells to the gonadotroph fate (391). As predicted by the exquisite association between Tpit and POMC-expressing cells, mutations of the *TPIT* gene are associated at high frequency (73%) with early onset isolated deficiency of pituitary ACTH (IAD) in humans (390).

Tpit is a 446 amino acid protein containing a sequence-specific DNA-binding domain, the T-box, which is highly homologous to Brachyury. Protein sequence analysis reveals 84% homology with Brachyury in the T-box compared to 58% to 64% with other T-boxes (258). T-box transcription factors can bind DNA either as dimers on a palindromic DNA element (232,334) or as monomers on T element half-sites (258,439). Tpit activates POMC gene transcription in cooperation with the homeoprotein Pitx1, and both transcription factors bind DNA as monomers at contiguous sites on the POMC promoter, within the Tpit/Pitx regulatory element (Tpit/Pitx-RE) (258). Tpit DNA-binding activity is important for transcriptional activation, as highlighted by the fact that mutation in the Tpit binding site greatly reduces POMC promoter activity (258). Moreover, three *TPIT* mutations that abolish DNA binding have been identified in IAD patients and no longer activate POMC transcription (390). Tpit was also involved in

transcriptional repression, which likely accounts for its role as a negative regulator of gonadotroph differentiation. Tpit and the nuclear receptor SF-1 mutually antagonize each other's transcriptional activity by a mechanism of trans-repression that does not require Tpit DNA-binding activity (391).

POMC expression becomes hormonally regulated by the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) axis at around day e15 in mice (300). Proteolytic processing of POMC in anterior pituitary corticotrophs produces the hormone adrenocorticotropin (ACTH) that controls adrenal glucocorticoid synthesis, and these steroids exert a negative feedback on the upper levels of the axis (147). POMC gene expression is itself under the positive control of hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH). Extensive studies have characterized the early steps of corticotrophs response to CRH, which include activation of the cAMP/PKA pathway, MAPK activation and accumulation of intracellular  $Ca^{2+}$  (241,252,255,401). We have demonstrated that nuclear receptors (NRs) of the NGFI-B subfamily (Nur factors) are important mediators of CRH action on POMC and at least part of the CRH effects are mediated through their binding element in the promoter, the NurRE (305,306,379). Nur factors are also implicated at the other levels of the HPA axis, in regulation of cell death and in a variety of developmental events (reviewed in (305)). In addition, an ever-increasing body of work has demonstrated that the transcriptional activity of NGFI-B is closely regulated by phosphorylation events. In basal conditions, the N-terminus and DNA-binding domain (DBD) of NGFI-B are phosphorylated, with key DBD serines such as Ser316 preventing DNA binding (111,136). Depending on the system and stimulus, the phosphorylation status of NGFI-B is modified, resulting in differential regulation of its transcriptional activity. For example in adrenal-derived Y1 cells, ACTH treatment leads to dephosphorylation of Ser316 and unmasking of DNA binding activity, with a concomitant hyperphosphorylation of its N-terminus that results in increased transcriptional activity (112,285). We have also demonstrated that CRH treatment of AtT-20 cells leads to dephosphorylation of Ser316, thus playing a permissive role for subsequent NGFI-B dimer binding and coactivator recruitment (305).

We have also shown that SRC/p160 coactivators are important mediators of CRH action, as they are recruited to Nur dimers in response to CRH (305). The SRC/p160 family includes three homologous members, namely SRC-1, SRC-2 (also known as TIF2

or GRIP1) and SRC-3 (also known as p/CIP, RAC3, ACTR, AIB1 or TRAM-1) (279,318). SRC/p160 coactivators were first cloned as transcriptional partners for NRs, but they were also shown to function with other transcriptional regulators, such as the bZIP factor c-Jun (463), the bHLH factor myogenin and the MADS box factor MEF2c (85). SRC/p160 coactivators enhance the activity of transcription factors in part because of their intrinsic histone acetyltransferase (HAT) activity and also by recruitment of other transcriptional regulators. These include an array of chromatin remodelers such as CBP/p300 and p/CAF, the histone methyltransferase CARM-1, and BAF 57, a subunit of the SWI/SNF complex. In addition, SRCs interact with proteins of the general transcriptional machinery such as TFIIB and TBP [for review see (278,318)]. SRC-2 has also been shown to function as a corepressor for the glucocorticoid receptor GR (409) and different domains of SRC-2 are implicated in coactivator versus corepressor activities (408).

We now report that Tpit recruits SRC coactivators, resulting in enhancement of Tpit-dependent transcription. PKA activation also modulates Tpit activity, seemingly by modulating SRC recruitment. We also show that the Tpit/Pitx-RE of the POMC promoter is responsive to signals elicited by CRH and mediated by PKA and MAPK pathways. Tpit also exhibits transcriptional synergism with NGFI-B, thus suggesting that Tpit is part of a transcription regulatory complex assembled on the POMC promoter in response to hormonal stimulation.

## 4.4 EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 4.4.1 Plasmids and oligonucleotides

The various reporter plasmids containing the minimal (-34/+63) POMC promoter were described before; the -480 POMC promoter in (464), the NurRE in (379) and the Tpit/Pitx-RE (previously known as CE3) and its various mutants, as well as the POMC promoter containing mutations in either Tpit or Pitx site in (258). The reporter plasmid containing the Tpit/Pitx-RE with the minimal POMC promoter lacking the AP-1 site (-36/+26) was constructed by inserting three copies of the Tpit/Pitx-RE at the Bam HI site of the pXP1 vector as described before (259). The NGFI-B (305), Pitx1 (259) as well as



the Tpit, Brachyury and Tbx1 (258) expression vectors were described elsewhere. The Myc-Tpit and Flag-Pitx1 expression plasmids were constructed by PCR amplification of the complete cDNA sequences for mouse proteins cloned into the RSV-driven expression vectors previously used for Pitx1 (259); in both cases the 5' primer contained the coding sequence for the respective epitope. Tpit deletion mutants were constructed by PCR amplification in the same expression vector as wild-type Tpit (258). Tpit  $\Delta$ N mutant lacks the first 30 amino acids and the  $\Delta$ C mutants are deletions that end at the aa indicated in Figure 4C. The T-box expression construct encodes for a protein containing aa 47 to aa 224 of Tpit. Full-length SRC-1, SRC-2 and SRC-3 were described in (305). The various SRC-2 (TIF2) mutants were described in (34).

#### 4.4.2 Cell culture and transfections

CV-1 cells were grown in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. GH3 and AtT20 D16v cells were grown in the same conditions, except when indicated otherwise in the legends to Figures. CV-1 cells were transfected using the calcium phosphate co-precipitation method, whereas GH3 and AtT-20 cells were transfected by lipofection using LipofectAMINE (Gibco BRL), as previously described (380). Where indicated, hormone treatment was performed 4 hours prior to harvesting and luciferase assay. Results are presented as the means of 3 to 10 experiments performed in duplicate. CMV- $\beta$ Gal was used as an internal control for transfection efficiency.

#### 4.4.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

The electrophoretic mobility shift assays were performed as described (305). Binding reactions were performed in 20  $\mu$ l containing gel shift binding buffer (305), 500 ng poly dI-dC and 5  $\mu$ g of nuclear extracts. We used 50 000 cpm per reaction (~20 fmol) of double-stranded probe (5'-GATCCAATTTACACCTAGGTGTGAAATTG-3') corresponding to the Brachyury palindrome. The samples were separated by electrophoresis using 5% polyacrylamide gels in 0.5X TBE at 25°C for 2.5 h.

#### 4.4.4 Preparation of nuclear extracts

Nuclear extracts for EMSA, DNA pull-down and co-immunoprecipitation assay were performed essentially as described (305). When indicated, AtT-20 cells were treated with  $10^{-7}$  M CRH (Sigma),  $10^{-5}$  M forskolin (Sigma) or 50  $\mu$ M PD 98059 (Calbiochem) prior to harvesting.

#### 4.4.5 Western Blotting

Western blotting of 25  $\mu$ g of nuclear extract were performed using anti-p42/44 MAPK or anti-phospho-p42/44 MAPK antibody (Cell Signalling) (Fig. 3A), anti-Myc A-14 (Santa-Cruz) (Fig. 4E) and anti-rabbit (or mouse) IgG-horseradish peroxidase conjugate (Sigma). Revelation was performed by chemiluminescence as described by the manufacturer (ECL+plus; Amersham Pharmacia).

#### 4.4.6 Pull-down assays

All MBP fusion proteins were produced, and [ $^{35}$ S]-labeled proteins were synthesized *in vitro* as described (30). Binding reactions were performed as described in (391). Bound proteins were resolved on SDS-PAGE, stained with Coomassie blue to ensure that similar amounts of fusion proteins were recovered and then autoradiographed.

#### 4.4.7 Co-immunoprecipitation assays

293 cells (10-cm plates) were transfected with 24  $\mu$ g total DNA, and nuclear extracts prepared 48 hours later. We used 250  $\mu$ g of nuclear extract in 100  $\mu$ l of buffer B (305) by assay. Total volume was brought to 1 ml by adding 167  $\mu$ l of Binding buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) and 733  $\mu$ l of Binding buffer/150 mM NaCl. Co-IP assays were performed using anti-FLAG affinity gel with the monoclonal antibody covalently attached to agarose beads (Sigma A2220). 40  $\mu$ l of affinity gel (washed twice with 0.5 ml TBS) was added and immunoprecipitation was performed at 4°C for 4hr on a roller shaker. Immunoprecipitates were washed thrice in 1

ml TBS for 5 min and eluted in Laemlli buffer without DTT. Samples were then subjected to SDS-page electrophoresis and Western blot analysis.

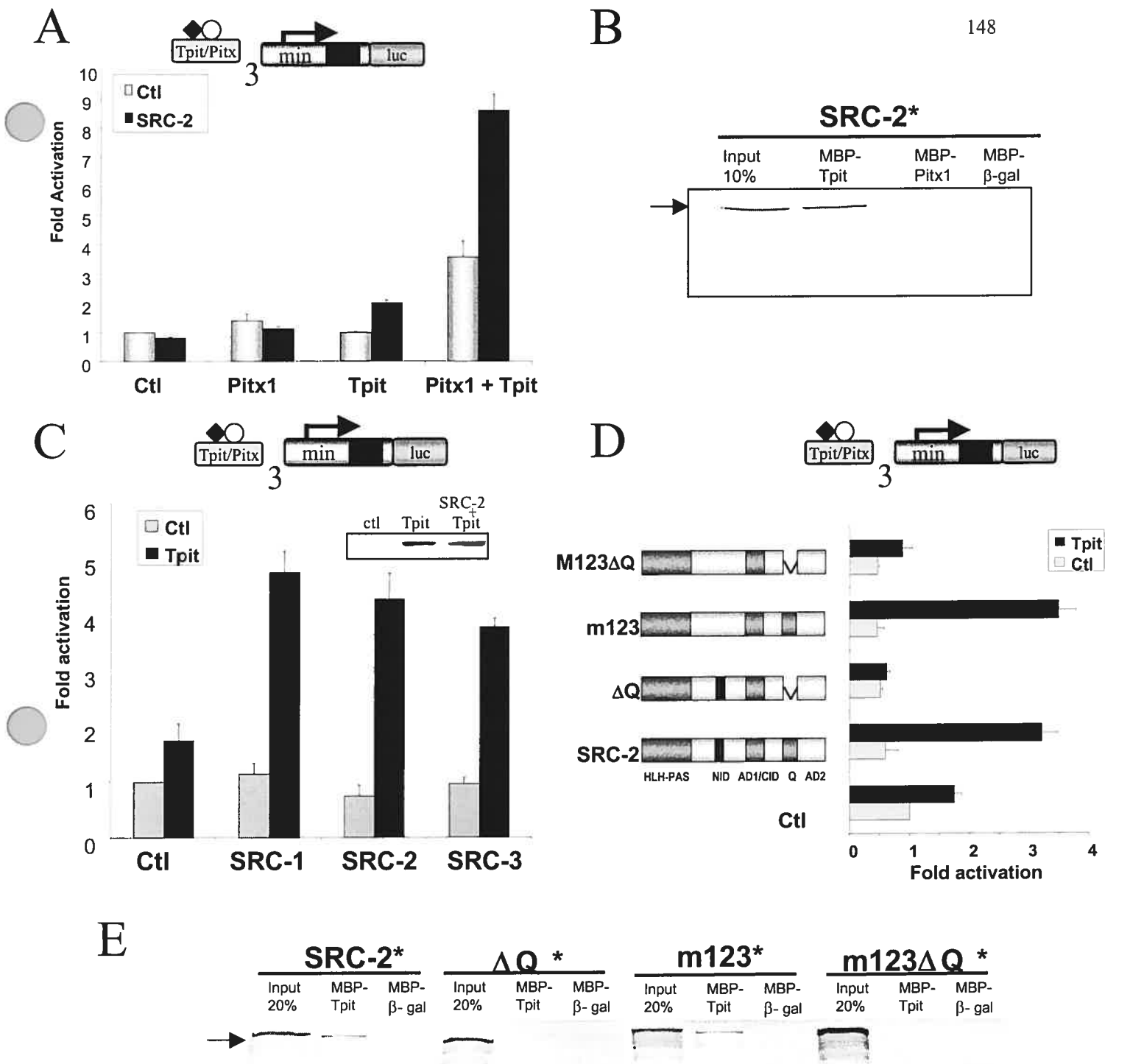
## 4.5 RESULTS

### 4.5.1 SRCs as coactivators of Tpit

The T-box transcription factor Tpit was cloned as a cell-specific activator of the pituitary POMC gene in cooperation with the homeoprotein Pitx1 (258). In order to assess transcriptional partners of Tpit, we tested for recruitment of transcriptional coactivators previously implicated in POMC transcription, the SRC/p160 family (29,305). To investigate the ability of SRCs to modulate Tpit transcriptional activity, we performed transient co-transfections in CV-1 cells. As reported previously (258), transfection of either Tpit or Pitx1 alone had little effect on a luciferase reporter plasmid driven by a Tpit/Pitx target sequence, but together they exhibited transcriptional synergism (Fig. 1A). Co-transfection of an SRC-2 expression plasmid did not enhance Pitx1-dependent transcription, but in contrast enhanced both the transcriptional activity of Tpit alone as well as the synergistic activities of Tpit and Pitx1.

These results suggested that SRC-2 specifically enhances activity through interaction with Tpit. In order to test the respective ability of Tpit and Pitx1 to physically recruit SRC-2, we performed *in vitro* pull-down assays using MBP fusion proteins for either Tpit, Pitx1 or  $\beta$ -gal chimeras and [<sup>35</sup>S]-labeled SRC-2 proteins. Only MBP-Tpit effectively retained SRC-2 protein (Fig. 1B), which correlates with the transcriptional specificity observed with Tpit and Pitx1 (Fig. 1A). We also tested the ability of the other members of the p160 family to enhance Tpit-dependent activity. All three SRCs similarly enhanced Tpit transcriptional activity on a Tpit/Pitx target sequence (Fig. 1C).

In order to define the domains of SRC-2 required for Tpit coactivation, we used a series of SRC-2 mutants known to disrupt different interactions with NRs. These included the SRC-2m123 mutant that contains mutations in all three LxxLL motifs essential for stimulation of NR AF-2-dependent activity, a deletion mutant lacking the glutamine-rich (Q) domain necessary for coactivation of the NR AF-1-dependent activity, as well as a double mutant SRC-2m123 $\Delta$ Q. In co-transfection experiments, the SRC-2m123 mutant was as efficient as wild-type SRC-2, while the mutant SRC-2 $\Delta$ Q abrogated SRC-2-mediated coactivation of Tpit transcriptional activity (Fig. 1D), as did the double mutant SRC-2m123 $\Delta$ Q. In order to determine if this was a consequence of impaired interaction



**Figure 4.1 SRC coactivators are recruited by Tpit to enhance its transcriptional activity.** (A) SRC-2 enhances Tpit transcriptional activity. The effect of the coactivator SRC-2 (500 ng) on Tpit (100 ng)-, Pitx1 (250 ng)- and Tpit+Pitx1-dependent transcription was assessed by co-transfection in CV-1 cells of a luciferase reporter driven by three copies of the Tpit/Pitx-RE. Results are shown relative to basal activity of the reporter (means  $\pm$  S.E.M. of 3-5 experiments performed in duplicates). (B) SRC-2 interacts with Tpit but not with Pitx1. The ability of SRC-2 to interact with Tpit or Pitx1 was examined in a pull-down assay using MBP-Tpit, MBP-Pitx1 and MBP- $\beta$ -Gal fusion proteins and radiolabeled *in vitro*-translated SRC-2. The position of SRC-2 (160 kD) is indicated by an arrow. (C) All three SRCs are Tpit coactivators. The ability of SRC family members (500 ng) to enhance Tpit (100 ng)-dependent activity was assessed by co-transfection in CV-1 cells using the Tpit/Pitx-RE-luc reporter. (D) The Q-rich domain of SRC-2 is required for Tpit coactivation. The capacity of SRC-2 and its mutants to enhance Tpit-dependent activity was assessed by co-transfection as above. (E) The Q-rich domain of SRC-2 is required for interaction with Tpit. The ability of SRC-2 and its various mutants to interact with Tpit was investigated by pull-down assay. Radiolabeled *in vitro*-translated SRC-2 or mutants were tested for interaction with a MBP-Tpit fusion protein or with MBP- $\beta$ -Gal as a negative control. The arrow indicates the position of full-length SRC-2 (160 kD).

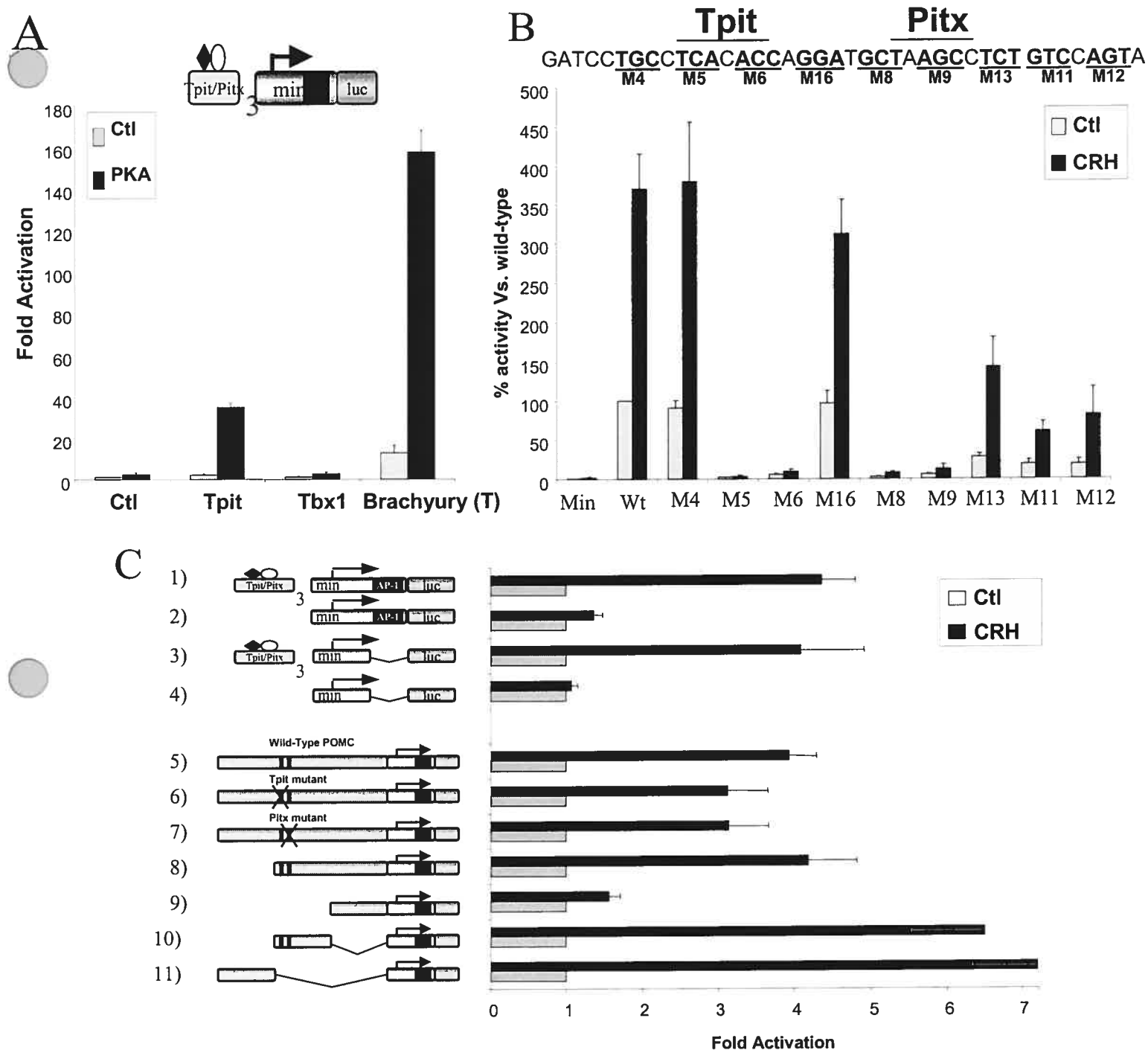
with Tpit, we performed pull-down assays using wild-type and mutant *in vitro* translated SRC-2. The MBP-Tpit column bound only wild-type and SRC-2m123 mutant whereas mutants SRC-2 $\Delta$ Q and SRC-2m123 $\Delta$ Q were not retained (Fig. 1E). Taken together, these results identify SRC-2 as a coactivator of Tpit and clearly implicate the glutamine-rich domain of SRC-2 in Tpit interaction and coactivation.

#### 4.5.2 Tpit as a target for signalling pathways

We have recently demonstrated that SRC-2 is recruited to the POMC promoter in response to cAMP/PKA signalling elicited by CRH, a pathway that targets the nuclear receptor NGFI-B in corticotroph cells (29,305). Given our observation that SRC-2 is also a coactivator of Tpit, we tested whether Tpit would also be a target for PKA signalling pathway. In order to test if PKA would modulate Tpit transcriptional activity, a Tpit/Pitx-reporter plasmid was cotransfected in CV-1 cells with expression plasmids for Tpit and/or the catalytic subunit of PKA. While the transcriptional response to Tpit is modest, coexpression of PKA greatly enhanced Tpit activity (Fig. 2A). PKA also enhanced the transcriptional activity of Brachyury (T), but not of Tbx1, another T-box transcription factor present in POMC-expressing AtT-20 cells (258).

We next tested if the Tpit/Pitx-RE conferred responsiveness to activation by the CRH/cAMP/PKA pathway in AtT-20 cells. CRH treatment of AtT-20 cells resulted in activation of the transfected Tpit/Pitx-RE driven reporter plasmid, while CRH treatment had no effect on the minimal POMC promoter (Fig. 2B and 2C). To confirm that the Tpit and/or Pitx binding site were necessary, we scanned the entire Tpit/Pitx element with a set of 3 bp mutants and assessed them for CRH responsiveness. As expected, mutants M5 and M6, which destroy the Tpit half-site, were minimally active and were not enhanced upon CRH treatment (Fig. 2B). Interestingly, mutants M8 and M9, which destroy the Pitx binding site, were also non-responsive to CRH, confirming the interdependence of Tpit and Pitx activity in POMC-expressing cells (258).

In order to confirm that an AP-1 site present in the minimal POMC promoter, which had been implicated in CRH responsiveness (60), is not implicated in Tpit/Pitx-dependent CRH response, we used a reporter lacking this sequence and this construct responded equally well to CRH treatment (Fig. 2C, construct 3). It is noteworthy that the



**Figure 4.2 Tpit is a target for signalling pathways.** (A) PKA enhances the activity of Tpit and Brachyury. The effect of PKA on Tpit-, Tbx1- and Brachyury-dependent transcription was assessed in CV-1 cells by co-transfecting their expression vectors (150 ng) with a plasmid coding for the constitutively active catalytic subunit of PKA (125 ng) and the Tpit/Pitx-RE-luc reporter. Results are shown relative to basal activity of the reporter. (B) The Tpit and Pitx sites are required for CRH responsiveness of the Tpit/Pitx-RE. Wild-type and mutant Tpit/Pitx-RE reporters were used to examine the effect of each target site on CRH ( $10^{-7}$  M) responsiveness. AtT-20 cells were transfected by lipofection and stimulated for 4 hours prior to harvesting. The basal activity of the wild-type Tpit/Pitx-RE was set to 100%. (C) CRH responsiveness is not dependent on a single binding site. The requirement for the AP-1 site in the Tpit/Pitx-RE reporter, as well as the Tpit and Pitx site within the POMC promoter was assessed by lipofection of various reporter constructs in AtT-20 cells. Cells were stimulated with  $10^{-7}$  M CRH for 4 hours prior to harvesting.

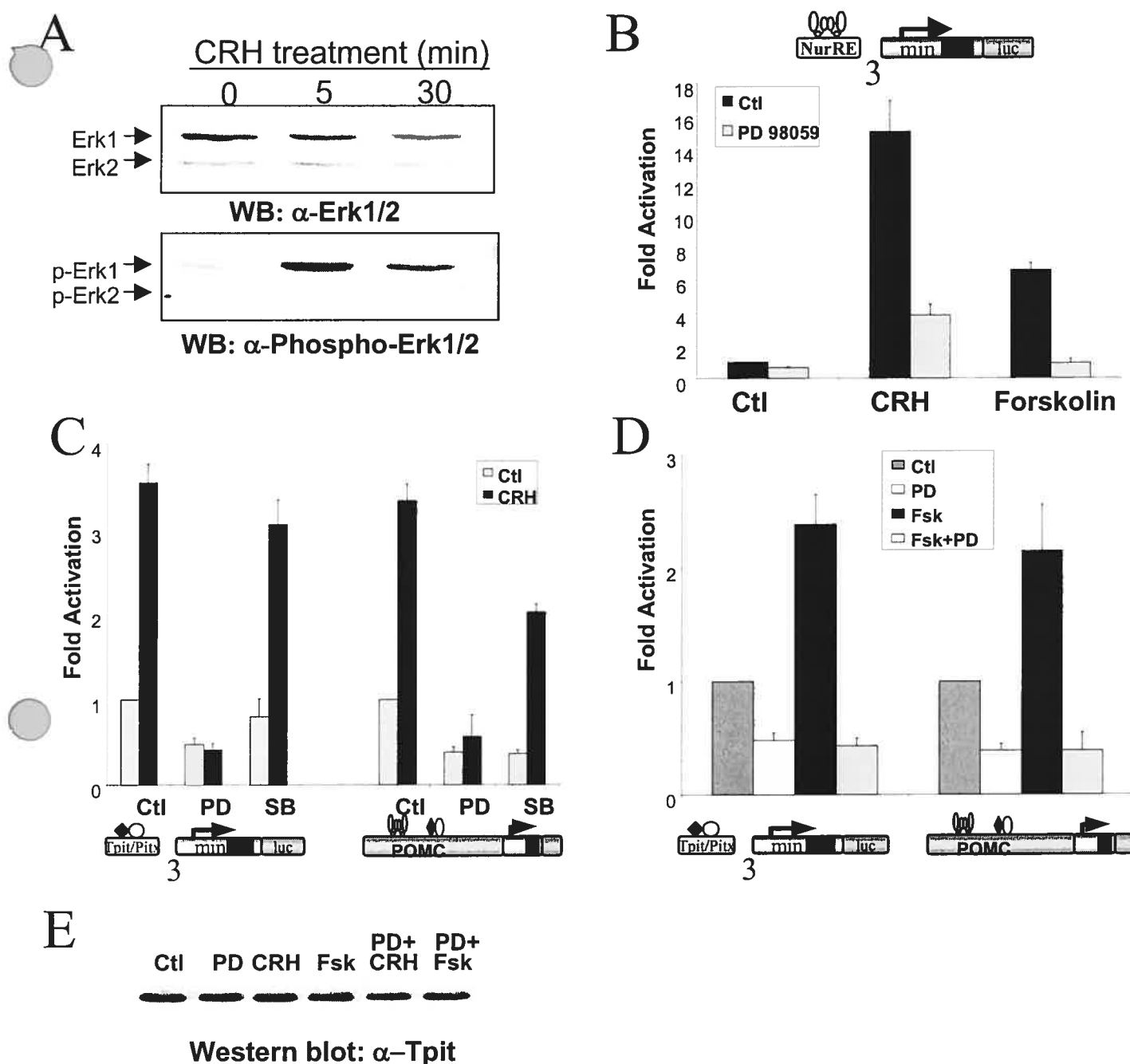
AP-1 site in the minimal promoter confers a slight but reproducible CRH response (compare construct 2 and 4). Finally, to determine if the Tpit/Pitx target sequence is essential for CRH responsiveness of the POMC promoter, we used reporter plasmids containing mutations in either Tpit (construct 6) or Pitx (construct 7) cognate sequence in the context of the intact promoter. Both mutant reporters were responsive to CRH (Fig. 2C), indicating that the Tpit/Pitx target sequence, while able to confer CRH responsiveness, is not essential for hormonal response within the context of the full promoter. Other promoter sequences, such as the NurRE (see below), may also contribute to CRH responsiveness in this context. In agreement with a role for the Tpit/Pitx element in CRH responsiveness of the intact POMC promoter (construct 5), we showed that deletion of distal sequences containing the NurRE (construct 8) do not prevent responsiveness but that further deletion of the region containing the Tpit/Pitx element (construct 9) abrogates responsiveness. Complementary reporter constructs containing the distal NurRE (construct 11) or the central Tpit/Pitx element (construct 10) were both sufficient for CRH responsiveness.

