

2M11.3022.11

Université de Montréal

Étude de l'effet de la mutation naturelle G577R dans le domaine de liaison de l'ADN
du récepteur des androgènes sur l'affinité et la spécificité de la liaison à l'ADN

par
Denis Nguyen

Département de biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en biochimie

Juillet 2002
© Denis, Nguyen, 2002



W
4
U58
2002
W.120



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Étude de l'effet de la mutation naturelle G577R dans le domaine de liaison à l'ADN
du récepteur des androgènes sur l'affinité et la spécificité de la liaison à l'ADN

présenté par
Denis Nguyen

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur :	Dr. Luis A. Rokeach
Membres :	Dr. Guy Boileau
	Dr. Sylvie Mader

RÉSUMÉ

Les androgènes, nécessaires pour le développement de l'appareil reproducteur mâle, agissent par l'entremise d'un récepteur intracellulaire appelé récepteur des androgènes (AR). Ceux-ci se lient à des séquences d'ADN spécifiques au niveau du promoteur de gènes cibles dans le but de contrôler la transcription de ces gènes. Chez un patient atteint du syndrome d'insensibilité aux androgènes, la glycine en position 577 dans le domaine de liaison à l'ADN est changée en une arginine. Nous avons étudié l'effet de cette mutation (G577R) sur l'affinité et la sélectivité des interactions récepteurs-ADN par retard sur gel, et sur la transactivation de promoteurs naturels et synthétiques par transfections transitoires dans les cellules HeLa.

Nos résultats indiquent que la mutation altère et l'affinité et la sélectivité des interactions de AR avec ses motifs cibles (PuGNACA). En particulier, la liaison au motif PuGGACA est abolie ainsi que la transactivation d'éléments synthétiques ou naturels contenant ce motif. La modélisation moléculaire par le programme Insight indique un effet déstabilisant sur tous les éléments de réponse attribuable à un encombrement stérique dû au C β du résidu arginine. De plus, une incompatibilité de charges empêche la liaison au motif PuGGACA. Ces données suggèrent que les gènes cibles des androgènes peuvent être différemment affectés par la mutation G577R suivant la séquence de l'élément de réponse. Ce type de mutation contribue ainsi à la diversité des phénotypes associés au syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes.

Mots clés :

Récepteur des androgènes, syndrome d'insensibilité aux androgènes, domaine de liaison à l'ADN, boîte P, éléments de réponse, interaction récepteur-ADN, sélectivité de liaison à l'ADN, retard sur gel, transfections transitoires, modélisation moléculaire.

ABSTRACT

Androgens are necessary to the development of the male reproductive apparatus. Their action is mediated by intracellular receptors called androgen receptors (AR). These receptors bind to specific DNA sequences in the promoters of target genes and regulate the transcription of these genes. The glycine at position 577 in the DNA-binding domain of AR was found to be changed to an arginine in a patient diagnosed with an androgen insensitivity syndrome. We have investigated the effect of this mutation (G577R) on the affinity and selectivity of receptor-DNA interaction in gel shift experiments, and on transactivation of natural and synthetic promoters by transient transfection in HeLa cells.

Our results show that the mutation alters both the affinity and the selectivity of AR interactions with target motifs (PuGNACA). In particular, binding to the motif PuGGACA is abolished, as well as transactivation of synthetic or natural elements containing that motif. Molecular modeling using the Insight program indicates a destabilizing effect of this mutation with all types of response motifs that is attributable to steric clash with the C β of the arginine residue. Also, the PuGGACA motif is not bound due to incompatible charges. These data suggest that androgen target genes may be differentially affected by the G577R mutation according to the sequence of the response element. This type of mutation contributes to the diversity of phenotypes associated with partial androgen insensitivity syndrome.

Key words :

Androgen receptor, androgen insensitivity syndrome, DNA-binding domain, P box, response elements, receptor-DNA interaction, selectivity of DNA binding, gel shift, transient transfection experiments, molecular modeling.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLES DES MATIÈRES	v
LISTES DES FIGURES	vii
LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xii
CHAPITRE I – INTRODUCTION	1
1 Introduction	2
1.1 Action des androgènes	4
1.1.1 Structure interne et externe de l'appareil reproducteur mâle	6
1.1.2 Glandes sébacées	6
1.1.3 Muscles	8
1.1.4 Cerveau et comportement	9
1.2 Récepteurs des androgènes	10
1.2.1 Localisation subcellulaire du AR	12
1.2.2 Domaine de liaison à l'hormone	13
1.2.3 Domaine de liaison à l'ADN	17
1.2.3.1 Éléments de spécificité de la reconnaissance de l'ADN par les récepteurs nucléaires	19
1.2.3.2 Reconnaissance de la séquence primaire	19
1.2.3.3 Orientation et espacement des motifs répétés	23
1.2.4 Domaines de transactivation	25
1.2.5 Coactivateurs et corépresseurs	29
1.2.6 Phosphorylation	33
1.2.7 Spécificité de l'action du AR	34
1.3 Pathologies associées aux androgènes	35
1.3.1 Déficience en 5 α -réductase	35

1.3.2 Maladie de Kennedy	36
1.3.3 Cancer du sein chez l'homme	37
1.3.4 Hyperplasie bénigne de la prostate et cancer de la prostate	38
1.3.5 Syndrome d'insensibilité aux androgènes	42
1.4 Projet de recherche	46
CHAPITRE II – ARTICLE	48
<u>Nguyen D.</u> , Steinberg S.V., Rouault E., Chagnon S., Gottlieb B., Pinsky L., Trifiro M., Mader S. (2001) A G577R mutation in the human AR P box results in selective decreases in DNA binding and in partial androgen insensitivity syndrome. Mol. Endocrinol. Oct;15(10):1790-802.	
CHAPITRE III – DISCUSSION ET PERSPECTIVES	92
3.1 Le récepteur des androgènes reconnaît les motifs PuGNACA.	94
3.2 La mutation G577R dans le AR altère l'affinité et la sélectivité des interactions entre le récepteur et ses éléments de réponses.	95
3.3 Rôle de l'acide aminé à la première position de la boîte P.	98
3.4 La sélectivité de la liaison à l'ADN : rôle des acides aminés n'effectuant pas de contact avec l'ADN.	101
3.5 Bases moléculaires du mécanisme d'interaction récepteur-ADN <i>in vivo</i> .	102
BIBLIOGRAPHIE	105