#### **4.5.3 Tpit as a downstream effector of a PKA and MAPK pathways**

We next set out to understand the signalling pathway downstream of PKA that leads to activation of POMC transcription. In a variety of endocrine systems, activation of cAMP signalling linked to G-protein-coupled receptors results in rapid activation of the MAPK pathway. In order to determine if it was the case in response to CRH stimulation, we harvested control and CRH-treated AtT-20 cells either 5 or 30 minutes after stimulation and subjected nuclear extracts to western blot analysis. Activation of MAPK signalling was assessed using a phospho-specific antibody directed against the activated (phosphorylated) form of Erk1/2, which revealed a strong and transient activation of Erk1/2 within 5 minutes of CRH treatment (Fig. 3A, bottom panel). Total amounts of Erk1/2 remained however constant within this period (Fig. 3A, upper panel). Similar experiments using anti-phospho-p38 failed to reveal activation of p38, another downstream MAPK (data not shown).

While preparing this manuscript, it was reported that NGFI-B is a target of MAPK signalling following CRH stimulation (240). Indeed, we also observed that





**Figure 4.3 CRH responsiveness by Tpit requires MAPK signalling.** (A) CRH induces MAPK signalling. AtT-20 cells were cultured in low serum (1%) for 12 hours and then treated with  $10^{-7}$  M CRH for the indicated times prior to harvesting and subjected to SDS-PAGE electrophoresis. Activation of the MAPK pathway was detected by Western blot using antibodies directed against either total (upper panel) or active (phosphorylated) forms of Erk1/2 (p-Erk1/2, bottom panel). (B), (C) and (D) CRH responsiveness requires the MAPK pathway. As reported previously (242), CRH- and forskolin-induced NurRE-dependent transcription requires MAPK signalling (B). The dependence on MAPK signalling for CRH (C) or forskolin (D) stimulation of POMC- and Tpit/Pitx-RE-dependent transcription was examined using the specific MEK1 inhibitor PD 98059 (PD) ( $50 \mu\text{M}$ ) or the specific p38 inhibitor SB 203580 (SB) ( $20 \mu\text{M}$ ) on AtT-20 cells transfected with the corresponding reporter plasmid. Cells were cultured in 1% serum for 12 hr and then pre-treated with the MAPK inhibitors for 1hr prior to a 4 hr stimulation with CRH ( $10^{-7}$  M). Results are shown relative to the basal activity of each reporter. (E) Western blot analysis of Tpit protein levels in AtT-20 cells treated as described above.

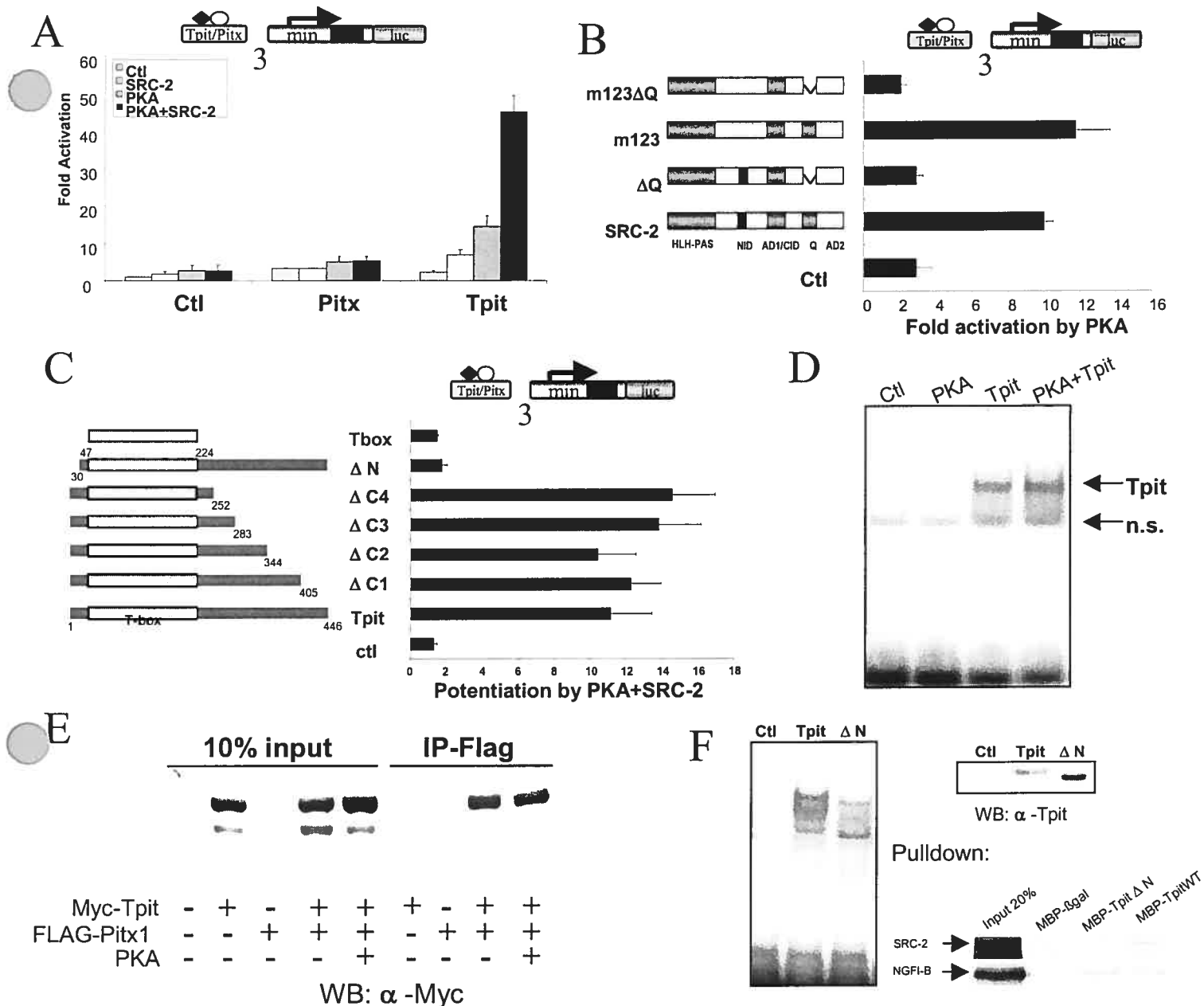
pre-treatment of AtT-20 cells with the MEK1 inhibitor PD 98059 abrogated most of the response of the NurRE reporter to both CRH and forskolin treatment (Fig 3B). We then tested whether a Tpit/Pitx reporter would be similarly affected. Indeed, PD 98059 not only greatly diminished basal reporter activity but also completely blunted transcriptional enhancement in response to CRH treatment on both the Tpit/Pitx and POMC reporter plasmids (Fig 3C). Similar results were obtained using UO126, another MEK1 inhibitor (data not shown). In contrast, the p38 inhibitor SB 203580 had no effect on the Tpit/Pitx reporter and only a minimal one on the POMC promoter (Fig. 3C). In order to ensure that MAPK activation was a direct consequence of cAMP signalling, we performed similar experiments using the adenylate cyclase activator forskolin, which also induced a transcriptional response from Tpit/Pitx and POMC reporters and PD 98059 also blocked this activation (Fig. 3D). Throughout these experiments, the levels of Tpit protein remained constant as revealed by western blotting (Fig. 3E).

Altogether, these results show that Tpit can be a mediator of CRH signalling and a downstream effector of PKA/MAPK signalling pathways in corticotrophs.

#### **4.5.4 Requirements for PKA enhancement of Tpit activity**

Since SRC-2 was implicated in the CRH/PKA-dependent activation of NGFI-B (305), we tested whether it also favored PKA enhancement of Tpit activity. Indeed, co-transfection in CV-1 cells of limiting amounts of SRC-2 and PKA synergistically enhanced Tpit activity on a Tpit/Pitx reporter (Fig. 4A), suggesting that they are part of the same signalling cascade. In contrast, Pitx1 activity was only minimally enhanced by PKA and SRC-2 (Fig. 4A). Furthermore, this synergistic enhancement of Tpit activity by PKA/SRC-2 was not observed with the SRC-2 $\Delta$ Q and SRC-2m123 $\Delta$ Q mutants (Fig. 4B), presumably because of their impaired ability to interact with Tpit (Fig. 1E).

We next used a series of Tpit truncation mutants in transfection experiments to determine domains required for PKA+SRC-2 potentiation of Tpit transcriptional activity. Progressive deletion of the Tpit C-terminus up to amino acid 252 did not affect PKA+SRC-2-dependent transcriptional potentiation (Fig. 4C). However, truncation of the first 30 aa abrogated potentiation by PKA+SRC-2, suggesting a crucial role for the N-terminus of Tpit in PKA/SRC-2 responsiveness. All of these mutants retained their ability



**Figure 4.4** Mechanisms of PKA/SRC-2 enhancement of Tpit activity. **(A)** PKA potentiates SRC-2 enhancement of Tpit but not Pitx1 activity. CV-1 cells were transfected with expression plasmids for PKA (100 ng) and SRC-2 (250 ng), either alone or in combination, to assess their effect on Pitx- and Tpit-dependent transcription. Results are presented relative to the basal activity of the Tpit/Pitx-RE reporter. **(B)** Synergy between SRC-2 and PKA requires the Q-rich domain of SRC-2. Expression plasmids for Tpit (100 ng) and PKA (100 ng) were transfected in CV-1 cells either in absence (ctl) or presence of one of the SRC-2 constructs (wild-type or mutant) (250 ng), using the Tpit/Pitx-RE-luc as a reporter. Results are shown as the relative effect of PKA on the activity of Tpit. **(C)** The Tpit N-terminus is required for PKA/SRC-2 enhancement of transcriptional activity. Wild-type Tpit and a series of deletion mutants were transfected in CV-1 cells along with PKA (100 ng) and SRC-2 (250 ng), using the Tpit/Pitx-RE-luc as a reporter. All the Tpit mutants are able to bind DNA and the amount of plasmid transfected was adjusted so that equivalent levels of protein were expressed (data not shown). Results are presented as the relative effect of PKA+SRC-2 **(D)** PKA doesn't affect Tpit DNA-binding ability. 293 cells were transfected with PKA and Tpit expression vectors either alone or in combination. Cells were harvested 48 hr later and nuclear extracts submitted to EMSA analysis using a T-box palindromic probe. **(E)** PKA does not enhance Tpit-Pitx1 interaction. 293 cells were transfected with Myc-Tpit, FLAG-Pitx1 or both, in the absence or presence of A expression vectors as indicated. Nuclear extracts were incubated with an anti-FLAG M2 antibody covalently linked to agarose beads (Sigma). Immunoprecipitated complexes were subjected to SDS-PAGE and presence of Myc-Tpit was revealed using a polyclonal anti-Myc antibody (Santa-Cruz A-14). **(F)** The Tpit N-terminus interacts with SRC-2. The Tpit  $\Delta$ N mutant is expressed as efficiently as Tpit (WT) and binds the Tpit/Pitx-RE equally well as shown by Western blot using Tpit antibody and gel mobility shift, respectively. Pull-down experiments using either GST-Tpit or GST-Tpit  $\Delta$ N reveal similar interaction with NGFI-B, but loss of interactions with in vitro translated SRC-2 for the N mutant. GST-LacZ was used as negative control and Input lanes represent 20% of the sample used.

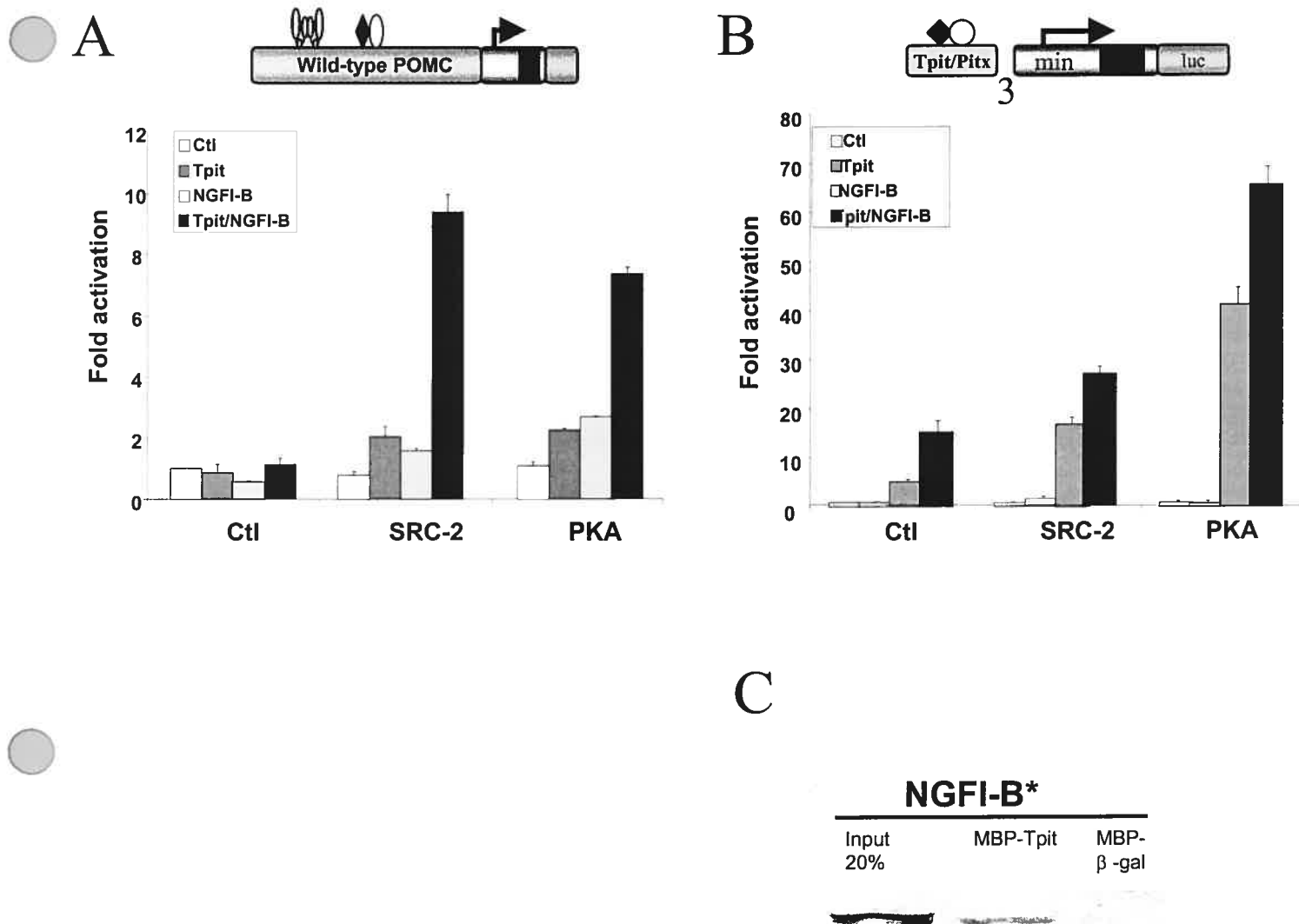
to bind DNA (data not shown). In order to gain further insight into the molecular mechanisms regulating PKA enhancement of Tpit transcriptional activity, we performed electrophoretic mobility shift assays. Coexpression of PKA did not increase the intrinsic affinity of Tpit for DNA (Fig. 4D). We also performed co-immunoprecipitation experiments using epitope-tagged Tpit and Pitx1 and PKA did not enhance Tpit-Pitx interaction in 293 cells (Fig. 4E). The Tpit  $\Delta$ N mutant was expressed as efficiently as wild-type Tpit (Fig. 4F, WB), and its DNA binding ability was also similar to Tpit (Fig. 4F, EMSA). In agreement with the Tpit deletion analysis (Fig. 4C), pull-down confirmed an *in vitro* interaction between SRC-2 and the Tpit N-terminus that is lost in the Tpit  $\Delta$ N mutant (Fig. 4F). Thus, these results indicate that the Tpit N-terminus is a site of SRC-2 recruitment, and that this activity is increased by PKA.

Altogether, these results suggest that PKA enhancement of Tpit transcriptional activity is primarily a result of increased coactivator recruitment to the Tpit/Pitx-RE by Tpit in response to intracellular signalling.

#### **4.5.5 Tpit and NGFI-B synergism in presence of PKA and SRC-2**

These studies have revealed mechanistic similarities between the T-box factor Tpit and the nuclear receptor NGFI-B. Indeed, both are transcriptional activators of the POMC gene, both are targeted by the CRH/PKA/MAPK pathway, and both recruit SRC/p160 coactivators. Given these similarities and the proximity of both sites on the POMC promoter, we investigated the possibility of transcriptional cooperativity between these two factors. Tpit, NGFI-B or a combination of both were co-expressed with an intact POMC promoter-driven reporter in GH3 cells (that contain endogenous Pitx1 but not Tpit). While there was no activation by factors alone, addition of either PKA or SRC-2 resulted in strong transcriptional synergy (Fig. 5A). Tpit and NGFI-B behaved slightly differently on a Tpit/Pitx reporter. Indeed, co-transfection of both resulted in strong transcriptional synergy independently of added SRC-2 or PKA (Fig. 5B). Since NGFI-B does not bind the Tpit/Pitx target sequence (data not shown), these results suggest direct interaction between Tpit and NGFI-B. *In vitro* pull-down assays using MBP-Tpit fusion proteins and radiolabeled NGFI-B confirmed that both factors could physically interact (Fig. 5C).

Taken together, these results show that Tpit and NGFI-B are end-point effectors of PKA and SRC-2 signalling, resulting in transcriptional cooperativity on the POMC promoter.



### Figure 4.5 Tpit and NGFI-B synergism in the presence of PKA and SRC-2.

GH3 cells (containing endogenous Pitx factors) were transfected with Tpit (50 ng) and NGFI-B (50 ng), either alone or in combination, in the absence or presence of SRC-2 (250 ng) or PKA (100 ng) expression vectors as indicated. **(A)** Using the POMC promoter reporter, synergism between Tpit and NGFI-B is only observed in presence of PKA or SRC-2, whereas **(B)** it is independent of these signals using the Tpit/Pitx reporter. **(C)** Tpit and NGFI-B physically interact. The protein:protein interaction between Tpit and NGFI-B was assessed by pull-down assay. Radiolabeled *in vitro*-translated NGFI-B was tested for interaction with a MBP-Tpit fusion protein or with MBP-β-Gal as a negative control. The arrow indicates the position of full-length NGFI-B (65 kD).

## 4.6 DISCUSSION

Despite their essential roles as developmental regulators, still little is known about the underlying transcriptional mechanisms of T-box factors. *Tpit* is one of the relatively few T-box factor for which target genes, such as *POMC* and  $\alpha$ -*GSU*, have been identified and for which a role as either activator or repressor of transcription has been characterized (258,391). The current paradigm dictates that transcription factors recruit cofactors to target genes, which in turn either recruit chromatin remodelers or stabilize the basic transcriptional machinery to exert their transcriptional functions. Whereas a plethora of such cofactors are known to modulate NR activity, currently only one case of cofactor recruitment by a T-box factor has been reported, the recruitment by *Tbr-1* of the cytoskeleton-associated guanylate kinase *CASK/LIN-2* (195).

The aim of this study was to further our understanding of the molecular mechanisms governing *Tpit* functions. We now report that *Tpit* is able to recruit SRC/p160 coactivators to modulate its transcriptional activity. Indeed, SRC-2 enhances the intrinsic activity of *Tpit* on its cognate *POMC* target as well as the synergistic activity with *Pitx1*, apparently by a mechanism where SRC-2 interacts only with *Tpit* (Fig. 1). Although the activity of *Tpit* on the *Tpit/Pitx*-RE requires a functional binding site for *Pitx* factors (ref. (258) and Fig. 2), coactivation by SRC-2 does not, since *Tpit*-dependent activity on a palindromic T element is also enhanced by SRC-2 (data not shown). This suggests that *Tpit* activity on promoters other than *POMC* might not require the presence of *Pitx* factors, but possibly of other transcriptional partners.

Future investigations will address the physiological significance of coactivator recruitment by T-box transcription factors, as this could be important in a number of developmental events. For example, recruitment of SRC-2 by myogenin and MEF2c is essential for proper skeletal muscle differentiation (85). The finding that SRC-2 is recruited by a T-box might also shed a new light on functional cross-talk between this subfamily and other transcription factors using common coregulators. The antagonistic relationship between *Tpit* and SF-1 is of particular interest in the pituitary. SF-1 is a developmental regulator and a transcriptional modulator of cAMP-induced genes (366). In addition, MAPK-induced phosphorylation of SF-1 modulates its ability to recruit SRC-2 (174). Thus, the transcriptional antagonism observed between *Tpit* and SF-1 may

involve competition for mutual coactivators. Another intriguing possibility is that SRC-2 might function as a corepressor (rather than as a coactivator) of Tpit or SF-1 in the context of trans-repression. Indeed, such a role was recently shown in the case of trans-repression between the glucocorticoid receptor GR and AP-1 (409).

Our results indicate that the cAMP/PKA pathway regulates Tpit-dependent transcription. To our knowledge, this is the first example of regulation of a T-box transcription factor by a major signalling pathway. Indeed, stimulation of PKA signalling strongly potentiates the transcriptional activity not only of Tpit, but also of Brachyury. Regulation of transcription factor activity by phosphorylation is a common occurrence, as it provides a means to rapidly fine-tune the transcriptional response of a target cell to environmental signals. PKA has been shown to modulate the activity of transcription factors at many levels, such as subcellular localization, DNA binding, interaction with other transcription factors and cofactor recruitment. In the case of Tpit, the potentiation effect of PKA does not appear to be mediated by an increased interaction with its known partner Pitx1 or by a change in affinity for DNA (Fig. 4). Moreover, the amount of Tpit protein is not affected by activation of cAMP signalling in AtT-20 cells (Fig. 3E) nor in overexpression experiments (Fig. 4E). Regulation of the subcellular distribution of Tpit is unlikely given that it is present in nuclear extracts (Fig. 3 and 4) and that it is constitutively nuclear (258). Instead, PKA potentiation appears to be mediated through coactivator recruitment. Indeed, coexpression of SRC-2 synergistically enhanced the effects of PKA on Tpit activity and this effect was not observed with an SRC-2 mutant unable to interact with Tpit (Fig. 4). Phosphorylation-dependent recruitment of SRC-2 appears to be a widespread mechanism, as we and others have demonstrated that interaction of SRC-2 with both NGFI-B (305) and SF-1 (174) is modulated by the cAMP/PKA/MAPK while recruitment of SRC-2 by MEF2c is regulated by the cyclin D-cdk complex (266). Further experimentation will be needed to determine which of Tpit or SRC-2 (or both) is the direct target of phosphorylation events. Tpit has a consensus MAPK site in the T-box. Both SRC-1 and SRC-3 have been shown to be directly phosphorylated by MAPK and these modifications regulate transcriptional activity (116,412). Alternatively, phosphorylation of SRC-2 might be controlling its cellular compartmentalization; such a regulation by MAPKs has been demonstrated for the



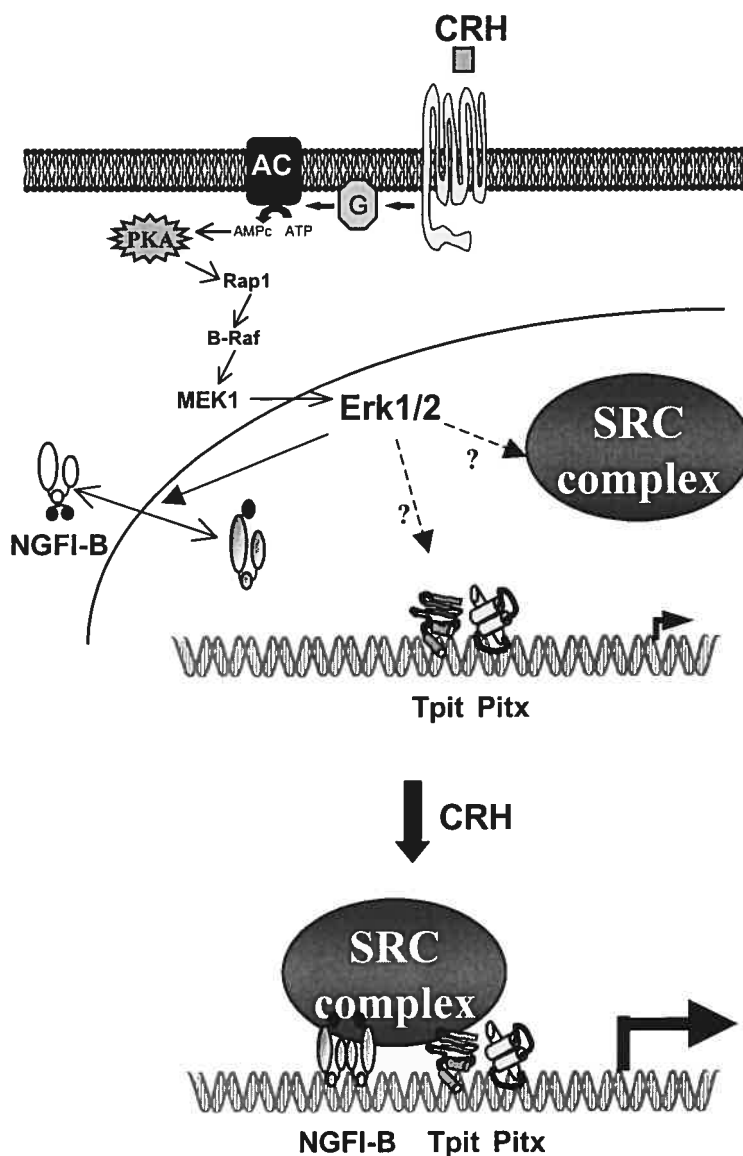
corepressor SMRT (189). Moreover, both SRC-2 (86) and SRC-3 (394) have been shown to be present in the cytoplasm in different systems.

We also show that *Tpit* is a mediator of CRH response at the POMC promoter. Indeed, we report that the *Tpit/Pitx*-RE is responsive to CRH and mutation in either the *Tpit* or the *Pitx* target sites abolished responsiveness (Fig. 2). The requirement for the *Pitx* site, even though *Pitx* is only marginally responsive to PKA and does not recruit SRC-2, is in accordance with our previous observation that the activity of *Tpit* on the *Tpit/Pitx*-RE is totally dependent on the presence of a functional *Pitx* site (258). Signals elicited by CRH appear to involve MAPKs since pharmacological blockade of MAPK activity prevents CRH responsiveness of POMC and *Tpit/Pitx*-RE. The rapid and transient activation of MAPK signalling (fig. 3A) correlates well with the rapid induction of POMC transcription, which is maximal within 15 min of CRH treatment (148). At first sight, the role of *Tpit* as a modulator of hormonal response may seem at odds with the traditional role ascribed to T-box factors as developmental regulators. However, this may explain why *Tpit* expression is maintained throughout adulthood. Indeed, we suggest that *Tpit* plays a dual role in the pituitary; first it functions as a factor essential for late differentiation of POMC-expressing corticotrophs and melanotrophs, and later it is recruited to participate in hormonal response of the POMC promoter. A precedent exists for pituitary *Pit-1*, a POU-homeodomain factor essential for development of the somatotrophs, lactotrophs and thyrotrophs lineages. Indeed, *Pit-1* participates in hormonal response in each of these lineages as it modulates PKA-dependent induction of GH, PRL and TSH- $\beta$  genes (538).

This study also revealed functional similarities between *Tpit* and NGFI-B as well as transcriptional cooperativity on the POMC promoter. Indeed, *Tpit* and NGFI-B physically interact and synergistically activate POMC transcription (Fig. 5). Thus we propose in Figure 6 a general model for CRH activation of POMC transcription integrating our findings for *Tpit* (this study) and NGFI-B (239,305,306). In basal conditions, *Tpit/Pitx* are present at the promoter while NGFI-B is both in the cytoplasm and in the nucleus, but in minimal amount at the NurRE (305). CRH binding to its receptor initiates cAMP signalling, resulting in activation of PKA. Presumably due to the presence of Rap1, PKA signalling leads to activation of MAPKs and intracellular calcium

entry (ref. (243) and Fig. 3). This results in dephosphorylation of NGFI-B DBD, thus allowing DNA binding (305). CRH-elicited signals enhance the ability of both Tpit and NGFI-B to recruit SRC-2, thus resulting in the assembly of an active transcriptional complex at the promoter. Further experimentation will be required to assess the existence of a tripartite complex in response to CRH, as suggested by the fact that Tpit and NGFI-B directly interact (Fig. 5) and that they bind the same region of SRC-2 (the Q-rich domain) [Fig. 1 and (305)]. Alternatively, they could be binding dimers of SRC-2 (or SRC heterodimers), given that SRCs possess a HLH-PAS domain, a known dimerization interface and that SRC hetero- and homomultimeric complexes have been documented (317).

In summary, we have shown a novel mechanism for transcriptional activation by T-box factors such as Tpit, where intracellular signalling modulates SRC coactivator recruitment. In corticotroph cells, Tpit is a mediator of hormonal signalling and its action may occur in parallel with the proposed mechanism for Nur-mediated CRH response. Given that the distal elements of the POMC promoter and their cognate transcription factors act in a highly synergistic manner (464), we postulate that CRH-elicited signalling leads to the assembly of a transcriptional regulatory complex that includes DNA-binding transcription factors such as NGFI-B and Tpit. This complex would also contain common transcriptional cofactors such as the SRCs, and the multiple coactivator interactions are consistent with their recruitment by different DNA-bound factors.



**Figure 4.6 Working model for action of CRH and PKA/MAPK pathway on POMC promoter.** In basal conditions, Tpit appears to be nuclear and present at the Tpit/Pitx-RE, contributing together with Pitx1 to basal POMC transcription. NGFI-B is found both in the cytoplasm and nucleus, but very little is present at the NurRE. Upon CRH stimulation, accumulation of cAMP induces PKA activation, which activates Erk1/2 in corticotroph cells. This leads to NGFI-B DBD dephosphorylation, thus allowing DNA binding of Nur dimers. Activation of PKA and MAPK signalling also enhances recruitment of SRC-2 to Tpit and NGFI-B cognate targets, presumably in part because of phosphorylation of the NGFI-B N-terminal AF-1 domain.

#### **4.7 ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Dr Pierre Chambon who generously provided the expression plasmids for SRC-2 (TIF-2) and mutant constructs as did Dr S. McKnight for PKAc. We thank Aurelio Balsalobre and colleagues of the laboratory for critical comments on the manuscript. We also thank Lise Laroche for her expert secretarial assistance. This work was funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and M. Maira is the recipient of a doctoral research award from CIHR.

## CHAPITRE 5: Discussion et Perspectives

Depuis la démonstration au milieu des années 1980s que la transcription du gène POMC est assujétie à un contrôle par l'axe HPA (147,148), de nombreuses études se sont penchées sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette régulation hormonale. Or malgré plus de quinze années d'étude, de nombreuses questions restent encore sans réponses concernant les mécanismes par lesquels le CRH stimule les corticotropes de l'hypophyse antérieure pour augmenter la transcription du gène POMC. Mon projet de doctorat consistait donc à caractériser les voies de signalisation, les régulateurs transcriptionnels ainsi que les éléments de réponse sur le promoteur impliqués dans la réponse du gène POMC. En particulier, j'ai étudié en détails les mécanismes transcriptionnels des NRs de la famille Nur ainsi que de Tpit, un facteur à boîte T récemment cloné dans notre laboratoire. De plus, j'ai pu mettre en évidence l'implication des coactivateurs de la famille SRC/p160, dont l'action rehausse les capacités transcriptionnelles de NGFI-B et de Tpit. Cette section fera une analyse critique des résultats présentés dans les chapitre 2, 3 et 4, tout en intégrant leurs implications dans la régulation transcriptionnelle du gène POMC et en discutant des perspectives ouvertes par ces résultats.

### 5.1 Sur la pertinence biologique des dimères de facteurs Nur

Les membres de la famille Nur se distinguent des autres NRs par leur versatilité au point de vue de la liaison à l'ADN. En effet, les facteurs Nur peuvent agir en monomères et en hétérodimères avec RXR, et nous avons démontré auparavant que des dimères de facteurs NGFI-B se lient au NurRE. Au cours de mes études, j'ai démontré pour la première fois que Nurr1 et NOR-1 (dans une moindre mesure) peuvent également lier le NurRE du promoteur POMC sous forme d'homodimères, et que les facteurs Nur peuvent former des hétérodimères qui sont des activateurs transcriptionnels plus puissants que les homodimères des mêmes facteurs (chapitre 2). Toutefois, il est important de noter que ces observations sont propres au NurRE<sub>POMC</sub> puisque les homodimères des trois membres de la famille activent de manière comparable le NurRE<sub>CON</sub>. Étant donné que les patrons d'expression se chevauchent largement et que la plupart des stimuli

physiologiques induisent plus d'un membre de la famille Nur, la formation d'hétérodimères entre membres de cette famille est donc possible sur des éléments de réponse du type NurRE dans de multiples tissus. Mes résultats suggèrent que ceci est notamment possible dans les corticotropes, puisque l'ARNm des trois membres est induit par le CRH (figure 2.1) et que les protéines Nurr1 et NGFI-B sont détectables dans les AtT-20 (figure 3.1). Toutefois, afin de soutenir un rôle pour les hétérodimères dans l'hypophyse, il sera important dans l'avenir de faire des expériences d'immunohistochimie afin de s'assurer que les trois facteurs sont bien présents dans les corticotropes. Ceci pourra être effectué dans des conditions où l'axe HPA est activé, par exemple en injectant du CRH ou par ablation pharmacologique de la synthèse des Gc.

Ces observations nous amènent à nous interroger sur la pertinence du mode d'action en homo- ou hétérodimères de facteurs Nur. À première vue, l'action en dimères peut présenter plusieurs avantages, le plus évident se situant au niveau d'une capacité accrue à activer la transcription. En effet, le NurRE s'est avéré une cible beaucoup plus sensible que le NBRE dans un contexte de surexpression des facteurs Nur (chapitres 2 et 3), et ceci reflète peut-être l'aptitude spécifique des homodimères à recruter certains coactivateurs. Ceci semble être le cas pour les membres de la famille SRC/p160 (chapitre 3), mais non pour ASC-2 (445).

Un autre avantage est celui de la possibilité de former des hétérodimères dont les propriétés transcriptionnelles sont différentes de celles des homodimères. En effet, l'hétérodimérisation entre protéines d'une même famille est un mécanisme récurrent, souvent utilisé pour moduler la liaison à l'ADN et le recrutement de facteurs dont l'affinité est moindre pour un certain élément (310). Ainsi, sur le promoteur de POMC, NGFI-B forme des hétérodimères avec Nurr1 et NOR-1, ce qui permet à Nurr1 et surtout NOR-1, qui ont moins d'affinité pour le NurRE<sub>POMC</sub>, d'être recrutés au promoteur pour ainsi pouvoir réguler la transcription plus finement, car chaque facteur peut attirer un ensemble différent de protéines et/ou cofacteurs spécifiques. Aussi, bien que les membres de la famille Nur partagent beaucoup de caractéristiques et semblent être fonctionnellement redondants dans certains systèmes, il existe des différences marquées au point de vue de leurs propriétés transcriptionnelles. Par exemple, l'activité de NGFI-B n'est pas rehaussée par le 6-MP, contrairement à celle des deux autres facteurs Nur

(359,499). De plus, NOR-1 n'hétérodimérise pas avec RXR, tandis qu'il est le seul à interagir avec l'homéoprotéine Six3 (355,540). Nurr1 quant à lui n'induit pas l'expression de CD25 ni l'apoptose des cellules T, contrairement à NGFI-B et NOR-1 (88). Ces différentes propriétés s'expliquent probablement en grande partie par la divergence de leurs domaines N-terminal/AF-1. L'hétérodimérisation permet aussi un mécanisme par lequel l'activité transcriptionnelle peut être modulée par le recrutement d'un membre pouvant agir en tant que dominant négatif. SHP est un exemple de NR atypique qui hétérodimérise avec plusieurs autres NRs pour en réprimer l'activité (155). Un tel mécanisme semble exister au sein de la famille Nur, car l'existence de formes tronquées de Nurr1 et de NOR-1 ont été rapportées et celles-ci répriment l'activité des autres membres de la famille Nur (353,354). Toutefois, les mécanismes d'action, de même que les fonctions biologiques de ces formes tronquées, restent à être définis.

L'ensemble de ces observations, de même que mes résultats présentés aux chapitres 2 et 3, suggèrent que la dimérisation soit un mécanisme avantageux pour les membres de la famille Nur car il offre plusieurs niveaux additionnels de régulation de l'activité transcriptionnelle possibles, ce qui peut s'avérer essentiel pour ces facteurs de transcription dont les fonctions sont aussi multiples que variées. Il reste toutefois beaucoup de travail à faire pour comprendre les mécanismes d'action et surtout la pertinence *in vivo* des dimères de facteurs Nur. La première chose à faire sera de bien définir quels sont les domaines impliqués dans l'homo- et l'hétérodimérisation. J'ai commencé ce travail et les résultats présentés dans les figures 3.6 et 3.7 indiquent que le DBD et surtout le domaine C-terminal semblent importants pour l'homodimérisation de NGFI-B et de Nurr1. Ceci pourra mener à l'identification de mutants ne pouvant plus dimériser. Ceci a été fait dans le cas de l'interaction entre Nurr1 et RXR et la simple substitution de la proline 560 ou de la leucine 562 en alanine abolit la formation d'hétérodimères entre ces deux NRs (2). Ces résidus dans le domaine I (un domaine important pour la dimérisation des NRs) sont situés dans la région C-terminale de Nurr1 qui est peu conservée entre les membres de la famille Nur.

Il serait particulièrement utile de trouver des mutants qui peuvent encore homodimériser mais qui sont incapables de former des hétérodimères entre facteurs de la famille. En effet, ceci permettrait de tester la pertinence de l'hétérodimérisation de

diverses manières. Outre la batterie d'essais transcriptionnels, une approche puissante envisageable serait de créer une souris ayant intégré la copie mutante du facteur Nur à la place de l'allèle sauvage (souris knock-in). De plus, afin d'exacerber les effets de la mutation et de réduire l'interférence possible par un effet redondant des autres membres, ces souris pourraient être croisées avec des lignées ayant subi l'ablation d'un des autres membres de la famille. Ainsi par exemple, en croissant un mutant de NGFI-B incapable d'hétérodimériser avec une souris NOR-1<sup>-/-</sup>, il sera possible de tester *in vivo* la pertinence de l'hétérodimérisation entre NGFI-B et Nurr1. Le rôle de ces hétérodimères dans la réponse de POMC au CRH pourra ainsi être testé directement en induisant artificiellement l'axe HPA chez ces souris. Bien sûr, la même approche pourrait être utilisée pour tester la fonction des homodimères de NGFI-B ou Nurr1/NOR-1. Ceci a été fait avec succès dans le cas de GR afin de distinguer entre les effets dus à sa liaison à l'ADN (qui requiert l'homodimérisation) et ceux résultant de ses interactions protéines:protéines (398).

Il est à noter que bien que le mode d'action en dimères semble plus pertinent biologiquement, il est possible que les monomères jouent des rôles spécifiques dans certaines conditions. D'ailleurs, il a été rapporté que le Bisphénol A (BPA), un xénobiotique qui induit les voies PKA et MAPK dans la lignée tumorale de cellules de Leydig (K-28), augmente la transcription dépendante du NBRE mais non celle dirigée par le NurRE (448). Il est donc possible que le BPA induise une modification qui rehausse spécifiquement l'activité des monomères de facteurs Nur. Il est à noter que le BPA n'induit que NGFI-B dans ces cellules (448). Il est aussi possible que l'absence d'effet sur le NurRE soit dû à un blocage de la dimérisation de NGFI-B par le BPA ou alors qu'*in vivo*, l'activation du NurRE nécessite la formation d'hétérodimères.

## 5.2 Sur la pertinence biologique du NurRE

L'ensemble de mes résultats présentés aux chapitres 2 et 3, de même que ceux ayant mené à l'identification du NurRE (379,380), suggèrent d'ores et déjà que le mécanisme d'action en dimères sur le NurRE est plus pertinent que l'action monomérique sur le NBRE. Contrairement au NBRE identifié par sélection en levure, le NurRE est la première cible d'action physiologique identifiée pour les facteurs Nur. De plus, le NurRE



est beaucoup plus sensible aux stimuli physiologiques que le NBRE. Ceci a été démontré dans les cellules AtT-20 en réponse au CRH ainsi que dans les hybridomes de cellules T en réponse à la stimulation du TCR (379). Ainsi, le NurRE présente un nouveau paradigme pour l'étude des voies de signalisation médiées par la famille Nur. Il sera particulièrement intéressant de chercher d'autres sites NurRE dans les gènes régulés par le CRH (dont le gène *CRH* lui-même) dans l'axe HPA mais aussi dans les autres systèmes régulés par le CRH. Il sera notamment important de chercher dans le promoteur de gènes exprimés dans les corticotropes tels la sous-unité  $\alpha 1c$  des canaux calciques de type L, le récepteur CRH-R1 et le CRH-BP (un facteur qui antagonise les effets du CRH sur la sécrétion de l'ACTH), puisque l'expression de ces trois protéines est régulée par le CRH via la voie de l'AMPc (101,219,522). De plus, NGFI-B a été impliqué dans la régulation de plusieurs gènes qui sont également ciblés par la voie de l'AMPc. Ceux-ci incluent les enzymes nécessaires à la stéroïdogénèse P450c17 (17-hydroxylase) et P450c21 (21-hydroxylase) (78,542), le gène de l'aldolase C (63), le gène spécifique aux glandes salivaires *R15* (288) de même que plusieurs gènes spécifiques aux thyrotropes (382). Étant donné mes résultats qui montrent que les dimères de NGFI-B sont des effecteurs transcriptionnels de la voie de l'AMPc/PKA, il sera intéressant de chercher des NurREs dans les régions régulatrices de ces gènes. Plus généralement, il sera aussi envisageable de localiser des NurREs dans la région promotrice des gènes impliqués dans l'apoptose des thymocytes, système dans lequel aucun gène-cible des facteurs Nur n'a été identifié.

Mes études démontrent que Nurr1 et NOR-1 activent moins fortement que NGFI-B la transcription dépendante du NurRE, ce qui corrèle avec leurs capacités moindres à former des homodimères sur cet élément. Il semble en effet que le NurRE de POMC soit une cible préférentielle pour des dimères contenant NGFI-B, mais il est possible que des variantes du NurRE puissent conférer une sensibilité différente à des homodimères et/ou des hétérodimères spécifiques de certain membres de la famille Nur. La démonstration que Nurr1 et NOR-1 sont d'aussi bons activateurs transcriptionnels que NGFI-B sur une cible NurRE 'consensus' (figure 2.4) suggère qu'il faudrait orienter la recherche de NurREs vers des répétitions renversées (everted repeat) de séquences apparentées au NBRE plutôt que d'essayer de retrouver la séquence exacte du NurRE du gène POMC.

L'existence de différents NurRE ciblés par des hétérodimères spécifiques constituerait un niveau de régulation qui viendrait s'ajouter à l'expression différentielle des facteurs Nur. En effet, de subtiles différences dans les éléments de réponses peuvent dramatiquement changer la conformation du récepteur et ainsi changer le type de cofacteur recruté. C'est le cas pour ER qui recrute différents coactivateurs selon le ERE (299). Cela a aussi été élégamment démontré pour Pit-1, qui se lie à deux sites dans le promoteur du gène GH qui diffèrent par deux nucléotides, mais dont l'un induit le recrutement d'un coactivateur et l'autre d'un corépresseur (426).

L'analyse détaillée du promoteur de POMC (464,465) a suggéré que l'activité du NurRE est dépendante de l'activité des facteurs qui agissent sur la région centrale et distale du promoteur et qui ont été impliqués dans l'expression tissu-spécifique de POMC, tels que Tpit, Pitx1 et les hétérodimères de facteurs bHLH contenant NeuroD1 (125,259,387). Ainsi, l'absence ou l'inactivité de ces facteurs pourrait limiter l'activité du NurRE. Ceci expliquerait pourquoi la régulation hormonale du promoteur de POMC médiée par les facteurs Nur ne semble pas s'opérer au NurRE dans certains contextes (335), mais plutôt au niveau d'une séquence NBRE qui chevauche un élément de réponse négative aux glucocorticoïdes, le nGRE (127). Des études plus poussées révéleront les rôles précis joués par ces deux cibles régulatrices lors de l'activation par le CRH *in vivo* (voir section 5.5).

Parmi les expériences envisageables qui pourraient nous éclairer sur les rôles respectifs du NurRE et du NBRE, il serait intéressant d'établir des souris transgéniques portant un rapporteur (du type lacZ) dirigé par un certain nombre de copies du NurRE ou du NBRE. En comparant les patrons d'expression spatio-temporels des rapporteurs, cela permettrait de différencier les rôles *in vivo* du NurRE et du NBRE et d'adresser ainsi en même temps la pertinence biologique de chacune dans les divers tissus où les facteurs Nur sont exprimés. Ces souris pourraient aussi être manipulées pour distinguer les conditions où l'activité des rapporteurs est inductible et où elle est constitutive. Par exemple, au niveau de l'hypophyse, la stimulation de l'axe HPA de ces souris (par les méthodes décrites plus haut) nous permettrait de tester *in vivo* la réponse des deux éléments au CRH. De plus, l'expression des rapporteurs pourrait aussi être restreinte aux cellules exprimant POMC en insérant dans la construction les séquences qui dirigent

l'expression histo-spécifique du promoteur de *Tpit*. Une telle approche a été utilisée pour étudier l'activité transcriptionnelle du facteur MEF2 du cœur. Ainsi, le rapporteur contenant l'élément de réponse à MEF2 n'est actif que lorsque l'hypertrophie est induite ou lorsque cette lignée est croisée avec une souris transgénique exprimant la CamKIV constitutivement active (369). Une limitation de ce type d'expérience pourrait venir du fait que les facteurs Nur sont exprimés ubiquitairement, donc il existe la possibilité d'obtenir un bruit de fond élevé. Toutefois, j'ai observé au cours de mes études que généralement les rapporteurs NurRE et NBRE possèdent une faible activité de base qui est fortement inductible, notamment dans les AtT-20 et ceci malgré la présence d'au moins NGFI-B et Nurr1. Ceci suggère que les protéines sont maintenues dans un état inactif, par phosphorylation de la Sér316 ou par la séquestration dans le cytoplasme, ce qui est en accord avec ma démonstration que l'activité de NGFI-B est inductible en réponse au CRH (voir chapitre 3).

Toute considération de la pertinence physiologique du NurRE doit tenir compte du fait que les Gc répriment l'activation transcriptionnelle médiée par le NurRE et les facteurs Nur. L'antagonisme observé entre GR et NGFI-B expliquerait donc en grande partie la répression de la transcription de POMC par les Gc dans les cellules corticotropes de l'hypophyse, de même que l'effet inhibiteur des Gc sur l'apoptose des cellules T activées par le TCR. Toutefois, deux cibles majeures ont été décrites dans le promoteur de POMC, soit le NurRE et le nGRE/NBRE. Bien que l'importance relative de chacune des deux cibles pour la répression par les Gc ne soit pas encore établie dans un contexte physiologique, il est probable que l'antagonisme exercé via le NurRE ne soit possible que dans un contexte où les facteurs cellules-spécifiques, tels *Tpit*, *Pitx1* et *NeuroD1*, sont actifs. Par contre, l'absence de ceux-ci favorisera un mécanisme de répression impliquant le nGRE (335,403). Cette interprétation est en accord avec la répression du promoteur de POMC par les Gc observée dans les cellules L (199) ou sur les épisomes BPV dans des cellules mammaires, où la répression passe par le nGRE (79). La présence de deux sites d'action de GR sur le promoteur POMC pourrait servir à moduler la sensibilité du gène à la répression par les glucocorticoïdes. Une telle modulation pourrait expliquer les changements de sensibilité de l'axe HPA à la rétroaction négative des Gc, tel qu'il a été observé dans le stress chronique ou le syndrome de Cushing (1). Quoiqu'il en soit, en ce

qui concerne la répression médiée par le NurRE, il sera intéressant de regarder si GR interfère avec les mécanismes d'activation de NGFI-B, comme le recrutement de SRC-2, l'interaction avec Tpit ou le ciblage de NGFI-B par les voies de signalisation induites par le CRH. De plus, étant donné le parallèle mécanistique entre l'antagonisme GR/AP-1 sur le promoteur du gène collagénase-3 et GR/Nur sur le promoteur de POMC, il faudra considérer la possibilité que la liaison de GR à NGFI-B lorsque celui-ci est sur le NurRE force SRC-2 à troquer ses fonctions de coactivateur pour celles de corépresseur, tel qu'observé dans le cas de GR/AP-1 (409).

Les résultats rapportés à la figure 2.5 révèlent que RXR antagonise l'action des dimères de NGFI-B sur le NurRE, ce qui n'est pas observé sur le NBRE ni sur la cible DR-5 (140). Ceci suggère que le NurRE est une nouvelle interface de communication entre les voies de signalisation des facteurs Nur et des rétinoïdes. Cette observation, subséquemment confirmée par un autre groupe (218), s'ajoute à d'autres exemples d'interchanges entre les voies des rétinoïdes et des Nur, tel que l'interaction directe entre RXR et Nurr1/NGFI-B ou la séquestration de RXR dans cytoplasme après phosphorylation de NGFI-B en réponse au NGF (221,540). Ce mécanisme de répression de l'activité dépendante du NurRE pourrait s'avérer particulièrement pertinente dans les thymocytes immatures où les rétinoïdes antagonisent l'apoptose induite par le TCR, un mécanisme qui requiert l'activité transcriptionnelle de NGFI-B.

### **5.3 Sur les mécanismes de la régulation transcriptionnelle de POMC par NGFI-B**

Les résultats rapportés dans les chapitres 3 et 4 confirment l'importance des dimères de facteurs Nur, en plus de jeter une nouvelle lumière sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse transcriptionnelle du gène POMC à la stimulation par le CRH. En effet, mes études établissent les facteurs Nur, et particulièrement NGFI-B, en tant qu'effecteurs transcriptionnels des voies AMPc/PKA et MAPK et démontrent que ces NRs activent la transcription de POMC en synergie avec Tpit et en recrutant les coactivateurs SRCs et CBP/p300.

Dans les corticotropes, l'induction de la transcription de POMC par le CRH ne requiert pas de synthèse protéique *de novo* (148). Donc, afin de qualifier comme candidat au titre de médiateur des effets transcriptionnels du CRH, la protéine NGFI-B devait être

présente dans les AtT-20 non-stimulées. Or, bien que son ARNm semble faible en conditions basales et qu'il est induit par le CRH, les niveaux de protéines NGFI-B restent inchangés (figure 3.1). Un tel phénomène se produit également dans la rétine, où le NMDA induit l'ARNm de NGFI-B sans affecter les niveaux de protéines NGFI-B (254). Il semble donc que l'expression de NGFI-B est régulée post-transcriptionnellement au niveau de la traduction. De plus, mes résultats suggèrent un mécanisme par lequel l'activité de NGFI-B peut être rapidement modulée, ce qui est en accord avec l'induction de la transcription de POMC, de même que les niveaux d'AMPc, qui sont maximaux entre 15 à 30 minutes après stimulation par le CRH (148). En effet, j'ai montré que le CRH induit la déphosphorylation de la Sér316 de NGFI-B, ce qui augmente sa liaison au NurRE, ainsi que le recrutement du coactivateur SRC-2 par NGFI-B sur son élément dimérique.

Ce mécanisme, à première vue assez direct, soulève plusieurs questions auxquelles il faudra tenter de répondre dans l'avenir. D'abord, on peut se demander pourquoi la déphosphorylation de la Sér316 en réponse au CRH n'entraîne pas une augmentation de la liaison de NGFI-B sur le NBRE. Il est possible que d'autres modifications, qui restent à être identifiées et qui sont nécessaires pour induire la liaison à l'ADN, soient différentes pour la liaison sur le NurRE et le NBRE. L'existence de telles modifications est suggérée par les études dans les cellules T, qui montrent que la cyclosporine A (CsA), un inhibiteur de la phosphatase calcineurine, bloque l'apoptose des cellules T en inhibant la liaison de NGFI-B au NBRE (535). Or, l'effet du CsA passe par le domaine N-terminal de NGFI-B, suggérant qu'une phosphorylation de ce domaine module la liaison au NBRE. Ce type de communications interdomaines a déjà été rapporté chez les NRs, notamment sur PPAR $\gamma$  dont la phosphorylation de l'AF-1 par les MAPKs inhibe l'affinité de son LBD pour le ligand (432).