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE I – INTRODUCTION

Figure 1.	Voie de la synthèse des androgènes et leur transformation en oestrogènes.	3
Figure 2.	Mécanisme d'action du AR.	5
Figure 3.	Structure de l'appareil reproducteur mâle.	7
Figure 4.	Représentation des différents domaines fonctionnels du AR.	11
Figure 5.	Structures tridimensionnelles du LBD du PR en présence de son ligand, la progestine.	15
Figure 6.	Représentation des doigts de zinc du DBD du AR.	18
Tableau I.	Séquence en acide aminé des boîtes P de différents récepteurs nucléaires et séquence de leur motif d'ADN reconnu.	20
Figure 7.	Les déterminants moléculaires de la reconnaissance spécifique de l'ADN par les récepteurs stéroïdiens.	22
Figure 8.	Liaison des DBDs du GR à l'ADN.	24
Figure 9.	Modèles de la formation d'homodimères du AR.	30
Figure 10.	Banque des mutations dans le gène du AR.	44

CHAPITRE II – ARTICLE

Figure 1.	The G577R mutation affects the first residue of the AR P box.	81
Figure 2.	Expression of the wt and mt full length ARs and of the corresponding DNA binding domains.	82
Figure 3.	Both wild type AR and AR-G577R transactivate GRE5-TATA-CAT, but not ERE3-TATA-CAT.	83
Figure 4.	The wt and mt AR DBDs recognize PuGN <u>A</u> CA elements with different selectivities.	84

Figure 5.	The wt and mt full length ARs recognize PuGNACA elements with similar specificities compared to the corresponding DBDs.	85
Figure 6.	AR-G577R does not transactivate a reporter vector containing two copies of the PuGGACA elements.	86
Figure 7.	Transactivation by AR-G577R is impaired compared to the wt receptor with response elements containing GA motifs.	87
Figure 8.	Transactivation by AR-G577R is impaired compared to the wt receptor on the probasin and PSA promoters.	88
Figure 9.	Schematic description of modeled protein-DNA contacts in the half-complex between AR-G577R and the consensus ARE.	89
Figure 10.	Stereo view of the contacts between the AR-G577R DNA recognition helix and a PuGAACA half-site in a model derived from the E/TRGR-GRE complex.	90
Tableau 1.	Consensus and Natural AREs.	91

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A:	Adénine
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1, AF-2:	Fonction d'activation-1 et 2 (Activation function-1 and 2)
AIB-1:	Amplified in breast cancer-1
AR:	Récepteur des androgènes (Androgen receptor)
ARA:	AR-associated protein
ARE:	Élément de réponse aux androgènes (Androgen response element)
ARN:	Acide ribonucléique
BAG-1L:	BAG-1 long
Boîte D:	Boîte distale
Boîte P:	Boîte proximale
BRCA2:	Breast cancer gene-2
C:	Cytosine
CAIS:	Syndrome d'insensibilité complète aux androgènes (Complete androgen insensitivity syndrome)
CBP:	CREB binding protein
CDK2, CDK4:	Cyclin-dependent kinase 2 and 4
DBD:	Domaine de liaison à l'ADN (DNA-binding domain)
DHEA:	Déshydroépiandrostérone
DHT:	5 α -Dihydrotestostérone
EGF:	Epidermal growth factor
ER:	Récepteur des oestrogènes (Estrogen receptor)
ERE:	Élément de réponse aux oestrogènes (Estrogen response element)
FSH:	Follicle-stimulating hormone
G:	Guanine
GnRH:	Gonadotropin-releasing hormone

GR:	Récepteur des glucocorticoïdes (Glucocorticoid receptor)
GRE:	Élément de réponse aux glucocorticoïdes (Glucocorticoid response element)
GRIP-1:	Glucocorticoid receptor-interacting protein-1
hsp:	Protéine de choc thermique (Heat-shock protein)
IGF-1:	Insuline-like growth factor-1
IL-6:	Interleukin-6
kb:	kilobases
Kd:	constante de dissociation
kDa:	kiloDalton
KGF:	Keratinocyte growth factor
LBD:	Domaine de liaison au ligand (Ligand-binding domain)
LH:	Luteinizing hormone
LHRH:	Luteinizing hormone-releasing hormone
MAIS:	Mild androgen insensitivity syndrome
MR:	Récepteur des minéralocorticoïdes (Mineralocorticoid receptor)
N:	Nucléotide A, C, G ou T
NR box:	Nuclear receptor box
PAIS:	Syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes (Partial androgen insensitivity syndrome)
PPAR:	Peroxisome proliferator-activated receptor
PR:	Récepteur de la progestérone (Progesterone receptor)
PSA:	Prostate-specific antigen
Pu:	Purine
Py:	Pyrimidine
RAR:	Récepteur de l'acide rétinoïque all- <i>trans</i> (Retinoic acid receptor)
RXR:	Récepteur de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque (Retinoid X receptor)
SF-1:	Facteur stéroïdogénique-1 (Steroidogenic Factor-1)
SHP:	Short heterodimer partner
SRC-1:	Steroid receptor coactivator-1

T:	Thymine
TAU-1, TAU-5:	Transcription activation unit-1 and 5
TIF-2:	Transcription intermediary factor-2
TR:	Récepteur de l'hormone thyroïdienne (Thyroid receptor)
VDR:	Récepteur de la vitamine D ₃ (Vitamin D receptor)

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Sylvie Mader de m'avoir accueilli dans son laboratoire. J'aimerais souligner sa grande disponibilité et sa grande patience à mon égard qui furent très appréciées. Sa rigueur scientifique et ses conseils judicieux ont grandement contribué à améliorer la qualité de mon travail. La fougue qui l'anime m'a constamment amené à me surpasser dans ma démarche scientifique.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé de près ou de loin, plus spécialement Étienne pour m'avoir encadré à mon arrivée au laboratoire, Samuel pour son aide et ses conseils plus que précieux, Annie, Silvia et Wenli pour leur aide et support et encouragements, Geneviève et Véronique P. , avec qui l'aventure de la maîtrise fut vécue ensemble dans le petit laboratoire, et finalement David, Gisèle, Guila, Mathieu, Rocio, Véronique M. et Walter pour leur aide, amitié et encouragement et sans qui l'atmosphère du laboratoire ne serait pas la même.

Un grand merci à mes amis Alexandre, Benoît, Dominic, Éric, Frédéric, Gisèle, Jonathan, Laurent, Nadia, Patrick et Richard pour leur encouragement et leur présence lorsque vient le temps de me divertir un peu.