De nombreuses autres questions devront être adressées afin d'éclaircir les détails mécanistiques de la modulation par le CRH de l'activité transcriptionnelle de NGFI-B. Notamment, il faudra déterminer si les voies de signalisation induites par le CRH favorisent la dimérisation de NGFI-B avant la liaison à l'ADN, ou si la dimérisation se fait sur le NurRE, facilitée par la coopérativité de liaison observée précédemment (379).

Il sera aussi intéressant de déterminer si l'interaction avec SRC-2 nécessite d'abord la liaison à l'ADN de NGFI-B.

Une des questions fondamentales qui reste à résoudre concerne la nature des enzymes qui modifient NGFI-B en réponse au CRH ainsi que les voies de signalisation qui les contrôlent. Un événement important élicité par la voie du CRH/AMPC est la déphosphorylation de la Sér316 de NGFI-B. Un mécanisme semblable a été observé pour le récepteur AR où la forskolin peut induire la déphosphorylation de plusieurs résidus sur la protéine (45). La calcineurine est une bonne candidate au titre de phosphatase qui cible la Sér316 de NGFI-B, puisque l'activation du NurRE est partiellement bloquée par la CsA (observation personnelle non-publiée). Toutefois, la démonstration formelle de son implication reste à faire. Quant au N-terminal, si le CRH induit sa modification (ce qui n'a pas encore été démontré) il est probable qu'il soit la cible directe des MAPKs Erk1/2. En effet, j'ai montré que la voie MAPK est en aval de la voie de l'AMPC et que l'activation du NurRE par le CRH requiert les MAPKs (Chapitre 4). De plus, il a été montré que l'AF-1 de NGFI-B est ciblé par les kinases Erk1/2 (221) et une étude concomitante à la mienne a montré que Erk2 phosphoryle NGFI-B *in vitro* (242). Plus généralement, notons que dans la plupart des cas rapportés, la phosphorylation des NRs par les MAPKs a lieu sur l'AF-1 et ces modifications régulent positivement la transcription (voir section 1.3.1.3.2). De plus, ces phosphorylations de l'AF-1 par Erk1/2 favorisent souvent l'interaction entre les NRs et les coactivateurs, tel lors du recrutement des facteurs SRCs par ER $\alpha$ , ER $\beta$  et SF-1.

Il sera particulièrement important de regarder quel est le rôle exact de PKA dans l'activation des propriétés transcriptionnelles de NGFI-B. Contrairement à Erk1/2, PKA cible souvent le DBD des NRs, notamment celui de GR, MR, SF-1 et HNF-4 (voir section 1.3.1.3.2). Étant donné que la phosphorylation *in vitro* de la Sér316 par PKA empêche la liaison à l'ADN, il est peu probable que PKA phosphoryle directement NGFI-B. Ce mécanisme n'est pas unique puisque la phosphorylation par PKA de HNF4, qui possède un CTE semblable à celui de NGFI-B, réprime également sa liaison à l'ADN (487). Similairement à ce qui est observé pour NGFI-B, l'activation de la voie de l'AMPC rehausse l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  et induit sa phosphorylation (96). Toutefois, la phosphorylation directe *in vitro* par PKA sur la Sér236 du DBD diminue la

dimérisation de ER $\alpha$  de même que son habileté à lier l'ADN, ce qui suggère un mécanisme indirect de PKA sur l'activité du récepteur (82). Des études ont montré que ce mécanisme ne passe pas par les coactivateurs SRC-1 ni CBP (96), mais pourrait impliquer une synergie transcriptionnelle avec CREB (267), qui est aussi capable d'interagir avec SF-1 (200). Toutefois, j'ai écarté une telle possibilité dans le cas de l'action de PKA sur NGFI-B (résultat non-publié). L'activité de SF-1 est aussi rehaussée par SRC-2 et par PKA, qui phosphoryle l'AF-2 de ce récepteur (205). Cependant, contrairement à ce qui est observé pour NGFI-B, l'activation de la voie de l'AMPc semble stabiliser la protéine SF-1 (7). L'ensemble de ces observations suggère donc que PKA ne phosphoryle pas directement NGFI-B mais agit plutôt en stimulant deux voies convergentes : une qui aboutit à la déphosphorylation du DBD de NGFI-B (possiblement par la calcineurine) et l'autre qui implique les MAPKs et qui cible l'AF-1 pour recruter SRC-2.

Mes résultats présentés au chapitre 3 démontrent que c'est l'AF-1 situé dans le domaine N-terminal de NGFI-B et Nurr1 qui médie l'effet activateur de PKA et des coactivateurs SRCs. L'implication de l'AF-1 dans le recrutement des coactivateurs par NGFI-B et NOR-1 a d'ailleurs été confirmée par d'autres groupes (498,499). Ces résultats sont surprenants et démarquent nettement les facteurs Nur des autres NRs, chez qui le recrutement des coactivateurs se fait principalement par l'AF-2. L'explication moléculaire de ces observations est venue récemment, sous la forme d'études cristallographiques qui montrent que le LDB de la famille Nur est occupé par des chaînes latérales encombrantes d'acides aminés aromatiques qui rendent la poche de liaison inaccessible à un ligand. De plus, le LBD n'a pas de poche d'interaction classique avec les coactivateurs, ce qui explique pourquoi les coactivateurs semblent se lier principalement à l'AF-1. Ces résultats appuient l'argument que les facteurs Nur sont de 'vrais orphelins' chez qui les modifications post-traductionnelles, principalement sur l'AF-1, servent à moduler leur activité transcriptionnelle, contrairement à la liaison du ligand chez la plupart des autres NRs. L'existence d'homologues de NGFI-B dans beaucoup d'organismes primitifs est en accord avec cette hypothèse puisque le mode d'action par le ligand n'est retrouvé que chez les chordés et qu'il a été proposé que l'ancêtre des NRs était un orphelin (25). Mentionnons qu'il est envisageable que la

phosphorylation de l'AF-1 stabilise l'AF-2 (qui peut adopter une conformation active selon les études structurales) et ainsi favoriser le recrutement d'autres coactivateurs ou même de SRC-2. Des cas de coopérativité entre AF-1 et AF-2 pour le recrutement de SRC-2 ont été rapportés dans la littérature pour ER $\alpha$  et RAR $\alpha$ 1 (34,52). Notons aussi que l'activité de chaque domaine peut dépendre du contexte cellulaire. Par exemple, l'activité de Nurr1 semble dépendre de l'AF-2 dans les cellules 293, mais non dans les Jag3 (73). Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces études souligne l'importance de l'AF-1 chez les membres de la famille Nur.

#### 5.4 Sur les mécanismes de la régulation transcriptionnelle de POMC par Tpit

Les résultats présentés au chapitre 4 définissent un nouveau rôle pour le facteur à boîte T Tpit; celui de médiateur des effets transcriptionnels du CRH sur le promoteur POMC. De plus, en démontrant que Tpit est une cible pour la voie de l'AMPC/PKA et qu'il active la transcription en recrutant les coactivateurs de la famille SRC/p160, ces résultats aideront à comprendre un peu plus les mécanismes par lesquels ces facteurs régulent la transcription. En effet, malgré leur grande importance en tant que régulateurs du développement, très peu d'études se sont penchées sur les mécanismes d'action des facteurs T et il s'agit de la première étude démontrant qu'un facteur à boîte T est ciblé par une voie de signalisation intracellulaire et un seul autre coactivateur de cette famille avait été identifié.

Beaucoup de questions restent à être adressées afin de raffiner notre compréhension du rôle de Tpit dans la réponse au CRH, d'autant plus qu'en étant un facteur récemment identifié, la caractérisation biochimique de Tpit n'en est qu'à ses débuts. Ainsi, il sera important de déterminer si Tpit est lui-même la cible de modifications post-traductionnelles, et en particulier d'établir si Tpit est une phosphoprotéine. Ceci pourrait expliquer le rehaussement de son activité transcriptionnelle par PKA (figure 4.2) ainsi que l'observation que la voie MAPK est requise pour l'activation du Tpit/Pitx-RE.(figure 4.3). Une analyse rapide par bioinformatique révèle certains sites consensus de phosphorylation dans la protéine, notamment un site MAPK dans la boîte T, mais pas dans le N-terminal défini comme médiant l'interaction avec SRC-2 (figure 4.4). Ceci nous indique que le domaine N-



terminal de Tpit n'est probablement pas ciblé par les kinases, ou alors que la phosphorylation se fait via un site atypique. Il est fort possible par contre que l'action de PKA et/ou des MAPKs soit indirecte et cible plutôt le coactivateur. Diverses expériences devront être entreprises pour éclaircir ce point (voir section 5.5).

Outre la nature des modifications post-traductionnelles de Tpit et des enzymes impliquées, il sera nécessaire de déterminer les mécanismes précis par lesquels PKA et SRC-2 rehaussent l'activité transcriptionnelle de Tpit. Une hypothèse attrayante est que PKA et/ou SRC-2 augmentent l'affinité de Tpit pour son élément de réponse. En effet, malgré son importance évidente pour transcription de POMC, la liaison de Tpit au Tpit/Pitx-RE est relativement faible lorsque évaluée dans des expériences de retard sur gel. Ainsi, l'interaction avec d'autres facteurs associés, tel NGFI-B et SRC-2 pourrait augmenter son affinité intrinsèque à l'ADN, ce qui est un mécanisme utilisé par de nombreux autres facteurs de transcription qui ont besoin d'interagir avec d'autres protéines pour se lier à l'ADN (310). Toutefois, les résultats d'expériences de retard sur gel (figure 4.4) ainsi que d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) (résultats non publiés) suggèrent que la voie de l'AMPC/PKA induite par le CRH n'affecte pas l'affinité de Tpit pour l'ADN. D'autres expériences ont également écarté la possibilité que PKA affecte la stabilité de Tpit ou que cette kinase favorise l'interaction entre Tpit et Pitx1. L'ensemble de ces observations suggère donc que PKA favorise l'interaction entre Tpit et SRC-2, ce qui reste toutefois à être démontré par diverses techniques, préférentiellement *in vitro* et *in vivo*.

Il sera très intéressant dans l'avenir de déterminer si les mécanismes utilisés par Tpit s'appliquent également aux autres facteurs à boîte T. Déjà, j'ai pu montrer que l'activité transcriptionnelle de Brachyury est fortement rehaussée par PKA, tandis que celle de Tbx1 n'est pas affectée (figure 4.2). Il est donc probable que SRC-2 soit également un coactivateur spécifique de Brachyury. Il serait intéressant d'étendre ce mécanisme à d'autres facteurs à boîte T et d'essayer de définir un nouveau motif d'interaction avec les SRCs. L'identification d'autres coactivateurs de Tpit ou des facteurs à boîte T en général pourrait s'avérer très informative, tandis que l'identification de corépresseurs pourrait expliquer l'action répressive de Tbx2 et de Tbx3 sur de nombreux promoteurs, ainsi que l'effet inhibiteur de Tpit sur la différenciation des

gonadotropes (68,290,392). Dans le cas de Tpit, la répression pourrait même impliquer le recrutement de SRC-2 en tant que corépresseur sur des promoteurs spécifiques. Quoiqu'il en soit, il sera capital de tester *in vivo* la pertinence fonctionnelle de la phosphorylation de Tpit et du recrutement de coactivateurs. Ceci impliquera d'abord l'identification précise des acides aminés impliqués dans l'interaction avec SRC-2 ou ceux sujets à phosphorylation afin de construire des mutants de Tpit ayant perdu ces propriétés. Ensuite, on pourra envisager la création d'une souris transgénique où l'expression sera dirigée dans l'infundibulum, pour voir si un mutant particulier est toujours capable d'induire l'expression de POMC ou de réprimer les marqueurs gonadotropiques. L'analyse de l'effet de ces mutations dans les corticotropes nécessitera toutefois la création de souris knock-in, qui servira à déterminer si ces mutants sont toujours compétents à induire la différenciation des cellules POMC-positives et si oui, à déterminer si les corticotropes différenciés répondent normalement à la stimulation par le CRH. Quant au rôle général de Tpit dans régulation de POMC par l'axe HPA chez l'adulte, les souris Tpit<sup>-/-</sup> ne peuvent nous renseigner puisqu'elles ne possèdent plus ou peu de corticotropes. La génération d'un mutant conditionnel, où l'ablation génique se produirait après la différenciation terminale des corticotropes, pourrait circonvenir à ce problème.

Finalement, mentionnons que la synergie entre NGFI-B et Tpit, combinée à celle entre NeuroD1 et Tpit/Pitx1 explique la nécessité de l'élément CE pour que le DE soit actif. Il sera intéressant de caractériser plus en profondeur les interactions fonctionnelles entre ces deux représentants de familles importantes de facteurs de transcription. Il sera aussi informatif de regarder le rôle potentiel du Tpit/Pitx-RE dans la répression par le Gc. Ainsi, si l'activation par le CRH n'est pas renversée par les Gc, il sera alors probable que GR vise des mécanismes qui ne sont pas communs entre NGFI-B et Tpit pour réprimer l'activation du promoteur POMC par NGFI-B.

### **5.5 Sur la réponse du gène POMC au CRH et la recherche de l'Élément**

Au cours de mes études de doctorat, j'ai contribué à la compréhension des mécanismes régulant la réponse du gène POMC à la stimulation par le CRH en caractérisant deux nouveaux éléments qui n'avaient pas été précédemment impliqués; le

NurRE et le Tpit/Pitx-RE. Or, le point en commun entre les mécanismes d'activation transcriptionnelle de NGFI-B et Tpit est l'implication du même coactivateur SRC-2 ainsi que la même voie de signalisation en aval de PKA, soit la voie MAPK. Bien que la présence de cofacteurs communs était prévisible, l'implication de la voie MAPK en aval de l'AMPc en réponse au CRH était plus inattendue, puisque l'AMPc et le calcium avaient longtemps été les deux seules voies étudiées. Toutefois, des précédents de communication entre les voies PKA et MAPK avait été rapportés dans l'hypophyse. Aussi, il avait été montré que dans les cellules CHO transfectées avec les récepteurs CRH-R1 et CRH-R2 $\alpha$ , le CRH active les voies de signalisation de l'AMPc, du calcium et des MAPKs Erk1/2 (411). De plus, le CRH induit la différenciation de certains neurones catécholaminergiques en induisant les voies de l'AMPc et des MAPKs Erk1/2 (92).

L'ensemble de mes études a donc mené à élaborer un modèle, présenté à la figure 4.6, où le CRH induit la synthèse d'AMPc, ce qui active séquentiellement les kinases PKA et ultimement Erk1/2, qui elles induisent la formation d'un complexe transcriptionnel incluant notamment NGFI-B, Tpit et SRC-2, et potentiellement d'autres coactivateurs et facteurs liant l'ADN impliqués dans la transcription de POMC. Dans l'avenir, il sera essentiel de déterminer la mécanique de l'assemblage du complexe transcriptionnel sur le promoteur. Par exemple, il faudra déterminer si NGFI-B et Tpit interagissent avec la même molécule de SRC-2 ou si des dimères (ou multimères) de facteurs SRCs sont recrutés au promoteur de POMC. De plus, il sera important de démontrer que les diverses interactions protéiques décrites aux chapitres 2, 3 et 4 se produisent dans la cellule corticotrope. Outre les expériences classiques de co-immunoprécipitation, ces interactions pourraient être élégamment démontrées en utilisant la technique de FRET ou BRET (Fluorescence/Bioluminescence Resonance Energy Transfert), une nouvelle technique permettant d'étudier les interactions protéines : protéines de manière dynamique. Ceci pourrait être fait dans les cellules AtT-20, en présence ou absence de stimulation par le CRH, ce qui nous indiquerait si ces interactions potentielles sont constitutives ou inductibles.

Un autre point essentiel sera de comprendre comment les signaux élicités par le CRH sont intégrés par le complexe transcriptionnel. Par exemple, des expériences de ChIP en présence ou absence d'inhibiteurs de PKA ou MAPK pourront déterminer si ces

voies sont essentielles au recrutement de NGFI-B, Tpit et SRC-2 au promoteur. Il faudra aussi déterminer lequel de ces facteurs est une cible directe de phosphorylation par la PKA et les MAPK. Cette question pourrait être adressée en utilisant des mutants non-phosphorylables de SRC-2, de Tpit et de NGFI-B dans des expériences de transfections. Étant donné que les mêmes signaux induits par le CRH convergent sur plusieurs facteurs pour en stimuler l'activité transcriptionnelle, il est probable que les mécanismes de transduction du signal ciblent un co-intégrateur commun plutôt que plusieurs facteurs individuellement. Un tel mécanisme a souvent été démontré et il est connu que l'activité des facteurs SRCs est modulée par la voie MAPK (voir section 1.3.3.3). Toutefois, la phosphorylation des facteurs SRCs n'est pas toujours nécessaire. Ainsi, un mutant de SRC-1 où les 7 sites de phosphorylation ont été détruits est toujours capable de stimuler l'activité de ER $\alpha$  induite par l'AMPc, tandis qu'il ne peut plus coactiver celle de PR (97). Il est aussi concevable que la phosphorylation cible une autre protéine du complexe, comme CBP/p300, et dans ce cas l'utilisation de mutants non-phosphorylables de NGFI-B, Tpit ou SRC-2 ne montrerait aucun effet transcriptionnel.

## 5.6 Sur la quête de l'Élément de réponse

Au cours des années, divers groupes ont entrepris d'identifier l'élément de réponse au CRH sur le promoteur de POMC et pourtant chacun ont proposé une région différente du promoteur (voir section 1.4.3.2). Diverses raisons pourraient expliquer ces divergences. Ainsi, l'état des cellules modèles utilisées, de même que le clone particulier de cellules AtT-20 pourrait influencer la sensibilité des diverses régions du promoteur. De plus, les conditions de culture et de sérum pourraient influencer, notamment si les cellules sont maintenues en bas pourcentage de sérum, puisque l'addition de CRH induit dans ces cas plus fortement les gènes de réponse immédiates, dont les facteurs Nur et AP-1 qui ont été impliqué dans la réponse du promoteur de POMC. Parmi les divergences notable, il faut remarquer que tandis que notre équipe a identifié le NurRE comme cible des facteurs Nur sur le promoteur (379), une autre équipe en utilisant une approche similaire a plutôt identifié le NBRE dans l'élément proximal du promoteur POMC (335). Une explication possible est que tandis que nous avons principalement utilisé NGFI-B dans nos essais de transactivation, cette équipe s'est surtout concentrée sur les effets de

Nurr1 sur le promoteur. Il serait donc possible que NGFI-B agisse préférentiellement sur le NurRE, tandis que Nurr1 (qui a moins d'affinité pour le NurRE) agisse principalement via le NBRE.

L'ensemble de mes observations, de même que les études précédentes de la réponse au CRH, démontrent clairement que le promoteur de POMC est complexe et qu'une multitude d'éléments semblent contribuer à la réponse au CRH, sans qu'aucun ne soit indispensable. En effet, la délétion ou la mutation du NurRE, du Tpit/Pitx-RE, du NBRE et même du site AP-1 n'affectent pas ou peu l'activation hormonale du promoteur, suggérant que la liaison à l'ADN de NGFI-B, Tpit de même que les facteurs AP-1 et CREB ne sont pas indispensables à la réponse du promoteur POMC au CRH. Une approche différente à envisager serait d'effectuer ces études de réponse du promoteur dans des cellules où l'expression des divers facteurs impliqués serait bloquée avec l'utilisation de siRNA. L'avantage de cette technique est que plus d'un siRNA peut être transfecté en même temps, ce qui permet d'inactiver plusieurs facteurs à la fois. Dans le cas des facteurs Nur, des combinaisons de facteurs pourrait être inactivées, ce qui permettrait de tester la pertinence de la formation d'hétérodimères Nur dans la réponse au CRH. Cette technique permettrait aussi d'éliminer les effets transcriptionnels qui n'impliquent pas la liaison à l'ADN.

Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces observations argumente en faveur du recrutement d'un grand complexe, comportant plusieurs points d'encrage sur le promoteur, et qui intègre les signaux élicités par le CRH pour induire l'expression de POMC. Étant donné le rôle essentiel de POMC et de l'ACTH dans la réponse au stress pour l'homéostasie, ce mécanisme multidimensionnel pourrait prévenir le risque qu'une mutation à un facteur unique ne vienne court-circuiter tout l'axe HPA. De plus, il est très possible que différents facteurs soient importants à différents stades du développement ou de la vie adulte. Ainsi, des facteurs comme les membres de la famille Nur, Tpit, PCRH-REB, et CREB, de même que les divers coactivateurs, sont probablement exprimés différemment dans le temps et un facteur pourrait prendre le relais quand un autre s'éteint. C'est d'ailleurs le cas pour les facteurs composant le complexe AP-1, puisque le traitement au CRH induit une liaison d'un complexe qui contient majoritairement c-fos

durant les premières heures, tandis que si le traitement est maintenue, c'est plutôt JunB qui est présent à plus long terme (24).

Ceci met en lumière une des limitations de l'étude de la réponse au CRH dans les cellules AtT-20, la lignée utilisée dans la plupart des études. Les AtT-20 sont une lignée tumorale, donc fixée dans le temps, et dont le profil d'expression génétique ne peut certainement pas refléter à la fois celui d'un corticotrope au jour e15 et d'un corticotrope adulte. Il serait donc important de mener ce genre d'études *in vivo*, dans des lignées transgéniques par exemple dans un rapporteur dirigé par le promoteur de POMC comportant diverses mutations. Il serait aussi envisageable d'étudier la réponse du promoteur au CRH dans des corticotropes en culture de souris ayant subi l'ablation génique des différents facteurs impliqués.

### 5.7 Conclusions et perspectives générales

Tel que mentionné au cours de ce chapitre, beaucoup de travail attend mes successeurs afin de raffiner notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse du gène POMC à la stimulation par le CRH. De plus, de nombreuses questions restent ouvertes quant aux mécanismes d'actions des divers acteurs impliqués, particulièrement pour les facteurs Nur et pour Tpit. Par exemple, il serait intéressant d'étudier l'implication de la voie de dégradation par le protéosome 26S après l'activation des facteurs Nur. En effet, beaucoup de NRs sont ainsi dégradés suite à la liaison du ligand et ceci est nécessaire pour observer leur activité transcriptionnelle. Or, si la phosphorylation de l'AF-1 de NGFI-B est bien l'équivalent de la liaison du ligand chez les autres NRs, il est possible que le protéosome soit aussi impliqué dans les étapes subséquentes à l'engagement de la machinerie transcriptionnelle sur le promoteur et qui mènent à la dégradation du récepteur activé. De plus, il sera très intéressant de regarder chez des doubles mutants des membres de la famille Nur afin d'étudier le rôle *in vivo* de ces facteurs dans l'axe HPA en limitant la possibilité de redondance fonctionnelle entre les membres.

En ce qui concerne la réponse au CRH, il faudra évaluer le rôle d'autres cibles possibles de la voie CRH/PKA/MAPK. NeuroD1 est un bon candidat à cet effet, puisqu'il est connu que la phosphorylation régule sa localisation subcellulaire dans cellules Beta du

pancréas. Ainsi, tandis qu'il est normalement cytoplasmique, il est transloqué vers le noyau en réponse au glucose par un mécanisme impliquant les MAPK (376). De plus, l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère NeuroD1/Pan1 est fortement activé par PKA sur un rapporteur contenant la boîte E du domaine distal du promoteur de POMC (résultat non-publié).

Il sera intéressant de regarder le rôle du calcium dans la transcription de POMC, notamment son implication dans l'activité des facteurs Nur. Il a récemment été montré qu'un traitement à la nifédipine, l'inhibiteur des canaux calciques de type L, abroge l'activation transcriptionnelle médié par le promoteur POMC et par NurRE en réponse au CRH (242). Ce résultat confirme ma propre observation de ce phénomène (résultat malheureusement non-publié). Les auteurs de cette étude évoquent une régulation des niveaux de facteurs Nur par la CamKII en réponse au CRH pour expliquer ce phénomène. Ils se basent sur l'observation que le traitement au KN-62, un inhibiteur de la CamKII, inhibe l'induction de l'ARNm des facteurs Nur, ce qui est également observé avec la nifédipine. Toutefois, ceci n'a pas été vérifié au niveau des protéines. Il est donc tout à fait possible, comme c'est le cas pour le CRH, que la CAMKII régule directement l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur. Ceci est d'autant plus vraisemblable étant donné l'observation qu'une autre CamK, soit CamKIV, semble moduler le rehaussement de l'activité de NGFI-B par le coactivateur ASC-2 (445). Donc, il est plausible que le CRH induise le recrutement de ASC-2 par NGFI-B suite à l'activation de la CamKII par le calcium, pour ainsi formé un complexe coactivateur contenant CBP/p300, les facteurs SRCs de même que ASC-2. Il est également intéressant de noter que dans cette étude, comme dans mes résultats préliminaires, le KN62 ne renverse pas complètement l'activation par le CRH ou la forskoline, contrairement à l'effet observé par la nifédipine (242). Ceci suggère donc qu'une partie des effets du calcium passent par d'autres voies de signalisation. Il est tentant de proposer que ces effets passent par l'activation de phosphatases sensibles au calcium, tel la calcineurine, qui pourrait être responsable de la déphosphorylation de la Sér316 de NGFI-B. Cette hypothèse est appuyée par mon observation que la CsA bloque l'activation de la transcription médiée par le NurRE (résultat non-publié). De plus, le calcium active calcineurine via la calmoduline, qui active aussi la CamKII et que l'on sait activée dans réponse au CRH. Or, les voies

calmoduline-dépendante CamK et calcineurine coopèrent souvent *in vivo*, dans les cellules T par exemple, ainsi que pour induire l'hypertrophie cardiaque (369).

Finalement, il serait aussi très intéressant d'étudier les interactions fonctionnelles possibles entre les facteurs Nur et/ou Tpit et les autres facteurs proposés comme médiateurs de la réponse au CRH. Mes résultats préliminaires semblent indiquer que Nur et CREB n'influencent pas leurs activités transcriptionnelles respectives (résultats non publiés). Il serait maintenant intéressant de regarder si tel est le cas avec Tpit. La relation entre Tpit/Nur et les facteurs AP-1 serait également très intéressante, surtout que NGFI-B et facteurs AP-1 comptent parmi les facteurs de réponse immédiate les plus importants et qu'ils sont induit en parallèle dans d'innombrables systèmes. Aussi, il faudra prêter une attention particulièrement à la relation avec PCRH-REB/RFC140. En effet, PCRH-REB/RFC140 contient un motif LXCXE qui médie son interaction avec Rb. Cette interaction est fonctionnellement très importante puisqu'il a été démontré que PCRH-REB/RFC140 favorise la survie cellulaire après dommage à l'ADN par un mécanisme qui dépend de son interaction avec Rb (373). Or, notre laboratoire a récemment démontré que Rb est un régulateur important de l'expression de POMC et qu'il est recruté au promoteur en réponse au CRH (29). De plus, Rb rehausse l'effet coactivateur de SRC-2 sur la transcription dépendante de NGFI-B et il semblerait que Rb fasse partie du complexe coactivateur recruté par NGFI-B car les protéines interagissent physiquement entre elles et avec SRC-2. Il sera donc intéressant de regarder si PCRH-REB/RFC140 aide au recrutement de complexe via son interaction avec Rb. De plus, il faudra regarder le rôle potentiel de Tpit dans la formation de ce complexe et tester si outre son interaction fonctionnelle avec NGFI-B et SRC-2, Tpit interagit avec Rb de même qu'avec PCRH-REB/RFC140.



## Reference List

1. 1990. ACTH, Cushing's Syndrome, and Other Hypercortisolemic States. Raven Press, New York.
2. **Aarnisalo, P., C. H. Kim, J. W. Lee, and T. Perlmann.** 2002. Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nurr1. *J Biol.Chem.* **277**:35118-35123.
3. **Abdel-Hafiz, H., G. S. Takimoto, L. Tung, and K. B. Horwitz.** 2002. The Inhibitory Function in Human Progesterone Receptor N Termini Binds SUMO-1 Protein to Regulate Autoinhibition and Transrepression. *J.Biol.Chem.* **277**:33950-33956.
4. **Abou-Samra, A. B., K. J. Catt, and G. Aguilera.** 1986. Biphasic inhibition of adrenocorticotropin release by corticosterone in cultured anterior pituitary cells. *Endocrinology* **119**:972-977.
5. **Abou-Samra, A. B., K. J. Catt, and G. Aguilera.** 1986. Involvement of protein kinase C in the regulation of adrenocorticotropin release from rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **118**:212-217.
6. **Abou-Samra, A. B., J. P. Harwood, V. C. Manganiello, K. J. Catt, and G. Aguilera.** 1987. Phorbol 12-myristate 13-acetate and vasopressin potentiate the effect of corticotropin-releasing factor on cyclic AMP production in rat anterior pituitary cells. Mechanisms of action. *J.Biol.Chem.* **262**:1129.
7. **Aesoy, R., G. Mellgren, K. Morohashi, and J. Lund.** 2002. Activation of cAMP-dependent protein kinase increases the protein level of steroidogenic factor-1. *Endocrinology* **143**:295-303.
8. **Aguilera, G., J. P. Harwood, J. X. Wilson, J. Morell, J. H. Brown, and K. J. Catt.** 1983. Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators on corticotropin release in rat pituitary cells. *J.Biol.Chem.* **258**:8039-8045.
9. **Ait-Si-Ali, S., S. Ramirez, F. X. Barre, F. Dkhissi, L. Magnaghi-Jaulin, J. A. Girault, P. Robin, M. Knibiehler, L. L. Pritchard, B. Ducommun, D. Trouche, and A. Harel-Bellan.** 1998. Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* **396**:184-186.
10. **Akita, S., J. Webster, S. G. Ren, H. Takino, J. Said, O. Zand, and S. Melmed.** 1995. Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory

- factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotropin hormone synthesis and secretion. *J.Clin.Invest* **95**:1288-1298.
11. **Alen, P., F. Claessens, G. Verhoeven, W. Rombauts, and B. Peeters.** 1999. The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol.Cell.Biol.* **19**:6085-6097.
  12. **Allaerts, W., P. Carmeliet, and C. Denef.** 1990. New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol.Cell Endocrinol.* **71**:73-81.
  13. **Anderson, L. A. and N. D. Perkins.** 2002. The Large Subunit of Replication Factor C Interacts with the Histone Deacetylase, HDAC1. *J.Biol.Chem.* **277**:29550-29554.
  14. **Anderson, L. A. and N. D. Perkins.** 2003. Regulation of RelA (p65) Function by the Large Subunit of Replication Factor C. *Mol.Cell.Biol.* **23**:721-732.
  15. **Anzick, S. L., J. Kononen, R. L. Walker, D. O. Azorsa, M. M. Tanner, X. Y. Guan, G. Sauter, O. P. Kallioniemi, J. M. Trent, and P. S. Meltzer.** 1997. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**:965-968.
  16. **Aoki, Y., Y. Iwasaki, M. Katahira, Y. Oiso, and H. Saito.** 1997. Regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT- 20 cells. I: Effects of the common secretagogues. *Endocrinology* **138**:1923-1929.
  17. **Aoki, Y., Y. Iwasaki, M. Katahira, Y. Oiso, and H. Saito.** 1997. Regulation of the Rat Proopiomelanocortin Gene Expression in AtT-20 cells. II: Effects of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide. *Endocrinology* **138**:1930.
  18. **Arias, J., A. S. Alberts, P. Brindle, F. X. Claret, T. Smeal, M. Karin, J. Feramisco, and M. Montminy.** 1994. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* **370**:226-229.
  19. **Arzt, E.** 2001. gp130 cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuro-endocrine pathways. *J Clin Invest* **108**:1729-1733.
  20. **Asa, S. L., K. Kovacs, G. D. Hammer, B. Liu, B. A. Roos, and M. J. Low.** 1992. Pituitary corticotroph hyperplasia in rats implanted with a medullary thyroid carcinoma cell line transfected with a corticotropin-releasing hormone complementary deoxyribonucleic acid expression vector. *Endocrinology* **131**:715-720.
  21. **Ashburner, M., C. Chihara, P. Meltzer, and G. Richards.** 1974. Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **38**:655-662.

22. **Auernhammer, C. J. and S. Melmed.** 1999. Interleukin-11 Stimulates Proopiomelanocortin Gene Expression and Adrenocorticotropin Secretion in Corticotroph Cells: Evidence for a Redundant Cytokine Network in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Endocrinology* **140**:1559.
23. **Autelitano, D. J.** 1998. Stress-induced stimulation of pituitary POMC gene expression is associated with activation of transcription factor AP-1 in hypothalamus and pituitary. *Brain Res Bull.* **45**:75-82.
24. **Autelitano, D. J. and D. R. Cohen.** 1996. CRF stimulates expression of multiple fos and jun related genes in the AtT-20 corticotroph cell. *Mol.Cell Endocrinol.* **119**:25-35.
25. **Auwerx, J., J. Drouin, and V. Laudet.** 2003. Recepteurs a la Provencale. *EMBO Rep.* **4**.
26. **Axelrod, J. and T. D. Reisine.** 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* **224**:452-459.
27. **Bach, I., C. Carriere, H. P. Ostendorff, B. Andersen, and M. G. Rosenfeld.** 1997. A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* **11**:1370-1380.
28. **Baker, K. D., L. M. Shewchuk, T. Kozlova, M. Makishima, A. Hassell, B. Wisely, J. A. Caravella, M. H. Lambert, J. L. Reinking, H. Krause, C. S. Thummel, T. M. Willson, and D. J. Mangelsdorf.** 2003. The Drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell* **113**:731-742.
29. **Batsche, E., J. Desroches, S. Bilodeau, Y. Gauthier, and J. Drouin.** 2003. Rb enhances p160/SRC coactivator-dependent activity of nuclear receptors: mechanism of interaction with NGFI-B (Nur77). *Mol.Cell* **submitted**.
30. **Batsche, E., C. Muchardt, J. Behrens, H. C. Hurst, and C. Cremisi.** 1998. RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Mol.Cell Biol.* **18**:3647-3658.
31. **Beato, M., P. Herrlich, and G. Schutz.** 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**:851-857.
32. **Becker, M., C. Baumann, S. John, D. A. Walker, M. Vigneron, J. G. McNally, and G. L. Hager.** 2002. Dynamic behavior of transcription factors on a natural promoter in living cells. *EMBO Rep.* **3**:1188-1194.
33. **Belandia, B. and M. G. Parker.** 2003. Nuclear receptors: a rendezvous for chromatin remodeling factors. *Cell* **114**:277-280.

34. **Benecke, A., P. Chambon, and H. Gronemeyer.** 2000. Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep.* **1**:151-157.
35. **Benjannet, S., N. Rondeau, R. Day, M. Chrétien, and N. G. Seidah.** 1991. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **88**:3564-3568.
36. **Bettoun, D. J., T. P. Burris, K. A. Houck, D. W. Buck, II, K. R. Stayrook, B. Khalifa, J. Lu, W. W. Chin, and S. Nagpal.** 2003. Retinoid X Receptor is a Non-Silent Major Contributor to Vitamin D Receptor-Mediated Transcriptional Activation. *Mol.Endocrinol.me.*
37. **Beuschlein, F. and G. D. Hammer.** 2002. Ectopic pro-opiomelanocortin syndrome. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* **31**:191-234.
38. **Bhat, M. K., K. Ashizawa, and S. Y. Cheng.** 1994. Phosphorylation enhances the target gene sequence-dependent dimerization of thyroid hormone receptor with retinoid X receptor. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **91**:7927-7931.
39. **Bicknell, A. B.** 2002. Identification of a receptor for N-POMC peptides. *Endocr.Res.* **28**:309-314.
40. **Bicknell, A. B., K. Lomthaisong, R. J. Woods, E. G. Hutchinson, H. P. Bennett, R. T. Gladwell, and P. J. Lowry.** 2001. Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. *Cell* **105**:903-912.
41. **Bilezikjian, L. M. and W. W. Vale.** 1983. Glucocorticoids inhibit corticotropin-releasing factor-induced production of adenosine 3',5'-monophosphate in cultured anterior pituitary cells. *Endocrinology* **113**:657-662.
42. **Birnberg, N. C., J. C. Lissitzky, M. Hinman, and E. Herbert.** 1983. Glucocorticoids regulate proopiomelanocortin gene expression in vivo at the levels of transcription and secretion. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **80**:6982-6986.
43. **Bishop, J. F. and M. M. Mouradian.** 1993. Characterization of a corticotropin releasing hormone responsive region in the murine proopiomelanocortin gene. *Mol.Cell Endocrinol.* **97**:165-171.
44. **Bissonnette, R. P., T. Brunner, S. B. Lazarchik, N. J. Yoo, M. F. Boehm, D. R. Green, and R. A. Heyman.** 1995. 9-cis retinoic acid inhibition of activation-induced apoptosis is mediated via regulation of fas ligand and requires retinoic acid receptor and retinoid X receptor activation. *Mol.Cell.Biol.* **15**:5576-5585.

45. **Blok, L. J., P. E. de Ruiter, and A. O. Brinkmann.** 1998. Forskolin-induced dephosphorylation of the androgen receptor impairs ligand binding. *Biochemistry* **37**:3850-3857.
46. **Blumberg, B. and R. M. Evans.** 1998. Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev.* **12**:3149-3155.
47. **Bockers, T. M., J. Bockmann, J. D. Fauteck, W. Wittkowski, B. A. Sabel, and M. R. Kreutz.** 1996. Evidence for gene transcription of adenohipophyseal hormones in the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinol.* **63**:16-27.
48. **Bodner, M., J. L. Castrillo, L. E. Theill, T. Deerinck, M. Ellisman, and M. Karin.** 1988. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* **55**:505-518.
49. **Bohen, S. P. and K. R. Yamamoto.** 1993. Isolation of Hsp90 mutants by screening for decreased steroid receptor function. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **90**:11424-11428.
50. **Boileau, G., C. Barbeau, L. Jeannotte, M. Chrétien, and J. Drouin.** 1983. Complete structure of the porcine pro-opiomelanocortin mRNA derived from the nucleotide sequence of cloned cDNA. *Nucleic Acids Res.* **11**:8063-8071.
51. **Bollag, R. J., Z. Siegfried, J. A. Cebra-Thomas, N. Garvey, E. M. Davison, Silver, and LM.** 1994. An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the T locus. *Nat.Genet.* **7**:383-389.
52. **Bommer, M., A. Benecke, H. Gronemeyer, and C. Rochette-Egly.** 2002. TIF2 mediates the synergy between RARalpha 1 activation functions AF-1 and AF-2. *J Biol.Chem.* **277**:37961-37966.
53. **Bonnet, C., S. Marinesco, G. Debilly, V. Kovalzon, and R. Cespuoglio.** 2000. Influence of a 1-h immobilization stress on sleep and CLIP (ACTH(18-39)) brain contents in adrenalectomized rats. *Brain Res.* **853**:323-329.
54. **Borud, B., T. Hoang, M. Bakke, A. L. Jacob, J. Lund, and G. Mellgren.** 2002. The nuclear receptor coactivators p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and transcription intermediary factor 2 (TIF2) differentially regulate PKA-stimulated transcriptional activity of steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol* **16**:757-773.
55. **Boston, B. A.** 1999. The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **885**:75-84.
56. **Bousquet, C. and S. Melmed.** 1999. Critical role for STAT3 in murine pituitary adrenocorticotropin hormone leukemia inhibitory factor signaling. *J.Biol.Chem.* **274**:10723-10730.

57. **Bousquet, C., D. W. Ray, and S. Melmed.** 1997. A common pro-opiomelanocortin-binding element mediates leukemia inhibitory factor and corticotropin-releasing hormone transcriptional synergy. *J.Biol.Chem.* **272**:10551-10557.
58. **Bousquet, C., M. C. Zatelli, and S. Melmed.** 2000. Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J.Clin.Invest* **106**:1417-1425.
59. **Boutillier, A. L., C. Gaiddon, D. Lorang, J. L. Roberts, and J. P. Loeffler.** 1998. Transcriptional activation of the proopiomelanocortin gene by cyclic AMP-responsive element binding protein. *Pituitary* **1**:33-43.
60. **Boutillier, A. L., D. Monnier, D. Lorang, J. R. Lundblad, J. L. Roberts, and J. P. Loeffler.** 1995. Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1. *Mol.Endocrinol.* **9**:745-755.
61. **Bradford, A. P., C. Wasylyk, B. Wasylyk, and A. Gutierrez-Hartmann.** 1997. Interaction of Ets-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression  
7626. *Mol.Cell Biol.* **17**:1065-1074.
62. **Brown, P. and A. S. McNeilly.** 1997. Steroidogenic factor-1 (SF-1) and the regulation of expression of luteinising hormone and follicle stimulating hormone b-subunits in the sheep anterior pituitary in vivo. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **29**:1513-1524.
63. **Buono, P., S. Cassano, A. Alfieri, A. Mancini, and F. Salvatore.** 2002. Human aldolase C gene expression is regulated by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) in PC12 cells. *Gene* **291**:115-121.
64. **Burbelo, P. D., A. Utani, Z. Q. Pan, and Y. Yamada.** 1993. Cloning of the large subunit of activator 1 (replication factor C) reveals homology with bacterial DNA ligases. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **90**:11543-11547.
65. **Calnan, B. J., S. Szychowski, F. K. Chan, D. Cado, and A. Winoto.** 1995. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* **3**:273-282.
66. **Camp, H. S., S. R. Tafuri, and T. Leff.** 1999. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology* **140**:392-397.
67. **Carapeti, M., R. C. Aguiar, J. M. Goldman, and N. C. Cross.** 1998. A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood* **91**:3127-3133.

68. **Carreira, S., T. J. Dexter, U. Yavuzer, D. J. Easty, and C. R. Goding.** 1998. Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol.Cell.Biol.* **18**:5099-5108.
69. **Carvalho, P. and G. Aguilera.** 1989. Protein kinase C mediates the effect of vasopressin in pituitary corticotrophs. *Mol.Endocrinol.* **3**:1935-1943.
70. **Casey, E. S., M. A. O'Reilly, F. L. Conlon, and J. C. Smith.** 1998. The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. *Development* **125**:3887-3894.
71. **Castillo, S. O., J. S. Baffi, M. Palkovits, D. S. Goldstein, I. J. Kopin, J. Witta, M. A. Magnuson, and V. M. Nikodem.** 1998. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol.Cell.Neurosci.* **11**:36-46.
72. **Castrillo, J. L., L. E. Theill, and M. Karin.** 1991. Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* **253**:197-199.
73. **Castro, D. S., M. Arvidsson, M. Bondesson Bolin, and T. Perlmann.** 1999. Activity of Nurr1 carboxyl-terminal domain depends on cell type and integrity of the activation function 2. *J.Biol.Chem.* **274**:37483-37490.
74. **Castro, M. G. and E. Morrison.** 1997. Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev.Neurobiol.* **11**:35-57.
75. **Cau, E., G. Gradwohl, C. Fode, and F. Guillemot.** 1997. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* **124**:1611-1621.
76. **Chakravarti, D., V. J. LaMorte, M. C. Nelson, T. Nakajima, I. G. Schulman, H. Juguilon, M. Montminy, and R. M. Evans.** 1996. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**:99-103.
77. **Challis, J. R., D. Sloboda, S. G. Matthews, A. Holloway, N. Alfaidy, F. A. Patel, W. Whittle, M. Fraser, T. J. Moss, and J. Newnham.** 2001. The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol.Cell Endocrinol.* **185**:135-144.
78. **Chang, S. F. and B. C. Chung.** 1995. Difference in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes. *Mol.Endocrinol.* **9**:1330-1336.
79. **Charron, J. and J. Drouin.** 1986. Glucocorticoid inhibition of transcription from episomal proopiomelanocortin gene promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **83**:8903-8907.

80. **Chastrette, N., R. Cespuglio, and M. Jouvet.** 1990. Proopiomelanocortin (POMC)-derived peptides and sleep in the rat. Part 1--Hypnogenic properties of ACTH derivatives. *Neuropeptides* **15**:61-74.
81. **Chauchereau, A., L. Amazit, M. Quesne, A. Guiochon-Mantel, and E. Milgrom.** 2003. Sumoylation of the Progesterone Receptor and of the Steroid Receptor Coactivator SRC-1. *J.Biol.Chem.* **278**:12335-12343.
82. **Chen, D., P. E. Pace, R. C. Coombes, and S. Ali.** 1999. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol.Cell.Biol.* **19**:1002-1015.
83. **Chen, H., R. J. Lin, W. Xie, D. Wilpitz, and R. M. Evans.** 1999. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**:675-686.
84. **Chen, J. D. and R. M. Evans.** 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**:454-457.
85. **Chen, S. L., D. H. Dowhan, B. M. Hosking, and G. E. Muscat.** 2000. The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C- dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* **14**:1209-1228.
86. **Chen, S. L., S. C. M. Wang, B. Hosking, and G. E. O. Muscat.** 2001. Subcellular localization of the steroid receptor coactivators (SRCs) and MEF2 in muscle and rhabdomyosarcoma cells. *Mol.Endocrinol.* **15**:783-796.
87. **Chen, S. L., Y. J. Chang, Y. H. Wu, and K. H. Lin.** 2003. Mitogen-Activated Protein Kinases Potentiate Thyroid Hormone Receptor Transcriptional Activity by Stabilizing Its Protein. *Endocrinology* **144**:1407-1419.
88. **Cheng, L. E. C., F. K. M. Chan, D. Cado, and A. Winoto.** 1997. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* **16**:1865-1875.
89. Chesley P. Development of the short-tailed mutant in the house mouse. *J Exp Zool* **70**, 429-459. 1935.
90. **Childs, G. V. and G. Unabia.** 1989. Activation of protein kinase C and L calcium channels enhances binding of biotinylated corticotropin-releasing hormone by anterior pituitary corticotropes. *Mol.Endocrinol.* **3**:117-126.
91. **Chrivia, J. C., R. P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy, and R. H. Goodman.** 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**:855-859.
92. **Cibelli, G., P. Corsi, G. Diana, F. Vitiello, and G. Thiel.** 2001. Corticotropin-releasing factor triggers neurite outgrowth of a catecholaminergic immortalized



- neuron via cAMP and MAP kinase signalling pathways. *Eur.J Neurosci.* **13**:1339-1348.
93. **Civelli, O., N. Birnberg, and E. Herbert.** 1982. Detection and quantification of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J.Biol.Chem.* **257**:6783-6787.
  94. **Clark, A. J., P. M. Lavender, P. Coates, M. R. Johnson, and L. H. Rees.** 1990. In vitro and in vivo analysis of the processing and fate of the peptide products of the short proopi melanocortin mRNA. *Mol.Endocrinol.* **4**:1737-1743.
  95. **Clarke, D., U. Fearon, S. K. Cunningham, and T. J. McKenna.** 1996. The steroidogenic effects of beta-endorphin and joining peptide: a potential role in the modulation of adrenal androgen production. *J.Endocrinol.* **151**:301-307.
  96. **Coleman, K. M., M. Dutertre, A. El Gharbawy, B. G. Rowan, N. L. Weigel, and C. L. Smith.** 2003. Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor-alpha (ER alpha)- and ER beta-dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s). *J Biol.Chem.* **278**:12834-12845.
  97. **Coleman, K. M., M. Dutertre, A. El Gharbawy, B. G. Rowan, N. L. Weigel, and C. L. Smith.** 2003. Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor-alpha (ER alpha)- and ER beta-dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s). *J Biol.Chem.* **278**:12834-12845.
  98. **Coleman, K. M. and C. L. Smith.** 2001. Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci.* **6**:D1379-D1391.
  99. **Conlon, F. L., L. Fairclough, B. M. Price, E. S. Casey, and J. C. Smith.** 2001. Determinants of T box protein specificity. *Development* **128**:3749-3758.
  100. **Conneely, O. M., K. Satyamoorthy, O. Saucedo-Cardenas, and F. De Mayo.** 1997. Neurodevelopmental role of the orphan nuclear receptor, Nurr1, abstr. 79th Annual Meeting, The Endocrine Society.
  101. **Cortright, D. N., K. A. Goosens, J. Shonee Lesh, and A. F. Seasholtz.** 1997. Isolation and Characterization of the Rat Corticotropin-Releasing Hormone (CRH)-Binding Protein Gene: Transcriptional Regulation by Cyclic Adenosine Monophosphate and CRH. *Endocrinology* **138**:2098-2108.
  102. **Couly, G. F. and N. M. Le Douarin.** 1985. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev.Biol.* **110**:422-439.

103. **Crawford, P. A., J. A. Polish, G. Ganpule, and Y. Sadovsky.** 1997. The activation function-2 hexamer of steroidogenic factor-1 is required, but not sufficient for potentiation by SRC-1. *Mol.Endocrinol.* **11**:1626-1635.
104. **Crawford, P. A., Y. Sadovsky, K. Woodson, S. L. Lee, and J. Milbrandt.** 1995. Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. *Mol.Cell.Biol.* **15**:4331-16.
105. **Daikoku, S., M. Chikamori, T. Adachi, and Y. Maki.** 1982. Effect of the basal diencephalon on the development of Rathke's pouch in rats: a study in combined organ cultures. *Dev.Biol.* **90**:198-202.
106. **Daikoku, S., H. Kawano, K. Abe, and K. Yoshinaga.** 1981. Topographical appearance of adenohypophysial cells with special reference to the development of the portal system. *Arch.Histol.Jpn.* **44**:103-116.
107. **Daikoku, S., Y. Okamura, H. Kawano, Y. Tsuruo, M. Maegawa, and T. Shibasaki.** 1984. Immunohistochemical study on the development of CRF-containing neurons in the hypothalamus of the rat. *Cell Tissue Res.* **238**:539-544.
108. **Dasen, J. S., J. P. Barbera, T. S. Herman, S. O. Connell, L. Olson, B. Ju, J. Tollkuhn, S. H. Baek, D. W. Rose, and M. G. Rosenfeld.** 2001. Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev.* **15**:3193-3207.
109. **Dasen, J. S., S. M. O'Connell, S. E. Flynn, M. Treier, Gleiberman, AS, D. P. Szeto, F. Hooshmand, A. K. Aggarwal, and M. G. Rosenfeld.** 1999. Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* **97**:587-598.
110. **Dattani, M. T., J. P. Martinez-Barbera, P. Q. Thomas, J. M. Brickman, R. Gupta, I. L. Martensson, H. Toresson, M. Fox, J. K. Wales, P. C. Hindmarsh, S. Krauss, R. S. Beddington, and I. C. Robinson.** 1998. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat.Genet.* **19**:125-133.
111. **Davis, I. J., T. G. Hazel, R. H. Chen, J. Blenis, and L. F. Lau.** 1993. Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Mol.Endocrinol.* **7**:953-964.
112. **Davis, I. J. and L. F. Lau.** 1994. Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol.Cell.Biol.* **14**:3469-3483.
113. **Dayanithi, G. and F. A. Antoni.** 1989. Rapid as well as delayed inhibitory effects of glucocorticoid hormones on pituitary adrenocorticotrophic hormone

- release are mediated by type II glucocorticoid receptors and require newly synthesized messenger ribonucleic acid as well as protein. *Endocrinology* **125**:308-313.
114. **de Keyzer, Y., X. Bertagna, J. P. Luton, and A. Kahn.** 1989. Variable modes of pro-opiomelanocortin gene transcription in human tumors. *Mol.Endocrinol.* **3**:215-223.
  115. **De Moerlooze, L., B. Spencer-Dene, J. Revest, M. Hajihosseini, I. Rosewell, and C. Dickson.** 2000. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* **127**:483-492.
  116. **de Mora, J. F. and M. Brown.** 2000. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol.Cell.Biol.* **20**:5041-5047.
  117. **De Wied, D. and J. M. Van Ree.** 1987. Non-opiate effects of neuropeptides derived from beta-endorphin. *Pol.J.Pharmacol.Pharm.* **39**:623-632.
  118. **DeYoung, R. A., J. C. Baker, D. Cado, and A. Winoto.** 2003. The orphan steroid receptor nur77 family member nor-1 is essential for early mouse embryogenesis. *J Biol.Chem.* **278**:47104-47109.
  119. **Dobrenski, A. F., A. S. Zeft, A. Wellstein, and A. T. Riegel.** 1993. DNA binding of the transcription factor PO-B is regulated during differentiation of HL-60 cells. *Cell Growth Differ.* **4**:647-656.
  120. Dobrovolskaïa-Zavadskaa N. Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère héréditaire "non-viable". *C R Soc Biol* 97, 114-116. 1927.
  121. **Driever, W. and C. Nusslein-Volhard.** 1989. The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **337**:138-143.
  122. **Drouin, J.** 1993. Répression transcriptionnelle : glucocorticoïdes et pro-opiomélanocortine. *médecine/sciences* **9**:509-517.
  123. **Drouin, J., M. Chamberland, J. Charron, L. Jeannotte, and M. Nemer.** 1985. Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *FEBS Lett.* **193**:54-58.
  124. **Drouin, J. and H. M. Goodman.** 1980. Most of the coding region of rat ACTH beta-LPH precursor gene lacks intervening sequences. *Nature* **288**:610-613.
  125. **Drouin, J., C. Lanctôt, and J. J. Tremblay.** 1998. La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *médecine/sciences* **14**:335-339.

126. **Drouin, J., M. H. Maira, and A. Philips.** 1998. Novel mechanism of action for Nur77 and antagonism by glucocorticoids: a convergent mechanism for CRH activation and glucocorticoid repression of POMC gene transcription. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **65**:59-63.
127. **Drouin, J., Y. L. Sun, M. Chamberland, Y. Gauthier, A. De Léan, M. Nemer, and T. J. Schmidt.** 1993. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.* **12**:145-156.
128. **Drouin, J., M. A. Trifiro, R. K. Plante, M. Nemer, P. Eriksson, and Ö. Wrangé.** 1989. Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol.Cell.Biol.* **9**:5305-5314.
129. **Durocher, D., F. Charron, R. Warren, R. J. Schwartz, and M. Nemer.** 1997. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* **16**:5687-5696.
130. **Duval, D. L., S. E. Nelson, and C. M. Clay.** 1997. A binding site for steroidogenic factor-1 is part of a complex enhancer that mediates expression of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Biol.Reprod.* **56**:160-168.
131. **Eberwine, J. H., J. A. Jonassen, M. J. Evinger, and J. L. Roberts.** 1987. Complex transcriptional regulation by glucocorticoids and corticotropin-releasing hormone of proopi melanocortin gene expression in rat pituitary cultures. *DNA* **6**:483-492.
132. **Egea, P. F., B. P. Klaholz, and D. Moras.** 2000. Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett.* **476**:62-67.
133. **elAmraoui, A. and P. M. Dubois.** 1993. Experimental evidence for the early commitment of the presumptive adenohypophysis. *Neuroendocrinol.* **58**:609-615.
134. **Enmark, E. and J. A. Gustafsson.** 1996. Orphan nuclear receptors - the first eight years. *Mol.Endocrinol.* **10**:1293-1307.
135. **Ericson, J., S. Norlin, T. M. Jessell, and T. Edlund.** 1998. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* **125**:1005-1015.
136. **Fahrner, T. J., S. L. Carroll, and J. Milbrandt.** 1990. The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Mol.Cell.Biol.* **10**:6454-6459.