Un grand merci aussi à ma famille qui n'approuve pas toujours mes choix mais qui a toujours été présente quand j'ai eu besoin d'eux et pour qui je serai toujours leur petit Denis.

Finalement je remercie la vie et les nombreux obstacles qui se sont posés sur ma route, ce fut certainement le plus grand moteur de mon accomplissement.

CHAPITRE I – INTRODUCTION

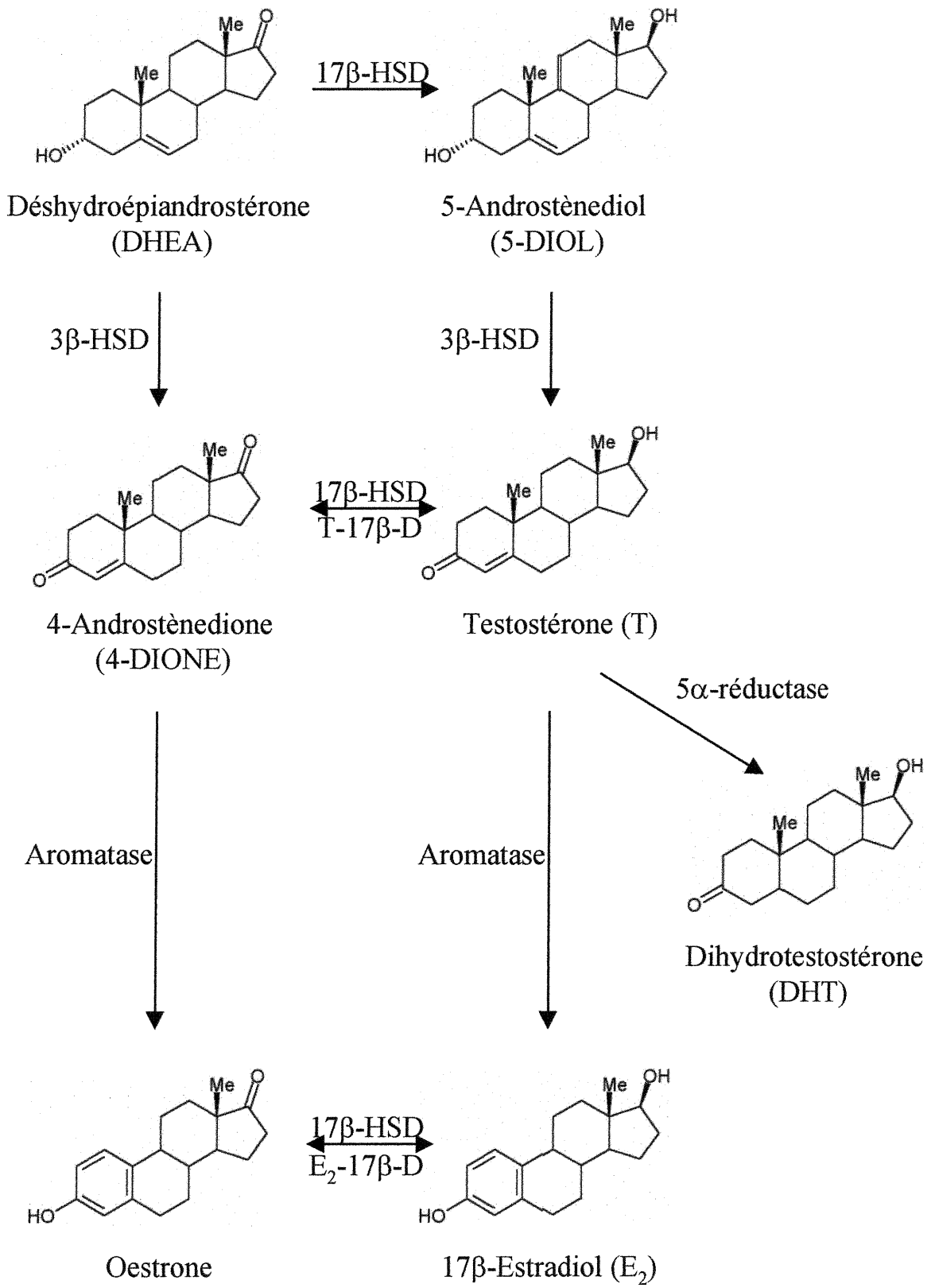
1 Introduction

Les androgènes sont importants pour leurs effets sur le développement et le maintien du phénotype mâle, et sont aussi essentiels pour la reproduction chez les mâles adultes. De plus les androgènes sont impliqués dans de nombreuses pathologies humaines, comme le cancer de la prostate (rôle stimulateur) et du sein (rôle protecteur). Malgré la variété des tissus sous régulation androgénique, les événements menant à l'effet des androgènes sur la transcription de leurs gènes cibles sont similaires dans les différents types tissulaires.

La testostérone, le principal stéroïde androgénique, est sécrétée par les cellules de Leydig des testicules. La testostérone diffuse passivement dans la cellule et peut être modifiée par une réaction d'aromatisation en oestrogènes ou peut être réduite par la 5α -réductase en 5α -dihydrotestostérone (DHT) (figure 1). La DHT est le plus efficace des androgènes, ayant une meilleure affinité pour le récepteur des androgènes (AR) que la testostérone (Wilbert et al., 1983). La testostérone et la DHT sont les ligands physiologiques du récepteur intracellulaire des androgènes qui est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires. Cette famille comprend les récepteurs des stéroïdes (androgènes, oestrogènes (ER), glucocorticoïdes (GR), progestérone (PR) et minéralocorticoïdes (MR)), les récepteurs des rétinoïdes (RARs, RXRs), de l'hormone thyroïde (TRs), de la vitamine D (VDR), des acides gras et d'autres petites molécules hydrophiles. On retrouve aussi un groupe de récepteurs dont le ligand n'a pas encore été déterminé que l'on appelle les récepteurs orphelins. Les récepteurs des stéroïdes sont des facteurs de transcription nucléaires dont l'activité dépend en grande partie de la fixation du ligand.

Lorsque la testostérone ou la DHT se lie au AR, la protéine subit des changements conformationnels et les protéines chaperones comme les protéines de choc thermique se dissocient du récepteur (figure 2). Le récepteur activé peut alors se lier sous forme d'homodimère à des séquences spécifiques d'ADN appelées éléments de réponse aux androgènes (AREs). Des AREs sont généralement situés dans la région promotrice des gènes ciblés par les androgènes. Une fois que ces AREs sont

Figure 1. **Voie de la synthèse des androgènes et leur transformation en oestrogènes.** Les principaux composés et enzymes impliqués dans la synthèse des androgènes et des oestrogènes. HSD, hydroxystéroïde déshydrogénase; D, déshydrogénase.



liés par AR, une régulation positive ou négative de la transcription des gènes est médiée.