137. **Fernandez, P. M., F. Brunel, M. A. Jimenez, J. M. Saez, Cereghini, S, and M. M. Zakin.** 2000. Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* **141**:2392-2400.
138. **Font, d. M. and M. Brown.** 2000. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol.* **20**:5041-5047.
139. **Forman, B. M., I. Tzamelis, H. S. Choi, J. Chen, D. Simha, W. Seol, R. M. Evans, and D. D. Moore.** 1998. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* **395**:612-615.
140. **Forman, B. M., K. Umesono, J. Chen, and R. M. Evans.** 1995. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **81**:541-550.
141. **Freiman, R. N. and R. Tjian.** 2003. Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell* **112**:11-17.
142. **Froeschle, A., S. Alric, M. Kitzmann, G. Carnac, F. Aurade, C. Rochette-Egly, and A. Bonniou.** 1998. Retinoic acid receptors and muscle b-HLH proteins: partners in retinoid-induced myogenesis. *Oncogene* **16**:3369-3378.
143. **Fu, M., C. Wang, J. Wang, X. Zhang, T. Sakamaki, Y. G. Yeung, C. Chang, T. Hopp, S. A. W. Fuqua, E. Jaffray, R. T. Hay, J. J. Palvimo, O. A. Janne, and R. G. Pestell.** 2002. Androgen Receptor Acetylation Governs trans Activation and MEKK1-Induced Apoptosis without Affecting In Vitro Sumoylation and trans-Repression Function. *Mol.Cell.Biol.* **22**:3373-3388.
144. **Gage, P. J., M. L. Brinkmeier, L. M. Scarlett, L. T. Knapp, S. A. Camper, and K. A. Mahon.** 1996. The ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of *rpx* transcription and initiation of lineage-specific cell proliferation. *Mol.Endocrinol.* **10**:1570-1581.
145. **Gage, P. J. and S. A. Camper.** 1997. Pituitary homeobox 2, a novel member of the *bicoid*-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum.Mol.Genet.* **6**:457-464.
146. **Gage, P. J., H. Y. Suh, and S. A. Camper.** 1999. Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development* **126**:4643-4651.
147. **Gagner, J.-P. and J. Drouin.** 1985. Opposite regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. *Mol.Cell.Endocrinol.* **40**:25-32.
148. **Gagner, J.-P. and J. Drouin.** 1987. Tissue-specific regulation of pituitary proopiomelanocortin gene transcription by corticotropin-releasing hormone, 3',

- 5'-cyclic adenosine monophosphate, and glucocorticoids. *Mol.Endocrinol.* **1**:677-682.
149. **Gaillard, R. C., A. Grossman, G. Gillies, L. H. Rees, and G. M. Besser.** 1981. Angiotensin II stimulates the release of ACTH from dispersed rat anterior pituitary cells. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **15**:573-578.
150. **Galleguillos, D., A. Vecchiola, J. A. Fuentealba, V. Ojeda, K. Alvarez, A. Gomez, and M. E. Andres.** 2003. PIAS $\gamma$  represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nurr1. *J Biol.Chem.*
151. **Gelman, L., G. Zhou, L. Fajas, E. Raspe, J. C. Fruchart, Auwerx, and J.** 1999. p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPAR $\gamma$ 2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. *J.Biol.Chem.* **274**:7681-7688.
152. **Gerhardstein, B. L., T. S. Puri, A. J. Chien, and M. M. Hosey.** 1999. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* **38**:10361-10370.
153. **Gerrero, M. R., R. J. McEvelly, E. Turner, C. R. Lin, S. O'Connell, K. J. Jenne, M. V. Hobbs, and M. G. Rosenfeld.** 1993. Brn-3.0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune, and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**:10841-10845.
154. **Gianni, M., A. Bauer, E. Garattini, P. Chambon, and C. Rochette-Egly.** 2002. Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR $\{\gamma\}$  degradation and transactivation. *The EMBO Journal* **21**:3760-3769.
155. **Giguere, V.** 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr.Rev.* **20**:689-725.
156. **Giguère, V., J. Côté, and F. Labrie.** 1981. Characteristics of the alpha-adrenergic stimulation of adrenocorticotropin secretion in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **109**:757-762.
157. **Giguere, V. and F. Labrie.** 1982. Vasopressin potentiates cyclic AMP accumulation and ACTH release induced by corticotropin-releasing factor (CRF) in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* **111**:1752-1754.
158. **Giguère, V., F. Labrie, J. Côté, D. H. Coy, J. Sueras-Diaz, and A. V. Schally.** 1982. Stimulation of cyclic AMP accumulation and corticotropin release by synthetic ovine corticotropin-releasing factor in rat anterior pituitary cells: site of glucocorticoid action. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **79**:3466-3469.

159. **Giguere, V., L. D. McBroom, and G. Flock.** 1995. Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol Cell Biol.* **15**:2517-2526.
160. **Giguère, V., N. Yang, P. Segui, and R. M. Evans.** 1988. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* **331**:91-94.
161. **Gillies, G. E., E. A. Linton, and P. J. Lowry.** 1982. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* **299**:355-357.
162. **Girdwood, D., D. Bumpass, O. A. Vaughan, A. Thain, L. A. Anderson, A. W. Snowden, E. Garcia-Wilson, N. D. Perkins, and R. T. Hay.** 2003. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* **11**:1043-1054.
163. **Glass, C. K.** 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr.Rev.* **15**:391-407.
164. Gluecksohn-Schoenheimer S. The development of two tailless mutants in the house mouse. *Genetics* **23**, 573-584. 1938.
165. **Good, D. J., F. D. Porter, K. A. Mahon, A. F. Parlow, H. Westphal, and I. R. Kirsch.** 1997. Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the *Nhlh2* gene. *Nat.Genet.* **15**:397-401.
166. **Gordon, D. F., S. R. Lewis, B. R. Haugen, R. A. James, M. T. Mcdermott, W. M. Wood, and E. C. Ridgway.** 1997. Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin  $\beta$ -subunit promoter. *J.Biol.Chem.* **272**:24339-24347.
167. **Grammatopoulos, D. K. and G. P. Chrousos.** 2002. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* **13**:436-444.
168. **Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos, and P. Chambon.** 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**:134-139.
169. Gruneberg H. Genetical studies on the skeleton of the mouse. XXIII. The development of Brachyury and Anury. *J embryol Exp Morph* **6**, 424-443. 1958.
170. **Guild, S. B. and G. Cramb.** 1999. Characterisation of the effects of natriuretic peptides upon ACTH secretion from the mouse pituitary. *Mol.Cell Endocrinol.* **152**:11-19.

171. **Gulyas, M., L. Pusztaï, G. Rappay, and G. B. Makara.** 1991. Pituitary corticotrophs proliferate temporarily after adrenalectomy. *Histochemistry* **96**:185-189.
172. **Halvorson, L. M., U. B. Kaiser, and W. W. Chin.** 1996. Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1. *J.Biol.Chem.* **271**:6645-6650.
173. **Hammer, G. D., V. Fairchild-Huntress, and M. J. Low.** 1990. Pituitary-specific and hormonally regulated gene expression directed by the rat proopiomelanocortin promoter in transgenic mice. *Mol.Endocrinol.* **4**:1689-1697.
174. **Hammer, G. D., I. Krylova, Y. Zhang, B. D. Darimont, K. Simpson, N. L. Weigel, and H. A. Ingraham.** 1999. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol.Cell* **3**:521-526.
175. **Hatton, G. I.** 1999. Astroglial modulation of neurotransmitter/peptide release from the neurohypophysis: present status. *J.Chem.Neuroanat.* **16**:203-221.
176. **Hazel, T. G., R. Misra, I. J. Davis, M. E. Greenberg, and L. F. Lau.** 1991. Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment. *Mol.Cell.Biol.* **11**:3239-3246.
177. **Hazel, T. G., D. Nathans, and L. F. Lau.** 1988. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**:8444-8448.
178. **Heery, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M. G. Parker.** 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**:733-736.
179. **Hentze, M. W. and A. E. Kulozik.** 1999. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* **96**:307-310.
180. **Hermanson, E., B. Joseph, D. Castro, E. Lindqvist, P. Aarnisalo, a. Wallen, G. Benoit, B. Hengerer, L. Olson, and T. Perlmann.** 2003. Nurr1 regulates dopamine synthesis and storage in MN9D dopamine cells. *Exp.Cell Res* **288**:324-334.
181. **Hermesz, E., S. Mackem, and K. A. Mahon.** 1996. Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* **122**:41-52.



182. **Herrmann, B. G., S. Labeit, A. Poustka, T. R. King, and H. Lehrach.** 1990. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* **343**:617-622.
183. **Hevner, R. F., L. Shi, N. Justice, Y. Hsueh, M. Sheng, S. Smiga, A. Bulfone, A. M. Goffinet, A. T. Campagnoni, and J. L. Rubenstein.** 2001. *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* **29**:353-366.
184. **Hirata, Y., K. Kiuchi, H. C. Chen, J. Milbrandt, and G. Guroff.** 1993. The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *J.Biol.Chem.* **268**:24808-24812.
185. **Hirata, Y., M. Whalin, D. D. Ginty, J. Xing, M. E. Greenberg, J. Milbrandt, and G. Guroff.** 1995. Induction of a nerve growth factor-sensitive kinase that phosphorylates the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *J.Neurochem.* **65**:1780-1788.
186. **Hittelman, A. B., D. Burakov, J. A. Iniguez-Lluhi, and L. P. Freedman.** 1999. Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J.* **18**:5380-5388.
187. **Hollenberg, S. M., C. Weinberger, E. S. Ong, G. Cerelli, A. Oro, R. Lebo, E. B. Thompson, M. G. Rosenfeld, and R. M. Evans.** 1985. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**:635-641.
188. **Hong, S. H. and M. L. Privalsky.** 2000. The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Mol Cell Biol.* **20**:6612-6625.
189. **Hong, S. H. and M. L. Privalsky.** 2000. The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Mol.Cell Biol.* **20**:6612-6625.
190. **Hong, S., S. J. Park, H. J. Kong, J. D. Shuman, and J. Cheong.** 2001. Functional Interaction of bZIP Proteins and the Large Subunit of Replication Factor C in Liver and Adipose Cells. *J.Biol.Chem.* **276**:28098-28105.
191. **Honkaniemi, J., J. Kononen, T. Kainu, I. Pyykonen, and M. Pelto-Huikko.** 1994. Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress. *Brain Res.* **25**:234-241.
192. **Horlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass, and et al.** 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**:397-404.

193. **Howard, P. W. and R. A. Maurer.** 1995. A composite Ets/Pit-1 binding site in the prolactin gene can mediate transcriptional responses to multiple signal transduction pathways. *J.Biol.Chem.* **270**:20930-20936.
194. **Hsueh, Y. P., T. F. Wang, F. C. Yang, and M. Sheng.** 2000. Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* **404**:298-302.
195. **Hsueh, Y. P., T. F. Wang, F. C. Yang, and M. Sheng.** 2000. Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* **404**:298-302.
196. **Hu, X. and M. A. Lazar.** 1999. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* **402**:93-96.
197. **Ingraham, H. A., R. Chen, H. J. Mangalam, H. P. Elsholtz, S. E. Flynn, C. R. Lin, D. M. Simmons, L. Swanson, and M. G. Rosenfeld.** 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* **55**:519-529.
198. **Ishaq, M., G. DeGray, and V. Natarajan.** 2003. Protein Kinase C {theta} Modulates Nuclear Receptor-Corepressor Interaction during T Cell Activation. *J.Biol.Chem.* **278**:39296-39302.
199. **Israel, A. and S. N. Cohen.** 1985. Hormonally mediated negative regulation of human pro-opiomelanocortin gene expression after transfection into mouse L cells. *Mol.Cell.Biol.* **5**:2443-2453.
200. **Ito, M., Y. Park, J. Weck, K. E. Mayo, and J. L. Jameson.** 2000. Synergistic activation of the inhibin alpha-promoter by steroidogenic factor-1 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Mol Endocrinol* **14**:66-81.
201. **Ito, M., R. N. Yu, and J. L. Jameson.** 1998. Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol.Endocrinol.* **12**:290-301.
202. **Itoh, M., M. Adachi, H. Yasui, M. Takekawa, H. Tanaka, and K. Imai.** 2002. Nuclear Export of Glucocorticoid Receptor is Enhanced by c-Jun N-Terminal Kinase-Mediated Phosphorylation. *Mol.Endocrinol.* **16**:2382-2392.
203. **Iwata, M., M. Mukai, Y. Nakai, and R. Iseki.** 1992. Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes. *J.Immunol.* **149**:3302-3308.
204. **Iyer, V. R., M. B. Eisen, D. T. Ross, G. Schuler, T. Moore, J. C. F. Lee, J. M. Trent, L. M. Staudt, J. Hudson, M. S. Boguski, D. Lashkari, D. Shalon, D. Botstein, and P. O. Brown.** 1999. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* **283**:83-87.

205. **Jacob, A. L. and J. Lund.** 1998. Mutations in the activation function-2 core domain of steroidogenic factor-1 dominantly suppresses PKA-dependent transactivation of the bovine CYP17 gene. *J Biol.Chem.* **273**:13391-13394.
206. **Japon, M. A., M. Rubinstein, and M. J. Low.** 1994. In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J.Histochem.Cytochem.* **42**:1117-1125.
207. **Jeannotte, L., J. P. H. Burbach, and J. Drouin.** 1987. Unusual proopiomelanocortin ribonucleic acids in extrapituitary tissues: intronless transcripts in testes and long poly(A) tails in hypothalamus. *Mol.Endocrinol.* **1**:749-757.
208. **Jeannotte, L., M. A. Trifiro, R. K. Plante, M. Chamberland, and J. Drouin.** 1987. Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter. *Mol.Cell.Biol.* **7**:4058-4064.
209. **Jehn, B. M., W. Bielke, W. S. Pear, and B. A. Osborne.** 1999. Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J.Immunol.* **162**:635-638.
210. **Jepsen, K., O. Hermanson, T. M. Onami, A. S. Gleiberman, V. Lunyak, R. J. McEvilly, R. Kurokawa, V. Kumar, F. Liu, E. Seto, S. M. Hedrick, G. Mandel, C. K. Glass, D. W. Rose, and M. G. Rosenfeld.** 2000. Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* **102**:753-763.
211. **Jepsen, K. and M. G. Rosenfeld.** 2002. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci* **115**:689-698.
212. **Jin, W. D., A. L. Boutillier, M. J. Glucksman, S. R. Salton, Loeffler, JP, and J. L. Roberts.** 1994. Characterization of a corticotropin-releasing hormone-responsive element in the rat proopiomelanocortin gene promoter and molecular cloning of its binding protein. *Mol.Endocrinol.* **8**:1377-1388.
213. **Jin, Y., R. M. Surabhi, A. Fresnoza, A. Lytras, and P. A. Cattini.** 1999. A role for A/T-rich sequences and Pit-1/GHF-1 in a distal enhancer located in the human growth hormone locus control region with preferential pituitary activity in culture and transgenic mice. *Mol.Endocrinol.* **13**:1249-1266.
214. **Joseph, S. B. and P. Tontonoz.** 2003. LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Current Opinion in Pharmacology* **3**:192-197.
215. **Kalkhoven, E., J. E. Valentine, D. M. Heery, and M. G. Parker.** 1998. Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO J* **17**:232-243.

216. **Kalkhoven, E., J. H. Roelfsema, H. Teunissen, A. den Boer, Y. Ariyurek, A. Zantema, M. H. Breuning, R. C. M. Hennekam, and D. J. M. Peters.** 2003. Loss of CBP acetyltransferase activity by PHD finger mutations in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum.Mol.Genet.* **12**:441-450.
217. **Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzl, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S. C. Lin, R. A. Heyman, D. W. Rose, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**:403-414.
218. **Kang, H. J., M. R. Song, S. K. Lee, E. C. Shin, Y. H. Choi, S. J. Kim, J. W. Lee, and M. O. Lee.** 2000. Retinoic acid and its receptors repress the expression and transactivation functions of Nur77: A possible mechanism for the inhibition of apoptosis by retinoic acid. *Exp.Cell Res.* **256**:545-554.
219. **Kasagi, Y., N. Horiba, K. Sakai, Y. Fukuda, and T. Suda.** 2002. Involvement of cAMP-response element binding protein in corticotropin-releasing factor (CRF)-induced down-regulation of CRF receptor 1 gene expression in rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol.* **14**:587-592.
220. **Katagiri, Y., Y. Hirata, J. Milbrandt, and G. Guroff.** 1997. Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor. *J.Biol.Chem.* **272**:31278-31284.
221. **Katagiri, Y., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Ozato, and G. Guroff.** 2000. Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat.Cell Biol.* **2**:435-440.
222. **Katahira, M., Y. Iwasaki, Y. Aoki, Y. Oiso, and H. Saito.** 1998. Cytokine Regulation of the Rat Proopiomelanocortin Gene Expression in AtT-20 Cells. *Endocrinology* **139**:2414.
223. **Katzenellenbogen, B. S., M. M. Montano, T. R. Ediger, J. Sun, K. Ekena, G. Lazennec, P. G. Martini, E. M. McInerney, R. Delage-Mourroux, K. Weis, and J. A. Katzenellenbogen.** 2000. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res* **55**:163-193.
224. **Kaufman, M. H.** 1992. *The Atlas of Mouse Development.* Academic Press, San Diego USA.
225. **Kawamura, K. and S. Kikuyama.** 1992. Evidence that hypophysis and hypothalamus constitute a single entity from the primary stage of histogenesis. *Development* **115**:1-9.
226. **Kawamura, K. and S. Kikuyama.** 1998. Morphogenesis of the hypothalamus and hypophysis: their association, dissociation and reassociation before and after "Rathke". *Arch.Histol.Cytol.* **61**:189-198.

227. **Keegan, C. E. and S. A. Camper.** 2003. Mouse knockout solves endocrine puzzle and promotes new pituitary lineage model. *Genes Dev.* **17**:677-682.
228. **Keri, R. A. and J. H. Nilson.** 1996. A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone beta subunit promoter in gonadotropes of transgenic mice. *J.Biol.Chem.* **271**:10782-10785.
229. **Kim, J. H., J. M. Auerbach, J. A. Rodriguez-Gomez, I. Velasco, D. Gavin, N. Lumelsky, S. H. Lee, J. Nguyen, R. Sanchez-Pernaute, K. Bankiewicz, and R. McKay.** 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**:50-56.
230. **Kim, K. S., C. H. Kim, D. Y. Hwang, H. Seo, S. Chung, S. J. Hong, J. K. Lim, T. Anderson, and O. Isacson.** 2003. Orphan nuclear receptor Nurr1 directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. *J Neurochem.* **85**:622-634.
231. **Kioussi, C., S. O'Connell, L. St Onge, M. Treier, A. S. Gleiberman, P. Gruss, and M. G. Rosenfeld.** 1999. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**:14378-14382.
232. **Kispert, A. and B. G. Herrmann.** 1993. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein [published erratum appears in *EMBO J* 1993 Dec;12(12):4898-9]. *EMBO J.* **12**:3211-3220.
233. **Kispert, A., B. Koschorz, and B. G. Herrmann.** 1995. The T protein encoded by *Brachyury* is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J.* **14**:4763-4772.
234. **Kliwer, S. A., K. Umesono, D. J. Noonan, R. A. Heyman, and R. M. Evans.** 1992. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**:771-774.
235. **Knutti, D., D. Kressler, and A. Kralli.** 2001. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **98**:9713-9718.
236. **Kolk, S. M., B. M. Kramer, L. N. Cornelisse, W. J. Scheenen, B. G. Jenks, and E. W. Roubos.** 2002. Multiple control and dynamic response of the *Xenopus* melanotrope cell. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **132**:257-268.
237. **Kotaja, N., U. Karvonen, O. A. Janne, and J. J. Palvimo.** 2002. The Nuclear Receptor Interaction Domain of GRIP1 Is Modulated by Covalent Attachment of SUMO-1. *J.Biol.Chem.* **277**:30283-30288.

238. **Kouki, T., H. Imai, K. Aoto, K. Eto, S. Shioda, K. Kawamura, and S. Kikuyama.** 2001. Developmental origin of the rat adenohypophysis prior to the formation of Rathke's pouch. *Development* **128**:959-963.
239. **Kovalovsky, D., D. Refojo, A. C. Liberman, D. Hochbaum, M. P. Pereda, O. A. Coso, G. K. Stalla, F. Holsboer, and E. Arzt.** 2002. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol.Endocrinol.* **16**:1638-1651.
240. **Kovalovsky, D., D. Refojo, A. C. Liberman, D. Hochbaum, M. P. Pereda, O. A. Coso, G. K. Stalla, F. Holsboer, and E. Arzt.** 2002. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol.Endocrinol.* **16**:1638-1651.
241. **Kovalovsky, D., D. Refojo, A. C. Liberman, D. Hochbaum, M. P. Pereda, O. A. Coso, G. K. Stalla, F. Holsboer, and E. Arzt.** 2002. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol.Endocrinol.* **16**:1638-1651.
242. **Kovalovsky, D., D. Refojo, A. C. Liberman, D. Hochbaum, M. P. Pereda, O. A. Coso, G. K. Stalla, F. Holsboer, and E. Arzt.** 2002. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* **16**:1638-1651.
243. **Kovalovsky, D., D. Refojo, A. C. Liberman, D. Hochbaum, M. P. Pereda, O. A. Coso, G. K. Stalla, F. Holsboer, and E. Arzt.** 2002. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol.Endocrinol.* **16**:1638-1651.
244. **Kraus, J., M. Buchfelder, and V. Holtt.** 1993. Regulatory elements of the human proopiomelanocortin gene promoter. *DNA Cell Biol.* **12**:527-536.
245. **Kraus, J. and V. Holtt.** 1995. Identification of a cAMP-response element on the human proopiomelanocortin gene upstream promoter. *DNA Cell Biol.* **14**:103-110.
246. **Krude, H., H. Biebermann, W. Luck, R. Horn, G. Brabant, and A. Gruters.** 1998. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat.Genet.* **19**:155-157.
247. **Kuchenbauer, F., U. Hopfner, J. Stalla, E. Arzt, G. K. Stalla, and M. Paez-Pereda.** 2001. Extracellular matrix components regulate ACTH production and proliferation in corticotroph tumor cells *Mol.Cell Endocrinol.* **175**:141-148.

248. **Kung, A. L., V. I. Rebel, R. T. Bronson, L. E. Ch'ng, C. A. Sieff, D. M. Livingston, and T. P. Yao.** 2000. Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev.* **14**:272-277.
249. **Kurokawa, R., J. DiRenzo, M. Boehm, J. Sugarman, B. Gloss, M. G. Rosenfeld, R. A. Heyman, and C. K. Glass.** 1994. Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* **371**:528-531.
250. **Kuryshv, Y. A., G. V. Childs, and A. K. Ritchie.** 1995. Corticotropin-releasing hormone stimulation of Ca<sup>2+</sup> entry in corticotropes is partially dependent on protein kinase A. *Endocrinology* **136**:3925-3935.
251. **Kuryshv, Y. A., G. V. Childs, and A. K. Ritchie.** 1995. Three high threshold calcium channel subtypes in rat corticotropes. *Endocrinology* **136**:3916-3924.
252. **Kuryshv, Y. A., G. V. Childs, and A. K. Ritchie.** 1996. Corticotropin-releasing hormone stimulates Ca<sup>2+</sup> entry through L- and P-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat corticotropes. *Endocrinology* **137**:2269-2277.
253. **Kyriakis, J. M.** 2000. MAP kinases and the regulation of nuclear receptors. *Sci STKE.* **2000**:E1.
254. **Laabich, A., G. Li, and N. G. F. Cooper.** 2002. Enhanced expression of TNF-R1 protein in NMDA-mediated cell death in the retina. *Molecular Brain Research* **109**:239-246.
255. **Labrie, F., R. Veilleux, G. Lefevre, D. H. Coy, J. Sueiras-Diaz, and A. V. Schally.** 1982. Corticotropin-releasing factor stimulates accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate in rat pituitary corticotrophs. *Science* **216**:1007-1008.
256. **Lacaze-Masmonteil, T., Y. de Keyzer, J. P. Luton, A. Kahn, and X. Bertagna.** 1987. Characterization of pro-opiomelanocortin transcription in human non-pituitary tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**:7261-7265.
257. **Laflamme, C., C. Filion, J. A. Bridge, M. Ladanyi, M. B. Goldring, and Y. Labelle.** 2003. The homeotic protein Six3 is a coactivator of the nuclear receptor NOR-1 and a corepressor of the fusion protein EWS/NOR-1 in human extraskelatal myxoid chondrosarcomas. *Cancer Res* **63**:449-454.
258. **Lamolet, B., A. M. Pulichino, T. Lamonerie, Y. Gauthier, T. Brue, A. Enjalbert, and J. Drouin.** 2001. A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* **104**:849-859.

259. **Lamonerie, T., J. J. Tremblay, C. Lanctôt, M. Therrien, Y. Gauthier, and J. Drouin.** 1996. PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* **10**:1284-1295.
260. **Lanctôt, C., B. Lamolet, and J. Drouin.** 1997. The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**:2807-2817.
261. **Lanctôt, C., A. Moreau, M. Chamberland, M. L. Tremblay, and J. Drouin.** 1999. Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* **126**:1805-1810.
262. **Lanz, R. B., N. J. McKenna, S. A. Onate, U. Albrecht, J. Wong, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley.** 1999. A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* **97**:17-27.
263. **Lassar, A. B., R. L. Davis, W. E. Wright, T. Kadesch, C. Murre, A. Voronova, D. Baltimore, and H. Weintraub.** 1991. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* **66**:305-315.
264. **Lau, L. F. and D. Nathans.** 1985. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J.* **4**:3145-3151.
265. **Law, S. W., O. M. Conneely, F. J. DeMayo, and B. W. O'Malley.** 1992. Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol.Endocrinol.* **6**:2129-2135.
266. **Lazaro, J. B., P. J. Bailey, and A. B. Lassar.** 2002. Cyclin D-cdk4 activity modulates the subnuclear localization and interaction of MEF2 with SRC-family coactivators during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* **16**:1792-1805.
267. **Lazennec, G., J. A. Thomas, and B. S. Katzenellenbogen.** 2001. Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **77**:193-203.
268. **Le Drean, Y., N. Mincheneau, P. Le Goff, and D. Michel.** 2002. Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* **143**:3482-3489.
269. **Le, W. D., P. Xu, J. Jankovic, H. Jiang, S. H. Appel, R. G. Smith, and D. K. Vassilatis.** 2003. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat.Genet.* **33**:85-89.



270. **Leblond-Francillard, M., A. Picon, X. Bertagna, and Y. de Keyzer.** 1997. High expression of the POU factor Brn3a in aggressive neuroendocrine tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**:89-94.
271. **Lee, H. Y., Y. A. Suh, M. J. Robinson, J. L. Clifford, W. K. Hong, J. R. Woodgett, M. H. Cobb, D. J. Mangelsdorf, and J. M. Kurie.** 2000. Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor. *J Biol.Chem.* **275**:32193-32199.
272. **Lee, J. E., S. M. Hollenberg, L. Snider, D. L. Turner, N. Lipnick, and H. Weintraub.** 1995. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* **268**:836-844.
273. **Lee, K. A.** 1991. Transcriptional regulation by cAMP. *Curr.Opin.Cell Biol.* **3**:953-959.
274. **Lee, S. L., Y. Sadovsky, A. H. Swirnoff, J. A. Polish, P. Goda, G. Gavriline, and J. Milbrandt.** 1996. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (*Egr-1*). *Science* **273**:1219-1221.
275. **Lee, S. L., R. L. Wesselschmidt, G. P. Linette, O. Kanagawa, J. H. Russell, and J. Milbrandt.** 1995. Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (*NUR77*). *Science* **269**:532-535.
276. **Lee, S. K., S. L. Anzick, J. E. Choi, L. Bubendorf, X. Y. Guan, Y. K. Jung, O. P. Kallioniemi, J. Kononen, J. M. Trent, D. Azorsa, B. H. Jhun, J. H. Cheong, Y. C. Lee, P. S. Meltzer, and J. W. Lee.** 1999. A Nuclear Factor, ASC-2, as a Cancer-amplified Transcriptional Coactivator Essential for Ligand-dependent Transactivation by Nuclear Receptors in Vivo. *J.Biol.Chem.* **274**:34283-34293.
277. **Leo, C. and J. D. Chen.** 2000. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* **245**:1-11.
278. **Leo, C. and J. D. Chen.** 2000. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* **245**:1.
279. **Leo, C. and J. D. Chen.** 2000. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* **245**:1.
280. **Li, C. H., L. Barnafi, M. Chretien, and D. Chung.** 1965. Isolation and amino-acid sequence of beta-LPH from sheep pituitary glands. *Nature* **208**:1093-1094.
281. **Li, H., S. K. Kolluri, J. Gu, M. I. Dawson, X. H. Cao, P. D. Hobbs, B. Z. Lin, G. Q. Chen, L. S. Lu, F. Lin, Z. H. Xie, J. A. Fontana, J. C. Reed, and X. k. Zhang.** 2000. Cytochrome c release and apoptosis induced by

- mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* **289**:1159-1164.
282. **Li, M., G. Pascual, and C. K. Glass.** 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol.Cell.Biol.* **20**:4699-4707.
283. **Li, S., E. B. I. Crenshaw, E. J. Rawson, D. M. Simmons, L. W. Swanson, and M. G. Rosenfeld.** 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* **347**:528-533.
284. **Li, X. Y., M. Boudjelal, J. H. Xiao, Z. H. Peng, A. Asuru, S. Kang, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees.** 1999. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases nuclear vitamin D3 receptors by blocking ubiquitin/proteasome-mediated degradation in human skin. *Mol Endocrinol* **13**:1686-1694.
285. **Li, Y. and L. F. Lau.** 1997. Adrenocorticotropin hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation. *Endocrinology* **138**:4138-4146.
286. **Licinio, J., P. B. Bongiorno, P. W. Gold, and M. L. Wong.** 1995. The gene encoding for the novel transacting factor proopiomelanocortin corticotropin-releasing hormone responsive element binding protein 1 (PCRH-REB-1) is constitutively expressed in rat pituitary and in discrete brain regions containing CRH or CRH receptors: pathophysiological implications. *Endocrinology* **136**:4709-4712.
287. **Lin, C. R., C. Kioussi, S. O'Connell, P. Briata, D. Szeto, R. Liu, J. C. Izpisua Belmonte, and M. G. Rosenfeld.** 1999. Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* **401**:279-282.
288. **Lin, H. H., Z. J. Tu, and D. K. Ann.** 1996. Involvement of nuclear orphan receptor NGFI-B in transcriptional activation of salivary-specific R15 gene by cAMP. *J.Biol.Chem.* **271**:27637-27644.
289. **Lin, J. T., J. M. Kornhauser, N. P. Singh, K. E. Mayo, and J. S. Takahashi.** 1997. Visual sensitivities of nur77 (NGFI-B) and zif268 (NGFI-A) induction in the suprachiasmatic nucleus are dissociated from c-fos induction and behavioral phase-shifting responses. *Brain Res. Molecular Brain Research.* **46**:303-310.
290. **Lingbeek, M. E., J. J. Jacobs, and M. van Lohuizen.** 2002. The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator. *J.Biol.Chem.* **277**:26120-26127.
291. **Link, H., G. Dayanithi, K. J. Fohr, and M. Gratzl.** 1992. Oxytocin at physiological concentrations evokes adrenocorticotropin (ACTH) release from corticotrophs by increasing intracellular free calcium mobilized mainly from

- intracellular stores. Oxytocin displays synergistic or additive effects on ACTH-releasing factor or arginine vasopressin-induced ACTH secretion, respectively. *Endocrinology* **130**:2183-2191.
292. **Lis, M., J. Julesz, J. Gutkowska, and J. Genest.** 1982. Corticotropin-releasing activity of alpha-melanotropin. *Science* **215**:675-677.
293. **Liu, B., G. D. Hammer, M. Rubinstein, M. Mortrud, and M. J. Low.** 1992. Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary gland of transgenic mice. *Mol.Cell.Biol.* **12**:3978-3990.
294. **Liu, B., M. Mortrud, and M. J. Low.** 1995. DNA elements with AT-rich core sequences direct pituitary cell-specific expression of the pro-opiomelanocortin gene in transgenic mice. *Biochem.J.* **312 ( Pt 3)**:827-832.
295. **Liu, J., C. Lin, A. Gleiberman, K. A. Ohgi, T. Herman, H. P. Huang, M. J. Tsai, and M. G. Rosenfeld.** 2001. Tbx19, a tissue-selective regulator of POMC gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:8674-8679.
296. **Liu, Z. G., S. W. Smith, K. A. McLaughlin, L. M. Schwartz, and B. A. Osborne.** 1994. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* **367**:281-284.
297. **LOH, Y. P., A. L. E. X. MALDONADO, C. H. U. N. ZHANG, W. H. TAM, and N. I. A. M. CAWLEY.** 2002. Mechanism of Sorting Proopiomelanocortin and Proenkephalin to the Regulated Secretory Pathway of Neuroendocrine Cells. *Ann NY Acad Sci* **971**:416.
298. **Lonard, D. M., Z. Nawaz, C. L. Smith, and B. W. O'Malley.** 2000. The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell* **5**:939-948.
299. **Loven, M. A., V. S. Likhite, I. Choi, and A. M. Nardulli.** 2001. Estrogen response elements alter coactivator recruitment through allosteric modulation of estrogen receptor beta conformation. *J Biol.Chem.* **276**:45282-45288.
300. **Lugo, D. I. and J. E. Pintar.** 1996. Ontogeny of basal and regulated secretion from POMC cells of the developing anterior lobe of the rat pituitary gland. *Dev.Biol.* **173**:95-109.
301. **Luini, A., D. Lewis, S. Guild, D. Corda, and J. Axelrod.** 1985. Hormone secretagogues increase cytosolic calcium by increasing cAMP in corticotropin-secreting cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**:8034-8038.
302. **Lundblad, J. R. and J. L. Roberts.** 1988. Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocr.Rev.* **9**:135-158.

303. **Mains, R. E., B. A. Eipper, and N. Ling.** 1977. Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**:3014-3018.
304. **Mains, R. E., B. A. Eipper, and N. Ling.** 1977. Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **74**:3014-3018.
305. **Maira, M. H., C. Martens, E. Batsche, Y. Gauthier, and J. Drouin.** 2003. Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol.Cell.Biol.* **23**:in press.
306. **Maira, M. H., C. Martens, A. Philips, and J. Drouin.** 1999. Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol.Cell.Biol.* **19**:7549-7557.
307. **Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans.** 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**:841-850.
308. **Mangelsdorf, D. J., E. S. Ong, J. A. Dyck, and R. M. Evans.** 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* **345**:224-229.
309. **Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and et al.** 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**:835-839.
310. **Marmorstein, R. and M. X. Fitzgerald.** 2003. Modulation of DNA-binding domains for sequence-specific DNA recognition. *Gene* **304**:1-12.
311. **Martens, C., M. H. Maira, S. Bilodeau, Y. Gauthier, and J. Drouin.** 2002. Protein:protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol.Endocrinol.* **Submitted**.
312. **Massaad, C., N. Houard, M. Lombes, and R. Barouki.** 1999. Modulation of human mineralocorticoid receptor function by protein kinase A. *Mol.Endocrinol.* **13**:57-65.
313. **Masuyama, N., K. Oishi, Y. Mori, T. Ueno, Y. Takahama, and Y. Gotoh.** 2001. Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis. *J.Biol.Chem.* **276**:32799-32805.
314. **McBroom, L. D., G. Flock, and V. Giguere.** 1995. The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions. *Mol Cell Biol.* **15**:796-808.

315. **McKenna, N. J., R. B. Lanz, and B. W. O'Malley.** 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr.Rev.* **20**:321-344.
316. **McKenna, N. J., Z. Nawaz, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley.** 1998. Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **95**:11697-11702.
317. **McKenna, N. J., Z. Nawaz, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley.** 1998. Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:11697-11702.
318. **McKenna, N. J. and B. W. O'Malley.** 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**:465-474.
319. **McKenna, N. J. and B. W. O'Malley.** 2002. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* **143**:2461-2465.
320. **McNally, J. G., W. G. Iler, D. Walker, R. Wolford, and G. L. Hager.** 2000. The Glucocorticoid Receptor: Rapid Exchange with Regulatory Sites in Living Cells. *Science* **287**:1262-1265.
321. **Meinke, G. and P. B. Sigler.** 1999. DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. *Nat.Struct.Biol.* **6**:471-477.
322. **Mellon, S. H., J. E. Shively, and W. L. Miller.** 1991. Human proopiomelanocortin-(79-96), a proposed androgen stimulatory hormone, does not affect steroidogenesis in cultured human fetal adrenal cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **72**:19-22.
323. **Milbrandt, J.** 1988. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* **1**:183-188.
324. **Mishina, M., T. Kurosaki, Y. Yamamoto, M. Notake, M. Masu, and S. Numa.** 1982. DNA sequences required for transcription in vivo of the human corticotropin-b-lipotropin precursor gene. *EMBO J.* **1**:1533-1538.
325. **Miyazaki, K., T. Reisine, and J. W. Kebabian.** 1984. Adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase activity in rodent pituitary tissue: possible role in cAMP-dependent hormone secretion. *Endocrinology* **115**:1933-1945.
326. **Molloy, E. S., D. M. Clarke, U. M. Fearon, S. K. Cunningham, and T. J. McKenna.** 1998. Non-ACTH POMC fragments stimulate aldosterone production by human adrenal cells in vitro. *Steroids* **63**:459-463.
327. **Montano, M. M., K. Ekena, R. Delage-Mourroux, W. Chang, P. Martini, and B. S. Katzenellenbogen.** 1999. An estrogen receptor-selective coregulator

that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *PNAS* **96**:6947-6952.

328. **Morand, I., P. Fonlupt, A. Guerrier, J. Trouillas, A. Calle, C. Remy, B. Rousset, and Y. Munari-Silem.** 1996. Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology* **137**:3356-3367.
329. **Morishita, M., Y. Iwasaki, E. Yamamori, A. Nomura, N. Mutsuga, M. Yoshida, M. Asai, Y. Oiso, and H. Saito.** 2000. Antidiabetic Sulfonylurea Enhances Secretagogue-Induced Adrenocorticotropin Secretion and Proopiomelanocortin Gene Expression in Vitro. *Endocrinology* **141**:3313.
330. **Morris, M. E., N. Viswanathan, S. Kuhlman, F. C. Davis, and C. J. Weitz.** 1998. A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science* **279**:1544-1547.
331. **Mu, X. and C. Chang.** 2003. TR3 Orphan Nuclear Receptor Mediates Apoptosis through Up-regulating E2F1 in Human Prostate Cancer LNCaP Cells. *J.Biol.Chem.* **278**:42840-42845.
332. **Mucchielli, M. L., S. Martinez, A. Pattyn, C. Goridis, and J. F. Brunet.** 1996. *Otlx2*, an *Otx*-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol.Cell.Neurosci.* **8**:258-271.
333. **Muglia, L., L. Jacobson, P. Dikkes, and J. A. Majzoub.** 1995. Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature* **373**:427-432.
334. **Muller, C. W. and B. G. Herrmann.** 1997. Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature* **389**:884-888.
335. **Murphy, E. P. and O. M. Conneely.** 1997. Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the *nurr1/nur77* subfamily of nuclear receptors. *Mol.Endocrinol.* **11**:39-47.
336. **Mutoh, H., B. P. Fung, F. J. Naya, M. J. Tsai, J. Nishitani, and A. B. Leiter.** 1997. The basic helix-loop-helix transcription factor *beta2/neurod* is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**:3560-3564.
337. **Mynard, V., L. Guignat, J. Devin-Leclerc, X. Bertagna, and M. G. Catelli.** 2002. Different mechanisms for leukemia inhibitory factor-dependent activation of two proopiomelanocortin promoter regions. *Endocrinology* **143**:3916-3924.
338. **Naar, A. M., B. D. Lemon, and R. Tjian.** 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Annu.Rev.Biochem.* **70**:475-501.

339. **Nakai, Y., T. Usui, T. Tsukada, H. Takahashi, J. Fukata, M. Fukushima, K. Senoo, and H. Imura.** 1991. Molecular mechanisms of glucocorticoid inhibition of human proopiomelanocortin gene transcription. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**:301-306.
340. **Nakanishi, S., A. Inoue, T. Kita, M. Nakamura, A. C. Y. Chang, S. N. Cohen, and S. Numa.** 1979. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* **278**:423-427.
341. **Naya, F. J., C. M. M. Stellrecht, and M. J. Tsai.** 1995. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* **9**:1009-1019.
342. **Nemeskeri, A., G. Setalo, and B. Halasz.** 1988. Ontogenesis of the three parts of the fetal rat adenohypophysis. A detailed immunohistochemical analysis. *Neuroendocrinol.* **48**:534-543.
343. **Newell-Price, J.** 2003. Proopiomelanocortin gene expression and DNA methylation: implications for Cushing's syndrome and beyond. *J. Endocrinol.* **177**:365-372.
344. **Newell-Price, J., P. King, and A. J. Clark.** 2001. The CpG island promoter of the human proopiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression. *Mol. Endocrinol.* **15**:338-348.
345. **Nilaweera, K. N., C. Ellis, P. Barrett, J. G. Mercer, and P. J. Morgan.** 2002. Hypothalamic bHLH transcription factors are novel candidates in the regulation of energy balance. *Eur. J. Neurosci.* **15**:644-650.
346. **Nordeen, S. K.** 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *BioTechniques* **6**:454-456.
347. **Notake, M., T. Kurosaki, T. Yamamoto, H. Handa, M. Mishina, and S. Numa.** 1983. Sequence requirement for transcription in vitro of the human corticotropin/beta-lipotropin precursor gene. *Eur. J. Biochem.* **133**:599-605.
348. **Notake, M., T. Tobimatsu, Y. Watanabe, H. Takahashi, M. Mishina, and S. Numa.** 1983. Isolation and characterization of the mouse corticotropin-beta-lipotropin precursor gene and a related pseudogene. *FEBS Lett.* **156**:67-71.
349. **Nudi, M., E. Batsche, and J. Drouin.** 2001. Ontogeny of the pituitary corticotroph system, p. 1-26. *In* R. C. Gaillard and S. Melmed (ed.), *THE ACTH BOOK*. Kluwer Academic Publishers, New York.
350. **Nussdorfer, G. G. and L. K. Malendowicz.** 1998. Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides* **19**:1443-1467.

351. **Oates, E. and E. Herbert.** 1983. 5' Sequence of porcine and rat pro-opiomelanocortin mRNA. *J.Biol.Chem.* **259**:7421-7425.
352. **Ohkura, N., M. Hijikuro, A. Yamamoto, and K. Miki.** 1994. Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **205**:1959-1965.
353. **Ohkura, N., T. Hosono, K. Maruyama, T. Tsukada, and K. Yamaguchi.** 1999. An isoform of Nurr1 functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. *Biochim.Biophys.Acta* **1444**:69-79.
354. **Ohkura, N., M. Ito, T. Tsukada, K. Sasaki, K. Yamaguchi, and K. Miki.** 1998. Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene* **211**:79-85.
355. **Ohkura, N., T. Ohkubo, K. Maruyama, T. Tsukada, and K. Yamaguchi.** 2001. The orphan nuclear receptor NOR-1 interacts with the homeobox containing protein Six3. *Dev.Neurosci.* **23**:17-24.
356. **Ohuchi, H., Y. Hori, M. Yamasaki, H. Harada, K. Sekine, S. Kato, and N. Itoh.** 2000. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **277**:643-649.
357. **Oki, Y., W. E. Nicholson, and D. N. Orth.** 1990. Role of protein kinase-C in the adrenocorticotropin secretory response to arginine vasopression (AVP) and the synergistic response to AVP and corticotropin-releasing factor by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **127**:350-357.
358. **Onate, S. A., V. Boonyaratankornkit, T. E. Spencer, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, D. P. Edwards, and B. W. O'Malley.** 1998. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J.Biol.Chem.* **273**:12101-12108.
359. **Ordentlich, P., Y. Yan, S. Zhou, and R. A. Heyman.** 2003. Identification of the antineoplastic agent 6-mercaptopurine as an activator of the orphan nuclear hormone receptor Nurr1. *J Biol.Chem.* **278**:24791-24799.
360. **Oyama, K., N. Sanno, A. Teramoto, and R. Y. Osamura.** 2001. Expression of neuro D1 in human normal pituitaries and pituitary adenomas. *Mod.Pathol.* **14**:892-899.
361. **Packham, E. A. and J. D. Brook.** 2003. T-box genes in human disorders. *Hum.Mol.Genet.* **12**:R37-R44.
362. **Palomino, T., D. Baretino, and A. Aranda.** 1998. Role of GHF-1 in the regulation of the rat growth hormone gene promoter by thyroid hormone and retinoic acid receptors 7625. *J.Biol.Chem.* **273**:27541-27547.



363. **Palomino, T., A. Sanchez-pacheco, P. Pena, and A. Aranda.** 1998. A direct protein-protein interaction is involved in the cooperation between thyroid hormone and retinoic acid receptors and the transcription factor GHF-1. *The FASEB Journal* **12**:1201-1209.
364. **Papayioannou, V. E.** 2001. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int.Rev.Cytol.* **207**:1-70.
365. **Papayioannou, V. E. and L. M. Silver.** 1998. The T-box gene family. *Bioessays* **20**:9-19.
366. **Parker, K. L., D. A. Rice, D. S. Lala, Y. Ikeda, X. Luo, M. Wong, M. Bakke, L. Zhao, C. Frigeri, N. A. Hanley, N. Stallings, and B. P. Schimmer.** 2002. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog.Horm.Res.* **57**:19-36.
367. **Parker, K. L., D. A. Rice, D. S. Lala, Y. Ikeda, X. Luo, M. Wong, M. Bakke, L. Zhao, C. Frigeri, N. A. Hanley, N. Stallings, and B. P. Schimmer.** 2002. Steroidogenic Factor 1: an Essential Mediator of Endocrine Development. *Recent Prog Horm Res* **57**:19-36.
368. **Parkes, D., S. Rivest, S. Lee, C. Rivier, and W. Vale.** 1993. Corticotropin-releasing factor activates c-fos, NGFI-B, and corticotropin-releasing factor gene expression within the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Mol.Endocrinol.* **7**:1357-1367.
369. **Passier, R., H. Zeng, N. Frey, F. J. Naya, R. L. Nicol, T. A. McKinsey, P. Overbeek, J. A. Richardson, S. R. Grant, and E. N. Olson.** 2000. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J.Clin.Invest.* **105**:1395-1406.
370. **Paulsen, R. E., K. Granas, H. Johnsen, V. Rolseth, and S. Sterri.** 1995. Three related brain nuclear receptors, NGFI-B, Nurr1, and NOR-1, as transcriptional activators. *J.Mol.Neurosci.* **6**:249-255.
371. **Paulsen, R. E., C. A. Weaver, T. J. Fahrner, and J. Milbrandt.** 1992. Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B. *J.Biol.Chem.* **267**:16491-16496.
372. **Pekarsky, Y., C. Hallas, A. Palamarchuk, A. Koval, F. Bullrich, Y. Hirata, R. Bichi, J. Letofsky, and C. M. Croce.** 2001. Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:3690-3694.
373. **Pennaneach, V., I. Salles-Passador, A. Munshi, H. Brickner, K. Regazzoni, F. Dick, N. Dyson, T. T. Chen, J. Y. Wang, R. Fotedar, and A. Fotedar.** 2001. The large subunit of replication factor C promotes cell survival after DNA damage in an LxCxE motif- and Rb-dependent manner. *Mol Cell* **7**:715-727.

374. **Perlmann, T. and L. Jansson.** 1995. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* **9**:769-782.
375. **Pernasetti, F., S. P. Toledo, V. V. Vasilyev, C. Y. Hayashida, J. D. Cogan, C. Ferrari, D. M. Lourenco, and P. L. Mellon.** 2000. Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a two-base pair deletion (301-302delAG) in the prophet of Pit-1 gene. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**:390-397.
376. **Petersen, H. V., J. N. Jensen, R. Stein, and P. Serup.** 2002. Glucose induced MAPK signalling influences NeuroD1-mediated activation and nuclear localization. *FEBS Lett.* **528**:241-245.
377. **Pfaff, S. L., M. Mendelsohn, C. L. Stewart, T. Edlund, Jessell, and TM.** 1996. Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**:309-320.
378. **Pflugfelder, G. O., H. Roth, and B. Poeck.** 1992. A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **186**:918-925.
379. **Philips, A., S. Lesage, R. Gingras, M. H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo, and J. Drouin.** 1997. Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol.Cell.Biol.* **17**:5946-5951.
380. **Philips, A., M. H. Maira, A. Mullick, M. Chamberland, S. Lesage, P. Hugo, and J. Drouin.** 1997. Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol.Cell.Biol.* **17**:5952-5959.
381. **Picard, F., M. Gehin, J. Annicotte, S. Rocchi, M. F. Champy, B. W. O'Malley, P. Chambon, and J. Auwerx.** 2002. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* **111**:931-941.
382. **Pichon, B., G. Vassart, and D. Christophe.** 1999. A canonical nerve growth factor-induced gene-B response element appears not to be involved in the cyclic adenosine monophosphate-dependent expression of differentiation in thymocytes. *Mol.Cell.Endocrinol.* **154**:21-27.
383. **Ponnio, T., Q. Burton, F. A. Pereira, D. K. Wu, and O. M. Conneely.** 2002. The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. *Mol Cell Biol.* **22**:935-945.
384. **Porter, J. R. and L. D. Sander.** 1981. The effect of cholecystokinin octapeptide on pituitary-adrenal hormone secretion. *Regul.Pept.* **2**:245-252.

385. **Poukka, H., U. Karvonen, O. A. Janne, and J. J. Palvimo.** 2000. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *PNAS* **97**:14145-14150.
386. **Poulin, G., M. Lebel, M. Chamberland, F. W. Paradis, and J. Drouin.** 2000. Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol.Cell.Biol.* **20**:4826-4837.
387. **Poulin, G., B. Turgeon, and J. Drouin.** 1997. NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol.Cell.Biol.* **17**:6673-6682.
388. **Pritchard, L. E., A. V. Turnbull, and A. White.** 2002. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J.Endocrinol.* **172**:411-421.
389. **Pulichino, A. M., S. Vallette-Kasic, C. Couture, Y. Gauthier, T. Brue, M. David, G. Malpuech, C. Deal, G. Van Vliet, M. De Vroede, F. G. Riepe, C. J. Partsch, W. G. Sippell, M. Berberoglu, B. Atasay, and J. Drouin.** 2002. Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* **In press**.
390. **Pulichino, A. M., S. Vallette-Kasic, C. Couture, Y. Gauthier, T. Brue, M. David, G. Malpuech, C. Deal, G. Van Vliet, M. De Vroede, F. G. Riepe, C. J. Partsch, W. G. Sippell, M. Berberoglu, B. Atasay, and J. Drouin.** 2003. Human and mouse Tpit gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* **17**:711-716.
391. **Pulichino, A. M., S. Vallette-Kasic, J. P. Y. Tsai, C. Couture, Y. Gauthier, and J. Drouin.** 2003. Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev* **17**:738-747.
392. **Pulichino, A. M., S. Vallette-Kasic, J. P. Y. Tsai, Y. Gauthier, and J. Drouin.** 2002. Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev* **in press**.
393. **Quirk, C. C., K. L. Lozada, R. A. Keri, and J. H. Nilson.** 2001. A single Pitx1 binding site is essential for activity of the LHBeta promoter in transgenic mice. *Mol.Endocrinol.* **15**:734-746.
394. **Qutob, M. S., R. N. Bhattacharjee, E. Pollari, S. P. Yee, and J. Torchia.** 2002. Microtubule-dependent subcellular redistribution of the transcriptional coactivator p/CIP. *Mol.Cell.Biol.* **22**:6611-6626.
395. **Rangarajan, P. N., K. Umesono, and R. M. Evans.** 1992. Modulation of glucocorticoid receptor function by protein kinase A. *Mol.Endocrinol.* **6**:1451-1457.

396. **Ray, D. W., S. G. Ren, and S. Melmed.** 1996. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J.Clin.Invest* **97**:1852-1859.
397. **Ray, D. W., S. G. Ren, and S. Melmed.** 1996. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Stimulates Proopiomelanocortin (POMC) Expression in a Corticotroph Cell Line . Role of STAT Pathway. *J.Clin.Invest.* **97**:1852.
398. **Reichardt, H. M., K. H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel, and G. Schutz.** 1998. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**:531-541.
399. **Reid, G., M. R. Hubner, R. Metivier, H. Brand, S. Denger, D. Manu, J. Beaudouin, J. Ellenberg, and F. Gannon.** 2003. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* **11**:695-707.
400. **Reisine, T. and R. Jensen.** 1986. Cholecystokinin-8 stimulates adrenocorticotropin release from anterior pituitary cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **236**:621-626.
401. **Reisine, T., G. Rougon, J. Barbet, and H. U. Affoter.** 1985. Corticotropin-releasing factor-induced adrenocorticotropin-hormone release and synthesis is blocked by incorporation of the inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase into anterior pituitary tumor cells by liposomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**:8261-8265.
402. **Richter, W. O. and P. Schwandt.** 1987. Lipolytic potency of proopiomelanocorticotropin peptides in vitro. *Neuropeptides* **9**:59-74.
403. **Riegel, A. T., Y. Lu, J. Remenick, R. G. Wolford, D. S. Berard, and G. L. Hager.** 1991. Proopiomelanocortin gene promoter elements required for constitutive and glucocorticoid-repressed transcription. *Mol.Endocrinol.* **5**:1973-1982.
404. **Riegel, A. T., J. Remenick, R. G. Wolford, D. S. Berard, and G. L. Hager.** 1990. A novel transcriptional activator (PO-B) binds between the TATA box and cap site of the pro-opiomelanocortin gene. *Nucleic Acids Res.* **18**:4513-4521.
405. **Roberts, J. L. and E. Herbert.** 1977. Characterization of a common precursor to corticotropin and beta-lipotropin: cell-free synthesis of the precursor and identifaciton of corticotropin peptides in the molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **74**:4826-4830.
406. **Robinson-Rechavi, M., G. H. Escriva, and V. Laudet.** 2003. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* **116**:585-586.