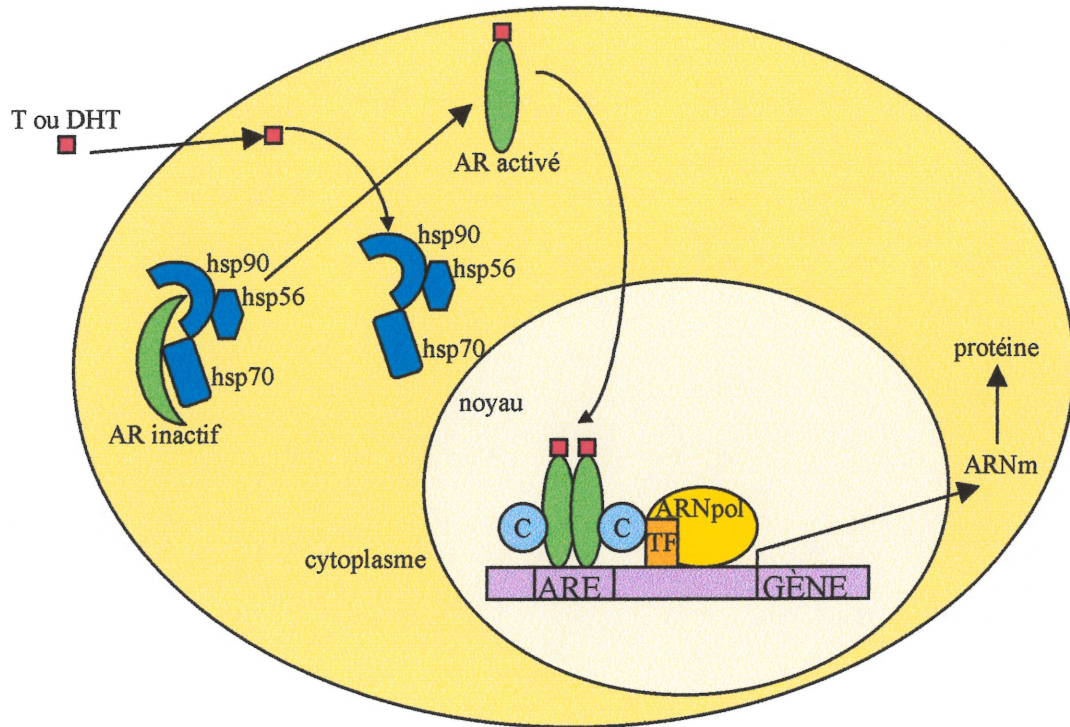
1.1 Action des androgènes

Le knockout de AR chez la souris mâle entraîne un syndrome d'insensibilité aux androgènes (Quigley et al., 1995). Même si la protéine du AR est exprimée chez les femelles et qu'une faible quantité d'androgènes est produite à partir des précurseurs sécrétés au niveau de leurs glandes surrénales et de leurs ovaires (la déshydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstènedione, respectivement) (figure 1), le rôle de ceux-ci dans le développement et la fonction de reproduction est moins bien défini. Des souris femelles chez lesquelles on a retrouvé une mutation des deux allèles du AR sont toujours fertiles, confirmant que le niveau de la protéine AR n'est pas essentiel pour la reproduction chez la femelle. Cependant ces souris présentent des performances de reproduction un peu altérées et une cessation prématurée de la reproduction (Lyon et al., 1980).

Le AR est exprimé dans une grande variété de tissus. L'utilisation de techniques variées (immunohistochimie ou Western blot, hybridation in situ ou Northern blot) a permis de détecter l'expression du AR dans le système reproductif mâle et femelle, les reins, le foie, le cortex des glandes surrénales, les glandes pituitaires, les muscles, le système nerveux central, la peau, les os et d'autres tissus (Chang et al., 1995). Plusieurs des tissus qui sont les cibles des androgènes démontrent un dimorphisme sexuel dans leur morphologie et/ou leur fonction.

Les androgènes provenant des testicules masculinisent les structures de l'appareil reproducteur et le comportement sexuel. D'où l'hypothèse qu'une exposition précoce aux androgènes peut modifier de façon permanente la structure et la fonction de ces organes. Les mêmes androgènes testiculaires ensuite agissent à l'âge adulte pour activer une variété d'événements physiologiques et comportementaux. Un bref survol du rôle des androgènes dans le développement et

Figure 2. **Mécanisme d'action du AR.** La liaison de l'hormone au AR induit une activation du récepteur en le dissociant du complexe de protéines de choc thermique. La translocation du AR activé a lieu et le récepteur se lie à une séquence d'ADN spécifique appelé ARE sous forme de dimère. Ceci induit le recrutement des coactivateurs, ainsi que des composants de la machinerie transcriptionnelle de base au niveau du promoteur du gène cible, permettant sa transcription et la synthèse des protéines responsables de la réponse cellulaire. T, testostérone; DHT, 5 α -dihydrotestostérone ; hsp, protéines de choc thermique ; ARE, élément de réponse aux androgènes ; C, coactivateurs ; TF, facteurs de transcription ; ARNpol, ARN polymérase II ; ARNm, ARN messenger.



la régulation de l'appareil reproducteur mâle, des glandes sébacées, des muscles, du cerveau et du comportement suit.