407. **Roby, D., A. P. Wolfe, and W. Wahli.** 2000. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol.Endocrinol.* **14**:329-347.
408. **Rogatsky, I., H. F. Luecke, D. C. Leitman, and K. R. Yamamoto.** 2002. Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:16701-16706.
409. **Rogatsky, I., K. A. Zaremb, and K. R. Yamamoto.** 2001. Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones. *EMBO J.* **20**:6071-6083.
410. **Roselli-Reh fuss, L., K. G. Mountjoy, L. S. Robbins, M. T. Mortrud, M. J. Low, J. B. Tatro, M. L. Entwistle, R. Simerly, R. B. Simerly, and R. D. Cone.** 1993. Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**:8856-8860.
411. **Rossant, C. J., R. D. Pinnock, J. Hughes, M. D. Hall, and S. McNulty.** 1999. Corticotropin-releasing factor type 1 and type 2alpha receptors regulate phosphorylation of calcium/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* **140**:1525-1536.
412. **Rowan, B. G., N. L. Weigel, and B. W. O'Malley.** 2000. Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J.Biol.Chem.* **275**:4475-4483.
413. **Roy-Chowdhury, J., J. Locker, and N. Roy-Chowdhury.** 2003. Nuclear receptors orchestrate detoxification pathways. *Dev.Cell* **4**:607-608.
414. **Rusak, B., L. McNaughton, H. A. Robertson, and S. P. Hunt.** 1992. Circadian variation in photic regulation of immediate-early gene mRNAs in rat suprachiasmatic nucleus cells. *Brain Res. Mol Brain Res* **14**:124-130.
415. **Sabshin, J. K.** 1987. The pituitary gland - anatomy and embryology, p. 19-27. *In* I. Goodrich and K. J. Lee (ed.), *The pituitary: clinical aspects of normal and abnormal function.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
416. **Sacchetti, P., L. A. Brownschidle, J. G. Granneman, and M. J. Bannon.** 1999. Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Molecular Brain Research* **74**:167-174.
417. **Sakurada, K., M. Ohshima-Sakurada, T. D. Palmer, and F. H. Gage.** 1999. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous

- tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* **126**:4017-4026.
418. **Samson, W. K., T. Murphy, and D. A. Schell.** 1995. A novel vasoactive peptide, adrenomedullin, inhibits pituitary adrenocorticotropin release. *Endocrinology* **136**:2349-2352.
419. **Saucedo-Cardenas, O. and O. M. Conneely.** 1996. Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J.Mol.Neurosci.* **7**:51-63.
420. **Saucedo-Cardenas, O., J. D. Quintana-Hau, W. D. Le, M. P. Smidt, J. J. Cox, F. DeMayo, J. P. H. Burbach, and O. M. Conneely.** 1998. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**:4013-4018.
421. **Schaaf, M. J. M. and J. A. Cidlowski.** 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **83**:37-48.
422. **Schaufele, F., B. L. West, and J. D. Baxter.** 1992. Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol.Endocrinol.* **6**:656-665.
423. **Schoenenberg, P., P. Kehrer, A. F. Muller, and R. C. Gaillard.** 1987. Angiotensin II potentiates corticotropin-releasing activity of CRF41 in rat anterior pituitary cells: mechanism of action. *Neuroendocrinol.* **45**:86-90.
424. **Schwind, J.** 1928. The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Am.J.Anat.* **41**:295-319.
425. **Scully, K. M., A. S. Gleiberman, J. Lindzey, D. B. Lubahn, K. S. Korach, and M. G. Rosenfeld.** 1997. Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol.Endocrinol.* **11**:674-681.
426. **Scully, K. M., E. M. Jacobson, K. Jepsen, V. Lunyak, H. Viadiu, C. Carriere, D. W. Rose, F. Hooshmand, A. K. Aggarwal, and M. G. Rosenfeld.** 2000. Allosteric effects of Pit-1 DNA sites on long-term repression in cell type specification. *Science* **290**:1127-1131.
427. **Scully, K. M. and M. G. Rosenfeld.** 2002. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* **295**:2231-2235.
428. **Seidah, N. G., M. Marcinkiewicz, S. Benjannet, L. Gaspar, G. Beaubien, M. G. Mattei, C. Lazure, M. Mbikay, and M. Chrétien.** 1991. Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and

- messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol.Endocrinol.* **5**:111-122.
429. **Semina, E. V., R. Reiter, N. J. Leysens, W. L. Alward, K. W. Small, N. A. Datson, J. Siegel-Bartelt, D. Bierke-Nelson, P. Bitoun, B. U. Zabel, J. C. Carey, and J. C. Murray.** 1996. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat.Genet.* **14**:392-399.
430. **Semina, E. V., R. S. Reiter, and J. Murray.** 1997. Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum.Mol.Genet.* **6**:2109-2116.
431. **Shao, D. and M. A. Lazar.** 1999. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* **103**:1617-1618.
432. **Shao, D., S. M. Rangwala, S. T. Bailey, S. L. Krakow, M. J. Reginato, and M. A. Lazar.** 1998. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* **396**:377-380.
433. **Sheng, H. Z., K. Moriyama, T. Yamashita, H. Li, S. S. Potter, K. A. Mahon, and H. Westphal.** 1997. Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* **278**:1809-1812.
434. **Sheng, H. Z., A. B. Zhadanov, B. Mosinger, T. Fujii, S. Bertuzzi, A. Grinberg, E. J. Lee, S. P. Huang, K. A. Mahon, and H. Westphal.** 1996. Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science* **272**:1004-1007.
435. **Shewchuk, B. M., S. L. Asa, N. E. Cooke, and S. A. Liebhaber.** 1999. Pit-1 binding sites at the somatotrope-specific DNase I hypersensitive sites I, II of the human growth hormone locus control region are essential for in vivo hGH-N gene activation. *J.Biol.Chem.* **274**:35725-35733.
436. **Shimon, I., X. Yan, D. W. Ray, and S. Melmed.** 1997. Cytokine-dependent gp130 receptor subunit regulates human fetal pituitary adrenocorticotropin hormone and growth hormone secretion. *J Clin Invest* **100**:357-363.
437. **Shipston, M. J.** Mechanism(s) of early glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion from anterior pituitary corticotropes. *Trends Endocrinol.Metab* **6**, 261-266. 1995.
438. **Simmons, D. M., J. W. Voss, H. A. Ingraham, J. M. Holloway, R. S. Broide, M. G. Rosenfeld, and L. W. Swanson.** 1990. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* **4**:695-711.

439. **Sinha, S., S. Abraham, R. M. Gronostajski, and C. E. Campbell.** 2000. Differential DNA binding and transcription modulation by three T-box proteins, T, TBX1 and TBX2. *Gene* **258**:15-29.
440. **Slominski, A. T., V. Botchkarev, M. Choudhry, N. Fazal, K. Fechner, J. Furkert, E. Krause, B. Roloff, M. Sayeed, E. Wei, B. Zbytek, J. Zipper, J. Wortsman, and R. Paus.** 1999. Cutaneous expression of CRH and CRH-R. Is there a "skin stress response system?". *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **885**:287-311.
441. **Smidt, M., H. S. A. van Schaick, C. Lanctôt, J. J. Tremblay, J. J. Cox, A. A. M. van der Kleij, G. Wolterink, J. Drouin, and P. H. Burbach.** 1997. A homeodomain gene *PTX3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**:13305-13310.
442. **Smith, A. I. and J. W. Funder.** 1988. Pro-opiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr.Rev.* **9**:159-179.
443. **Smith, J.** 1999. T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet.* **15**:154-158.
444. **Smith, S. T. and J. B. Jaynes.** 1996. A conserved region of engrailed, shared among all *en-*, *gsc-*, *Nk1-*, *Nk2-* and *msh-*class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* **122**:3141-3150.
445. **Sohn, Y. C., E. Kwak, Y. Na, J. W. Lee, and S. K. Lee.** 2001. Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors and activating signal cointegrator-2 as transcriptional coregulators of the orphan nuclear receptor *nur77*. *J.Biol.Chem.* **276**:43734-43739.
446. **Solomon, C., J. H. White, and R. Kremer.** 1999. Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-dependent signal transduction by phosphorylating human retinoid X receptor alpha. *J Clin Invest* **103**:1729-1735.
447. **Solomon, S.** 1999. POMC-derived peptides and their biological action. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **885**:22-40.
448. **Song, K. H., K. Lee, and H. S. Choi.** 2002. Endocrine disrupter bisphenol a induces orphan nuclear receptor *Nur77* gene expression and steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Endocrinology* **143**:2208-2215.
449. **Sornson, M. W., W. Wu, J. S. Dasen, S. E. Flynn, D. J. Norman, S. M. O'Connell, I. Gukovsky, C. Carriere, A. K. Ryan, A. P. Miller, L. Zuo, A. S. Gleiberman, B. Andersen, W. G. Beamer, and M. G. Rosenfeld.** 1996. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* **384**:327-333.



450. **Steiner, D. F., D. Cunningham, L. Spigelman, and B. Aten.** 1967. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* **157**:697-700.
451. **Steinmetz, A. C., J. P. Renaud, and D. Moras.** 2001. Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* **30**:329-359.
452. **Sugawara, T., J. A. Holt, M. Kiriakidou, and J. F. Strauss, III.** 1996. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* **35**:9052-9059.
453. **Suh, H., P. J. Gage, J. Drouin, and S. A. Camper.** 2002. *Pitx2* is required at multiple stages of pituitary organogenesis : pituitary primordium formation and cell specification. *Development* **129**:329-337.
454. **Swanson, K. D., L. K. Taylor, L. Haung, A. L. Burlingame, Landreth, and GE.** 1999. Transcription factor phosphorylation by pp90(rsk2). Identification of Fos kinase and NGFI-B kinase I as pp90(rsk2). *J.Biol.Chem.* **274**:3385-3395.
455. **Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher.** 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**:655-669.
456. **Szeto, D. P., C. Rodriguez-Esteban, A. K. Ryan, S. M. O'Connell, F. Liu, C. Kioussi, A. S. Gleiberman, J. C. Izpisua-Belmonte, and M. G. Rosenfeld.** 1999. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* **13**:484-494.
457. **Szeto, D. P., A. K. Ryan, S. M. O'Connell, and M. G. Rosenfeld.** 1996. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**:7706-7710.
458. **Takahashi, H., Y. Teranishi, S. Nakanishi, and S. Numa.** 1981. Isolation and structural organization of the human ACTH - b-LPH precursor gene. *FEBS Lett.* **135**:97-102.
459. **Takuma, N., H. Z. Sheng, Y. Furuta, J. M. Ward, K. Sharma, B. L. Hogan, S. L. Pfaff, H. Westphal, S. Kimura, and K. A. Mahon.** 1998. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* **125**:4835-4840.
460. **Terenius, L.** 1992. Opioid peptides, pain and stress. *Prog.Brain Res.* **92**:375-383.
461. **Texier, P. L., Y. de Keyzer, R. Lacave, D. Vieau, F. Lenne, A. Rojas-Miranda, J. M. Verley, J. P. Luton, A. Kahn, and X. Bertagna.** 1991. Proopiomelanocortin gene expression in normal and tumoral human lung. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **73**:414-420.

462. **Teyssier, C., K. Belguise, F. Galtier, and D. Chabos.** 2001. Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins. *J Biol.Chem.* **276**:36361-36369.
463. **Teyssier, C., K. Belguise, F. Galtier, and D. Chabos.** 2001. Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins. *J.Biol.Chem.* **276**:36361-36369.
464. **Therrien, M. and J. Drouin.** 1991. Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol.Cell.Biol.* **11**:3492-3503.
465. **Therrien, M. and J. Drouin.** 1993. Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol.Cell.Biol.* **13**:2342-2353.
466. **Timpl, P., R. Spanagel, I. Sillaber, A. Kresse, J. M. Reul, G. K. Stalla, V. Blanquet, T. Steckler, F. Holsboer, and W. Wurst.** 1998. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat.Genet.* **19**:162-166.
467. **Ting, Y. T., M. K. Bhat, R. Wong, and S. Cheng.** 1997. Tissue-specific stabilization of the thyroid hormone beta1 nuclear receptor by phosphorylation. *J Biol.Chem.* **272**:4129-4134.
468. **Treier, M., A. S. Gleiberman, S. M. O'Connell, D. P. Szeto, J. A. McMahon, A. P. McMahon, and M. G. Rosenfeld.** 1998. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* **12**:1691-1704.
469. **Treier, M., S. O'Connell, A. Gleiberman, J. Price, D. P. Szeto, R. Burgess, P. T. Chuang, A. P. McMahon, and M. G. Rosenfeld.** 2001. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* **128**:377-386.
470. **Tremblay, A., G. B. Tremblay, F. Labrie, and V. Giguere.** 1999. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol.Cell* **3**:513-519.
471. **Tremblay, G. B., A. Tremblay, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, F. Labrie, and V. Giguere.** 1997. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol.Endocrinol.* **11**:353-365.
472. **Tremblay, J. J. and J. Drouin.** 1999. Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone  $\beta$  gene transcription. *Mol.Cell.Biol.* **19**:2567-2576.

473. **Tremblay, J. J., C. G. Goodyer, and J. Drouin.** 2000. Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinol.* **71**:277-286.
474. **Tremblay, J. J., C. Lanctôt, and J. Drouin.** 1998. The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene *Lim3/Lhx3*. *Mol.Endocrinol.* **12**:428-441.
475. **Tremblay, J. J., A. Marcil, Y. Gauthier, and J. Drouin.** 1999. Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J.* **18**:3431-3441.
476. **Tsatmali, M., J. Ancans, and A. J. Thody.** 2002. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J.Histochem.Cytochem.* **50**:125-133.
477. **Tsukada, T., Y. Nakai, M. Fukushima, T. Usui, H. Imura, and H. Takebe.** 1994. Functional analysis of the cell-specific enhancer in the human proopiomelanocortin gene by beta-galactosidase histochemical staining. *DNA Cell Biol.* **13**:755-762.
478. **Uhler, M., E. Herbert, P. D'eustachio, and F. D. Ruddle.** 1983. The mouse genome contains two nonallelic pro-opiomelanocortin genes. *J.Biol.Chem.* **258**:9444-9453.
479. **Umesono, K. and R. M. Evans.** 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**:1139-1146.
480. **Umesono, K., K. K. Murakami, C. C. Thompson, and R. M. Evans.** 1991. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* **65**:1255-1266.
481. **Vale, W., C. Rivier, L. Yang, S. Minick, and R. Guillemin.** 1978. Effects of purified hypothalamic corticotropin-releasing factor and other substances on the secretion of adrenocorticotropin and beta-endorphin-like immunoactivities in vitro. *Endocrinology* **103**:1910-1915.
482. **Vale, W., J. Spiess, C. Rivier, and J. Rivier.** 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* **213**:1394-1397.
483. **Vale, W., J. Vaughan, M. Smith, G. Yamamoto, J. Rivier, and C. Rivier.** 1983. Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. *Endocrinology* **11**:1121-1131.
484. **Vallette-Kasic, S., D. Figarella-Branger, M. Grino, A. M. Pulichino, H. Dufour, F. Grisoli, A. Enjalbert, J. Drouin, and T. Brue.** 2003. Differential Regulation of Proopiomelanocortin and Pituitary-Restricted Transcription

- Factor (TPIT), a New Marker of Normal and Adenomatous Human Corticotrophs. *J Clin Endocrinol Metab* **88**:3050-3056.
485. **van den Munckhof, P., K. C. Luk, L. Ste-Marie, J. Montgomery, P. J. Blanchet, A. F. Sadikot, and J. Drouin.** 2003. Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* **130**:2535-2542.
486. **van Wijk, P. A., J. W. van Neck, A. Rijnberk, R. J. Croughs, and J. A. Mol.** 1995. Proliferation of the murine corticotropic tumour cell line AtT20 is affected by hypophysiotrophic hormones, growth factors and glucocorticoids. *Mol.Cell Endocrinol.* **111**:13-19.
487. **Viollet, B., A. Kahn, and M. Raymondjean.** 1997. Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol.Cell.Biol.* **17**:4208-4219.
488. **Vo, N. and R. H. Goodman.** 2001. CREB-binding Protein and p300 in Transcriptional Regulation. *J.Biol.Chem.* **276**:13505-13508.
489. **Voegel, J. J., M. J. Heine, M. Tini, V. Vivat, P. Chambon, and H. Gronemeyer.** 1998. The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* **17**:507-519.
490. **von Dreden, G., J. P. Loeffler, C. Grimm, and V. Holtt.** 1988. Influence of calcium ions on proopiomelanocortin mRNA levels in clonal anterior pituitary cells. *Neuroendocrinol.* **47**:32-37.
491. **Wagner, J., P. Akerud, D. S. Castro, P. C. Holm, J. M. Canals, E. Y. Snyder, T. Perlmann, and E. Arenas.** 1999. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat.Biotechnol.* **17**:653-659.
492. **Wahlstrom, G. M., M. Sjoberg, M. Andersson, K. Nordstrom, and B. Vennstrom.** 1992. Binding characteristics of the thyroid hormone receptor homo- and heterodimers to consensus AGGTCA repeat motifs. *Mol.Endocrinol* **6**:1013-1022.
493. **Wallace, A. D. and J. A. Cidlowski.** 2001. Proteasome-mediated Glucocorticoid Receptor Degradation Restricts Transcriptional Signaling by Glucocorticoids. *J.Biol.Chem.* **276**:42714-42721.
494. **Wallen, A. A., D. S. Castro, R. H. Zetterstrom, M. Karlen, L. Olson, J. Ericson, and T. Perlmann.** 2001. Orphan nuclear receptor Nurr1 is essential for Ret expression in midbrain dopamine neurons and in the brain stem. *Mol Cell Neurosci.* **18**:649-663.

495. **Wang, C., M. Fu, R. H. Angeletti, L. Siconolfi-Baez, A. T. Reutens, C. Albanese, M. P. Lisanti, B. S. Katzenellenbogen, S. Kato, T. Hopp, S. A. W. Fuqua, G. N. Lopez, P. J. Kushner, and R. G. Pestell.** 2001. Direct Acetylation of the Estrogen Receptor alpha Hinge Region by p300 Regulates Transactivation and Hormone Sensitivity. *J.Biol.Chem.* **276**:18375-18383.
496. **Wang, Z., G. Benoit, J. Liu, S. Prasad, P. Aarnisalo, X. Liu, H. Xu, N. P. Walker, and T. Perlmann.** 2003. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**:555-560.
497. **Wang, Z., D. W. Rose, O. Hermanson, F. Liu, T. Herman, W. Wu, D. Szeto, A. Gleiberman, A. Krones, K. Pratt, R. Rosenfeld, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 2000. Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **97**:13549-13554.
498. **Wansa, K. D., J. M. Harris, and G. E. Muscat.** 2002. The AF-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity and coactivator recruitment. *J.Biol.Chem.* **277**:33001-33011.
499. **Wansa, K. D., J. M. Harris, G. Yan, P. Ordentlich, and G. E. Muscat.** 2003. The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine. *J Biol.Chem.* **278**:24776-24790.
500. **Watanabe, Y. G.** 1982. An organ culture study on the site of determination of ACTH and LH cells in the rat adenohypophysis. *Cell Tissue Res.* **227**:267-275.
501. **Watanabe, Y. G.** 1982. Effects of brain and mesenchyme upon the cytogenesis of rat adenohypophysis in vitro. *Cell Tissue Res.* **227**:257-266.
502. **Watkins, W. B. and V. J. Choy.** 1979. Maturation of the hypothalamo-neurohypophysial system. II. Neurophysin, vasopressin and oxytocin in the median eminence of the developing rat brain. *Cell Tissue Res.* **197**:337-346.
503. **Watson, M. A. and J. Milbrandt.** 1990. Expression of the nerve growth factor-regulated NGFI-A and NGFI- B genes in the developing rat. *Development* **110**:173-183.
504. **Webb, P., P. Nguyen, J. Shinsako, C. Anderson, W. Feng, M. P. Nguyen, D. Chen, S. M. Huang, S. Subramanian, E. McKinerney, B. S. Katzenellenbogen, M. R. Stallcup, and P. J. Kushner.** 1998. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol.Endocrinol.* **12**:1605-1618.
505. **Wellstein, A., A. F. Dobrenski, M. N. Radonovich, J. F. Brady, and A. T. Riegel.** 1991. Purification of PO-B, a protein that has increased affinity for the pro- opiomelanocortin gene promoter after dephosphorylation. *J.Biol.Chem.* **266**:12234.

506. **Whitehead, D. and D. A. Carter.** 1997. cAMP response element-binding protein phosphorylation and DNA binding activity are increased in the anterior pituitary gland following glucocorticoid depletion. *J Mol Endocrinol* **19**:291-297.
507. **Wilson, D. S., G. Sheng, S. Jun, and C. Desplan.** 1996. Conservation and diversification in homeodomain-dna interactions: a comparative genetic analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**:6886-6891.
508. **Wilson, T. E., T. J. Fahrner, M. Johnston, and J. Milbrandt.** 1991. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252**:1296-1300.
509. **Wilson, T. E., T. J. Fahrner, and J. Milbrandt.** 1993. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol.* **13**:5794-5804.
510. **Wilson, T. E., A. R. Mouw, C. A. Weaver, J. Milbrandt, and K. L. Parker.** 1993. The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol.Cell.Biol.* **13**:861-868.
511. **Wilson, T. E., R. E. Paulsen, K. A. Padgett, and J. Milbrandt.** 1992. Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* **256**:107-110.
512. **Wilson, V. and F. L. Conlon.** 2002. The T-box family. *Genome Biol.* **3**:REVIEWS3008.
513. **Winoto, A. and D. R. Littman.** 2002. Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell* **109 Suppl**:S57-S66.
514. **Woloschak, M. and J. L. Roberts.** 1995. Characterization and Regulation of Upstream Transcripts of the Murine Proopiomelanocortin Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **210**:281-287.
515. **Won, J. G., Y. Oki, and D. N. Orth.** 1990. Roles of intracellular and extracellular calcium in the kinetic profile of adrenocorticotropin secretion by perfused rat anterior pituitary cells. II. Arginine vasopressin, oxytocin, and angiotensin-II stimulation. *Endocrinology* **126**:858-868.
516. **Won, J. G. and D. N. Orth.** 1990. Roles of intracellular and extracellular calcium in the kinetic profile of adrenocorticotropin secretion by perfused rat anterior pituitary cells. I. Corticotropin-releasing factor stimulation. *Endocrinology* **126**:849-857.
517. **Woronicz, J. D., B. Calnan, V. Ngo, and A. Winoto.** 1994. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* **367**:277-281.

518. **Wu, Q., Y. Li, R. Liu, A. Agadir, M. O. Lee, Y. Liu, and X. Zhang.** 1997. Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J.* **16**:1656-1669.
519. **Wu, W., J. D. Cogan, R. W. Pfaffle, J. S. Dasen, H. Frisch, S. M. O'Connell, S. E. Flynn, M. R. Brown, P. E. Mullis, J. S. Parks, J. A. Phillips, III, and M. G. Rosenfeld.** 1998. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat.Genet.* **18**:147-149.
520. **Wu, W. S., Z. X. Xu, R. Ran, F. Meng, and K. S. Chang.** 2002. Promyelocytic leukemia protein PML inhibits Nur77-mediated transcription through specific functional interactions. *Oncogene* **21**:3925-3933.
521. **Xiao, Q., S. O. Castillo, and V. M. Nikodem.** 1996. Distribution of messenger RNAs for the orphan nuclear receptors *Nurr1* and *Nur77 (NGFI-B)* in adult rat brain using *in situ* hybridization. *Neuroscience* **75**:221-230.
522. **Xie, J., G. T. Nagle, A. K. Ritchie, T. J. Collins, and G. V. Childs.** 1999. Cold stress and corticotropin-releasing hormone induced changes in messenger ribonucleic acid for the alpha(1)-subunit of the L-type Ca(2+) channel in the rat anterior pituitary and enriched populations of corticotropes. *Neuroendocrinol.* **70**:10-19.
523. **Xu, J. and Q. Li.** 2003. Review of the *in vivo* functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* **17**:1681-1692.
524. **Xu, J., L. Liao, G. Ning, H. Yoshida-Komiya, C. Deng, and B. W. O'Malley.** 2000. The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **97**:6379-6384.
525. **Xu, J. and B. W. O'Malley.** 2002. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev.Endocr.Metab Disord.* **3**:185-192.
526. **Xu, J., Y. Qiu, F. J. DeMayo, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley.** 1998. Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* **279**:1922-1925.
527. **Xu, L., R. M. Lavinsky, J. S. Dasen, S. E. Flynn, E. M. McInerney, T. M. Mullen, Heinzl, T, D. Szeto, E. Korzus, R. Kurokawa, A. K. Aggarwal, D. W. Rose, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1998. Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* **395**:301-306.

528. **Yalow, R. S. and S. A. Berson.** 1971. Size heterogeneity of immunoreactive human ACTH in plasma and in extracts of pituitary glands and ACTH-producing thymoma. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **44**:439-445.
529. **Yamamoto, K. R.** 1985. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu.Rev.Genet.* **19**:209-252.
530. **Yang-Yen, H. F., J. C. Chambard, Y. L. Sun, T. Smeal, T. J. Schmidt, J. Drouin, and M. Karin.** 1990. Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**:1205-1215.
531. **Yano, H., C. Readhead, M. Nakashima, S. G. Ren, and S. Melmed.** 1998. Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol.Endocrinol.* **12**:1708-1720.
532. **Yao, T. P., G. Ku, N. Zhou, R. Scully, and D. M. Livingston.** 1996. The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**:10626-10631.
533. **Yao, T. P., S. P. Oh, M. Fuchs, N. D. Zhou, L. E. Ch'ng, D. Newsome, R. T. Bronson, E. Li, D. M. Livingston, and R. Eckner.** 1998. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* **93**:361-372.
534. **Yaswen, L., N. Diehl, M. B. Brennan, and U. Hochgeschwender.** 1999. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat.Med.* **5**:1066-1070.
535. **Yazdanbakhsh, K., J. W. Choi, Y. Li, L. F. Lau, and Y. Choi.** 1995. Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**:437-441.
536. **Yu, R. N., M. Ito, and J. L. Jameson.** 1998. The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol.Endocrinol.* **12**:1010-1022.
537. **Zanger, K., L. E. Cohen, K. Hashimoto, S. Radovick, and F. E. Wondisford.** 1999. A novel mechanism for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulation of gene expression by CREB-binding protein. *Mol.Endocrinol.* **13**:268-275.
538. **Zanger, K., L. E. Cohen, K. Hashimoto, S. Radovick, and F. E. Wondisford.** 1999. A novel mechanism for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulation of gene expression by CREB-binding protein. *Mol.Endocrinol.* **13**:268-275.



539. **Zetterstrom, R. H., L. Solomin, L. Jansson, B. J. Hoffer, L. Olson, and T. Perlmann.** 1997. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**:248-250.
540. **Zetterstrom, R. H., L. Solomin, T. Mitsiadis, L. Olson, and T. Perlmann.** 1996. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol.Endocrinol.* **10**:1656-1666.
541. **Zhang, J., M. G. Guenther, R. W. Carthew, and M. A. Lazar.** 1998. Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev.* **12**:1775-1780.
542. **Zhang, P. and S. H. Mellon.** 1997. Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action. *Mol.Endocrinol.* **11**:891-904.
543. **Zhao, L., M. Bakke, Y. Krimkevich, L. J. Cushman, A. F. Parlow, S. A. Camper, and K. L. Parker.** 2001. Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development* **128**:147-154.