1.1.1 Structure interne et externe de l'appareil reproducteur mâle

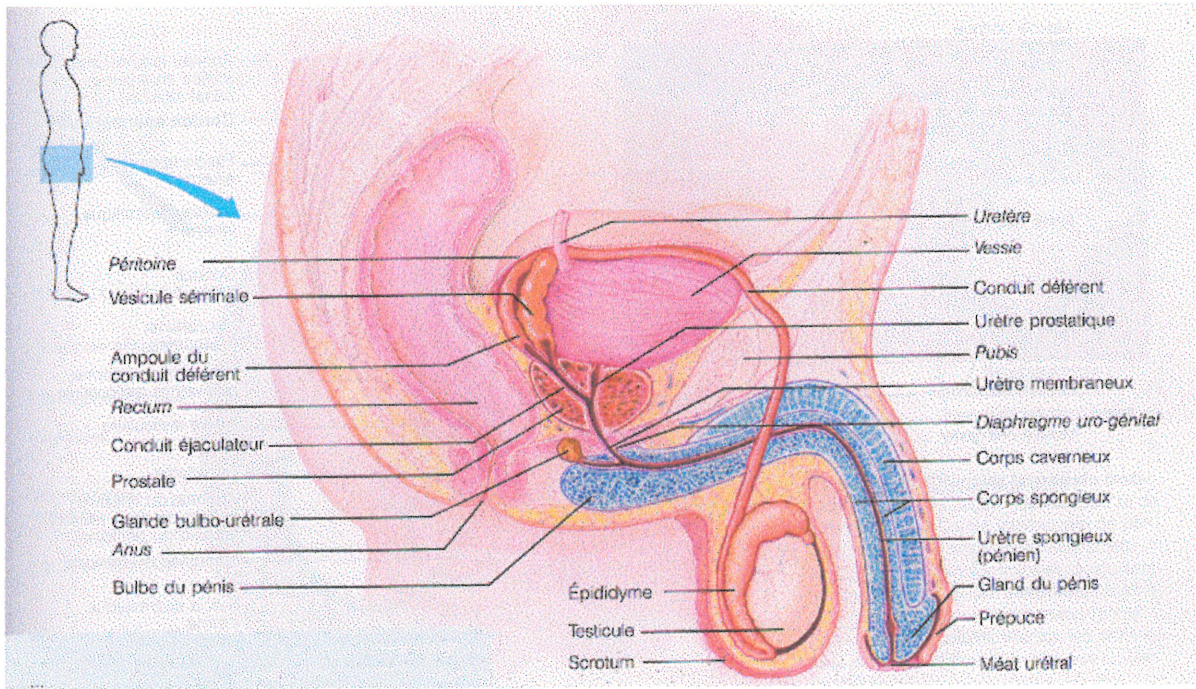
L'action des androgènes commence très tôt dans la vie avec la différenciation des gonades en testicules chez les individus de génotype XY. Les androgènes sécrétés par les testicules du fœtus sont ensuite les initiateurs du développement des tissus spécifiques aux mâles et de la différenciation sexuelle qui donnera finalement un phénotype sexuel masculin (Jost et al., 1970). Les androgènes dirigent le développement des principaux organes dans la fonction sexuelle mâle en effectuant la différenciation des canaux de Wolff en structures internes mâles comme l'épididyme, le conduit déférent et les vésicules séminales, très tôt chez l'embryon (figure 3).

Le développement de la prostate et du tractus génital externe à partir de sinus urogénitaux, du tubercule génital, de plis urogénitaux et des tubercules labio-scrotaux est aussi guidé par les androgènes sécrétés par les testicules du fœtus. La plupart des tissus dont la différenciation est contrôlée très tôt par les androgènes continuent à être des cibles majeures de l'action des androgènes tout au cours de la vie. (Roy et al., 1995)

1.1.2 Glandes sébacées

Chez certains mammifères, des agrégats de glandes sébacées sont organisés en glandes utilisées dans la communication olfactive. Ces glandes sont typiquement régulées par les androgènes et ont été utilisées comme modèles d'étude de l'action des androgènes. C'est ainsi le cas pour les organes du flanc du hamster, les glandes ventrales de la gerbille et les glandes supracaudales du cobaye. Le AR est aussi retrouvé dans les glandes sébacées localisées chez l'humain au niveau du cuir

Figure 3. **Structure de l'appareil reproducteur mâle.** Schéma d'une vue sagittale de l'appareil reproducteur mâle. Figure tirée d'Anatomie et physiologie humaine par Elaine N. Marieb, traduction par Guy Laurendeau (1993), Chapitre 28, p. 932-973, (figure à la page 933).



chevelu, de la tempe, du front, du menton, du cou, des organes génitaux et des jambes (Choudhry et al., 1992).

Chez les humains comme chez les autres mammifères, les androgènes provenant des glandes surrénales sont importants pour le maintien de l'activité des glandes sébacées chez les femelles (Sonoda et al., 1991) Chez les mâles une castration ou un traitement aux anti-androgènes sur les mâles non-castrés entraîne une atrophie des glandes sébacées (Thody et al., 1989). Par contre l'administration de testostérone ou de DHT augmente la taille des glandes sébacées ainsi que de leur production de corps gras (Pochi et al., 1974 ; Thody et al., 1989).

1.1.3 Muscles

La présence de muscles squelettiques plus développés chez les mâles que chez les femelles a conduit à penser que les androgènes pouvaient être responsables de l'action myotrope ou anabolique. Le dimorphisme sexuel au niveau des muscles squelettiques comprend une aérobie plus grande et une capacité dans la force d'exécution plus élevée chez le mâle (Komi et al., 1978). L'administration de testostérone (Mooradian et al., 1987) ou de stéroïdes anaboliques synthétiques (Choo et al., 1991) modifie la composition du corps, menant à une accumulation de masse musculaire. Le AR a été bien étudié au niveau des muscles squelettiques normaux (Michel et al., 1976 ; Celotti et al., 1992) et d'autres cibles du dimorphisme sexuel comme les muscles du larynx chez la grenouille mâle (Kelley et al., 1989).

Le développement des muscles striés squelettiques du larynx se fait sous l'influence des androgènes et se différencie selon le sexe à l'âge adulte chez les grenouilles d'Afrique (african clawed frog). À la métamorphose, le larynx est similaire chez les deux sexes en taille, en nombre de fibres et en niveau d'expression du AR. Trois mois après la métamorphose les niveaux de fixation de la DHT sont différents selon le sexe (Kelley et al., 1989). Les muscles du larynx des grenouilles mâles à l'âge adulte contiennent trois à quatre fois plus de AR, environ huit fois plus de fibres musculaires et des types de fibres différents en comparaison avec ceux des

femelles (Sassoon et al., 1986). Les androgènes régulent aussi la différenciation des muscles lisses du conduit déférent, de la prostate, des vésicules séminales et du pénis et AR est retrouvé dans les cellules des muscles lisses de ces structures de l'appareil génital masculin (Syms et al., 1987; Ricciardelli et al., 1989; West et al., 1990; Gonzalez-Cadavid et al., 1991)

1.1.4 Cerveau et comportement

Chez plusieurs vertébrés, les androgènes produits par les testicules masculinisent le développement du système nerveux en terme de morphologie et de fonction. Les différences reliées au sexe dans la structure du cerveau incluent de plus grands noyaux de la zone préoptique (preoptic area, POA) chez les humains et rats mâles, de plus grands noyaux spinaux, responsables de la musculature pénile, ainsi que de plus grands noyaux dans la région responsable du chant chez les oiseaux mâles (Gorski et al., 1984; Arnold et al., 1984). Ces différences corrént avec un comportement sexuel, un patron de sécrétion de la gonadotropin-releasing hormone (GnRH), une musculature périnéale et un répertoire de chant différents selon le sexe.

Chez les mâles adultes, le niveau de testostérone en circulation sert à réguler les comportements et la sécrétion d'hormones (GnRH, FSH et LH) impliquées dans la reproduction. Chez la plupart des vertébrés mâles, la castration entraîne un arrêt des comportements reliés à la reproduction qui sont typiques aux mâles. Ces comportements redeviennent normaux lorsque ces individus sont traités avec de la testostérone exogène (Baum et al., 1992; Moore et al., 1992). Chez de nombreuses espèces, les effets de la testostérone sur le comportement résultent directement de l'interaction entre la testostérone ou la DHT avec le AR, ou indirectement à travers la transformation en oestrogènes (Baum et al., 1992). Chez l'homme le lien entre les androgènes provenant des testicules et le comportement sexuel est moins bien défini. La castration réduit souvent l'appétit et l'activité sexuelle, mais varie selon les individus (Carter et al., 1992).

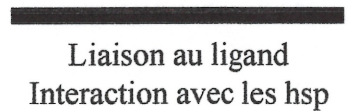
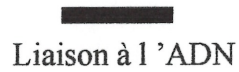
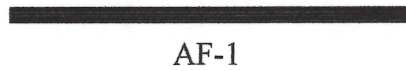
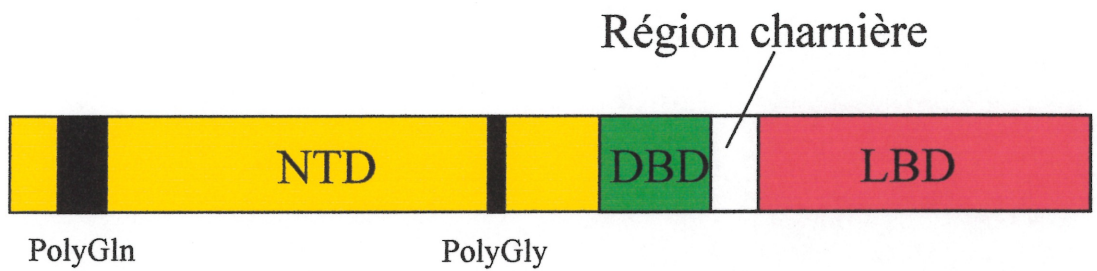
1.2 Récepteurs des androgènes

Pour comprendre comment les androgènes exercent leur action physiologique normale et sont impliqués dans des états pathologiques, il était critique de connaître la structure de leur récepteur et de comprendre son impact sur les fonctions du récepteur. Ces études ont été facilitées par le clonage de l'ADNc du AR chez l'homme (Trapman et al., 1988; Tilley et al., 1989; Faber et al., 1989; Lubahn et al., 1988a, 1989a,b; Brinkmann et al., 1989 ; Chang et al., 1988a,b), chez le rat (Chang et al., 1988a,b) et chez la souris (He et al., 1990).

Le gène du AR est localisé sur le chromosome X à la position Xq11-12 et fait à peu près 90 kb de long (Chang et al., 1988). Le gène code pour une protéine de 917 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 98,8 kDa (Brinkmann et al., 1989). Le AR est représenté par deux isoformes différents dans plusieurs types cellulaires. L'isoforme prédominant B (80%) est plus gros que l'isoforme A (20%) soit 23 kDa de plus en poids moléculaire (Wilson et al., 1994). L'isoforme A résulte d'un site d'initiation de la transcription interne, la traduction étant initiée à la Met188. Les deux isoformes répondent de façon semblable aux agonistes et antagonistes du AR (Gao et al., 1998).

Le gène du AR est composé de huit exons codant pour trois domaines fonctionnels (figure 4). Le premier exon code pour l'extrémité amino-terminale qui contient les régions impliquées dans les fonctions de transactivation indépendantes de la liaison du ligand ainsi que plusieurs sites de phosphorylation (Faber et al., 1989). Les exons 2 et 3 codent pour les séquences contenant les deux motifs de doigt de zinc du domaine de liaison à l'ADN (DBD), qui sont responsables de la liaison à l'ADN. Les exons 4 à 8 codent pour le domaine de liaison au ligand (LBD), responsable de la reconnaissance spécifique du ligand et contenant aussi une fonction d'activation de la transcription hormono-dépendante. Une partie de l'exon 4 code pour une région charnière entre le DBD et le LBD qui contient un signal de localisation nucléaire riche en résidus de nature basique (lysine et arginine) permettant une translocation dans le noyau suite à la liaison au ligand (Jenster et al.,

Figure 4. **Représentation des différents domaines fonctionnels du AR.** Le gène du AR contient huit exons codant pour les différents domaines de la protéine. Le domaine amino-terminal (NTD) contient la principale fonction d'activation (AF-1), ainsi que les régions polymorphiques polyGln et polyGly. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est localisé au milieu de la protéine du côté amino-terminal de la région charnière. Celle-ci contient le signal de localisation nucléaire, NLS. À l'extrémité carboxy-terminale se trouve le domaine de liaison au ligand (LBD). Le LBD contient la seconde fonction d'activation (AF-2) et interagit avec les protéines de choc thermique, hsp. PolyGln, polyglutamines; polyGly, polyglycines.



1993 ; Zhou et al., 1994). Les récepteurs stéroïdiens, dont fait partie le AR, sont respectivement très bien et bien conservés au niveau de leur DBD et LBD. Le DBD du AR partage entre 79 et 82% d'homologie avec ceux du GR, MR et PR et 59% avec le DBD du ER. Le LBD du AR a entre 52 et 55% d'homologie avec les LBDs du GR, MR et PR mais seulement 25% avec celui du ER. Par contre, le domaine de transactivation situé à l'extrémité amino-terminale ainsi que la région charnière entre le DBD et le LBD sont plus diversifiés à travers cette superfamille et peuvent être considérés comme spécifiques au récepteur.

Historiquement, de nombreuses informations concernant la relation structure-fonction de AR proviennent des études sur les bases moléculaires du syndrome d'insensibilité aux androgènes chez l'homme, le rat et la souris. Mais plus récemment des analyses de mutagenèse systématique ont permis d'analyser le rôle individuel de chaque région.

1.2.1 Localisation subcellulaire du AR

En absence de son ligand, une grande partie des ARs se trouve dans le cytoplasme, séquestrée dans un complexe multiprotéique comprenant des immunophilines et des protéines de choc thermique (hsp), ces dernières étant des chaperones moléculaires présentes dans toutes les cellules eucaryotes (Tyagi et al., 2000 ; DeFranco et al., 1999). Ce complexe de chaperones moléculaires consiste en hsp56, hsp70 et la composante principale, hsp90 (Veldscholte et al., 1992a ; Sanchez et al., 1990). Toutes les protéines de choc thermique ont une activité ATPase et catalysent des réactions dans la chaîne polypeptidique permettant le repliement de la protéine dans une structure tertiaire stable.

La liaison du complexe de chaperones au AR non lié à son ligand permettrait le repliement du récepteur dans une conformation résistante à l'action des enzymes protéolytiques dans le cytoplasme (Pratt et al., 1993 ; Caamano et al., 1998). Les récepteurs mutants qui sont incapables de se lier à hsp90 sont généralement retrouvés dans le cytoplasme sous forme de produits de clivage (Housley et al., 1990). Ces

récepteurs incomplets peuvent être actifs de façon constitutive à cause de la perte partielle ou totale du LBD.

La liaison du AR à son ligand dissocie le complexe de chaperones du récepteur, révélant le signal de localisation nucléaire. Ce signal responsable de la translocation du récepteur dans le noyau s'étend depuis la fin du deuxième motif de doigts de zinc jusque dans la région charnière entre le DBD et le LBD (Jenster et al., 1993 ; Zhou et al., 1994). Ce type de signal est composé de deux régions riches en résidus de nature basique espacées par dix acides aminés. Ce signal de localisation nucléaire est très conservé au sein des récepteurs d'hormones stéroïdiennes.

En présence d'hormone, la translocation du récepteur dans le noyau a lieu rapidement. Le AR lié à son ligand se retrouve exclusivement dans le noyau. Des résultats ont démontré que seulement les agonistes et certains agonistes partiels peuvent diriger correctement le AR à son site d'action potentiel dans le noyau (Tyagi et al., 2000). Aussi, un récepteur peut participer à plusieurs cycles de translocation dans le noyau indiquant ainsi que la dissociation du ligand plutôt que la dégradation du récepteur peut jouer un rôle clé dans la terminaison de l'action du AR activé par l'hormone.

D'autres études ont détecté une association de hsp70 avec le complexe récepteur-ADN dans le noyau (Landel et al., 1994). Ceci suggère un rôle possible pour hsp70 dans la liaison récepteur-ADN. De plus, la présence d'une forme mutante plus longue de BAG-1L, une protéine s'associant à la hsp70, semble augmenter la transactivation d'un gène rapporteur contenant des éléments de réponse aux androgènes (Froesch et al., 1998).

1.2.2 Domaine de liaison à l'hormone

Le LBD est formé par 258 acides aminés (653-910) dans la région carboxy-terminale de AR. Cette région, comprenant un grand nombre de résidus de nature hydrophobe, forme une poche hydrophobe pourvue de grande affinité et spécificité pour les androgènes. Cette région constitue la clé de l'interaction spécifique entre le

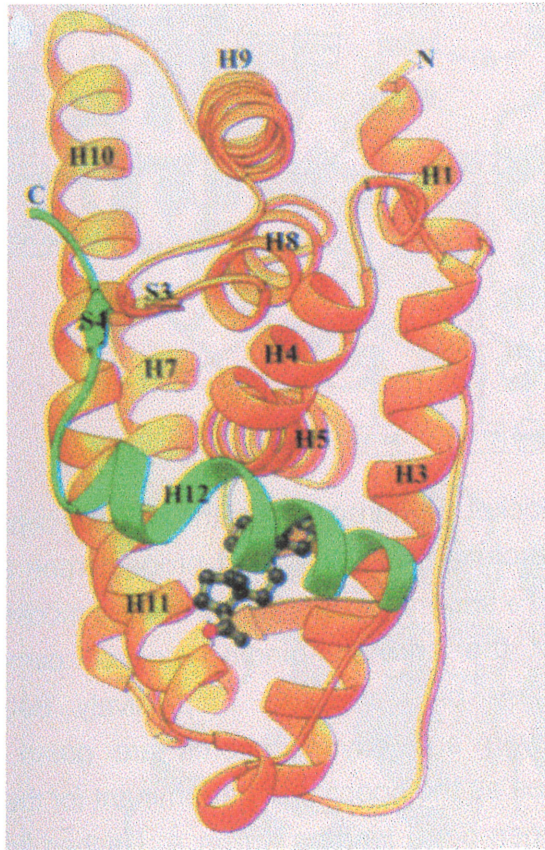
AR et le ligand, qui sous-tend l'action physiologique des androgènes. En plus des interactions avec le ligand, le LBD interagit aussi avec les protéines de choc thermique.

Les études cristallographiques du LBD de plusieurs récepteurs nucléaires ont établi qu'un nombre variable d'hélices α (10 à 12 selon le type de récepteur) et un feuillet β anti-parallèle sont impliqués dans la formation de la poche hydrophobe pour le ligand (figure 5) (Bourguet et al., 1995 ; Renaud et al., 1995 ; Wagner et al., 1995 ; Brzozowski et al., 1997 ; Williams et al., 1998). La structure tridimensionnelle du LBD du AR a été récemment étudiée (Sack et al., 2001). Les hélices 3, 5, 7, 11, 12 et la boucle β sont principalement impliquées dans la création de la poche hydrophobe pour le ligand, des résidus des hélices 3, 5 et 11 sont en contact étroit avec le ligand. En absence de ligand, l'hélice 12 est positionnée loin de la poche hydrophobe. L'insertion d'un agoniste dans la poche hydrophobe change la conformation du LBD d'une façon telle que l'hélice 12 se rabatte sur la poche hydrophobe et stabilise la liaison du ligand. Cette structure permet aussi de créer une surface d'interaction pour la liaison des coactivateurs.

Même si le AR peut être activé à capacité maximale à la fois par la testostérone et la DHT, la DHT se lie au récepteur avec une plus grande affinité (Deslypere et al., 1992). Le complexe que le AR forme avec la DHT est plus stable que celui avec la testostérone et cela se traduit par une augmentation dans la demi-vie du complexe récepteur-ligand (Zhou et al., 1995a). La dégradation du AR est deux fois plus rapide en présence de testostérone comparé à la DHT confirmant des études antérieures montrant que l'occupation du récepteur par son ligand est un facteur important dans la stabilisation du récepteur (Kemppainen et al., 1992). Dans certains tissus, l'action des androgènes est réalisée seulement par la liaison à la DHT comme lors du développement sexuel mâle. L'action différentielle des différents androgènes peut être attribuée à l'activation des gènes cibles des androgènes par les complexes AR-DHT, mais non par les complexes, moins stables, AR-testostérone.

De nombreuses mutations dans le LBD influencent la liaison au ligand, l'interaction avec des médicaments à activité antiandrogénique (flutamide,

Figure 5. **Structure tridimensionnelle du LBD du PR en présence de son ligand, la progestine.** Le LBD du PR partage une grande homologie de structure avec le LBD du AR. Les hélices 3, 5, 7, 11, 12 du LBD sont impliquées dans la création de la poche hydrophobe pour le ligand. H, hélice α ; S, feuillet β . Figure tirée de Williams et al., (1998) Nature, 393(6683), 392-396.



bicalutamide, nilutamide) et l'activité globale du récepteur. L'étude des génotypes de patients atteints de syndrome d'insensibilité aux androgènes a révélé près d'une centaine de mutations ponctuelles différentes à travers le LBD altérant la conformation du récepteur et modulant l'interaction avec les différents ligands (Sultan et al., 1993). La majorité de ces mutations résultent en des codons stop prématurés menant à la synthèse d'un récepteur tronqué dont la fonction de liaison au ligand est perdue (McPhaul et al., 1993).

Une mutation ponctuelle du LBD du AR est retrouvée chez la lignée cellulaire humaine de carcinome de la prostate LNCaP. La mutation est située au niveau du codon de l'acide aminé 877 et la thréonine à cette position est convertie en une alanine (Veldscholte et al., 1990a). Cette substitution augmente l'affinité de la liaison des ligands non-androgéniques que sont les progestines et l'oestradiol et inverse les effets antagonistes de plusieurs anti-androgènes, rendant les cellules pharmacorésistantes (Veldscholte et al., 1990b ; 1992a,b). La considération de ce type de mutations est importante dans le traitement par l'anti-androgène flutamide de patients atteints de cancer de la prostate. Chez un tiers des patients, l'arrêt du traitement avec la flutamide diminue la production de la PSA (prostate-specific antigen), un marqueur du développement du cancer de la prostate, suggérant des effets androgéniques (Figg et al., 1995).

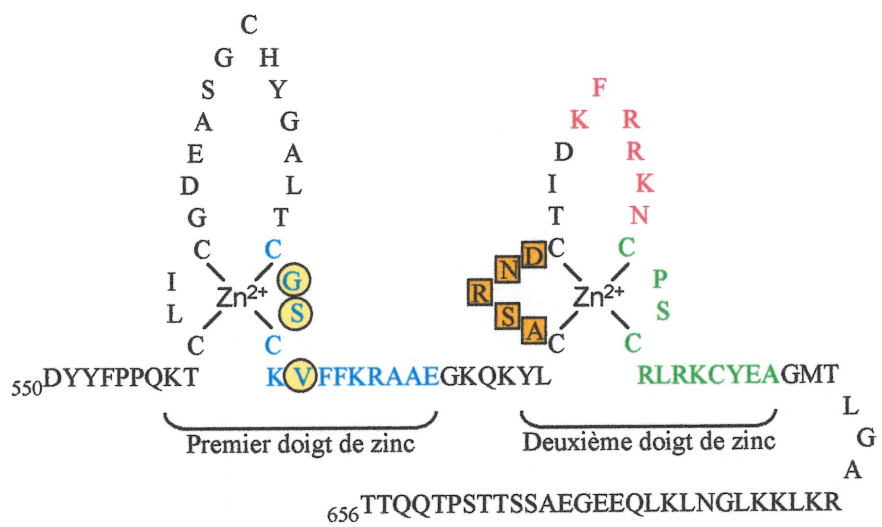
Une autre substitution retrouvée dans une région du LBD hautement conservée convertit la valine en position 730 en une méthionine. Cette mutation semble interférer avec la liaison de la protéine de choc thermique hsp90 (Newmark et al., 1992). Des mutations analogues retrouvées dans la même région hautement conservée dans le GR empêchent la liaison à hsp90. Ceci résulte en un récepteur possédant une activité constitutive qui est le tiers de l'activité d'un récepteur normal activé par son ligand (Housley et al., 1990). De façon similaire, la mutation retrouvée dans AR pourrait faciliter la progression de cancer de la prostate par exemple en rendant le récepteur actif de façon constitutive.

1.2.3 Domaine de liaison à l'ADN

Comme chez les autres récepteurs stéroïdiens, le DBD du AR contient 66 acides aminés comprenant neuf résidus cystéines conservés. Huit d'entre eux sont impliqués dans la formation de deux doigts de zinc de type II, dans lesquels un atome de zinc est coordonné par quatre résidus cystéines (figure 6) (Freedman et al., 1988 ; 1992). L'absence de zinc empêche la liaison à l'ADN par le DBD et l'addition de zinc restaure cette activité.

Le DBD du AR montre une grande homologie de séquence avec les DBD de GR, de PR et de MR (Hollenberg et al., 1985 ; Misrahi et al., 1987 ; Arriza et al., 1987 ; Lubahn et al., 1988b). Dû à cette grande homologie de séquence AR, GR, PR et MR reconnaissent la même séquence d'ADN. Ceci a pu être mis en évidence dans des expériences de transfection et de liaison à l'ADN *in vitro*. De plus, plusieurs des conclusions concernant les interactions entre le récepteur et les gènes cibles dans les cas du PR, GR et MR semblent également applicables pour le AR, surtout les données qui découlent de l'analyse cristallographique du DBD du GR qui a permis de déterminer la fonction des deux motifs de doigts de zinc (Luisi et al., 1991). Le doigt de zinc situé du côté amino-terminal du DBD du AR expose une hélice α au sillon majeur de l'ADN. Les résidus de cette hélice α aussi appelée hélice de reconnaissance de l'ADN forment des contacts avec les bases de l'ADN et dirigent ainsi la liaison spécifique aux éléments de réponse aux androgènes (ARE). Le second motif de doigts de zinc participe à la stabilisation des interactions récepteur-ADN ainsi qu'à la dimérisation des récepteurs lorsque ceux-ci se lient à l'ADN (Umesono et al., 1989 ; Tsai et al., 1994). La nature de cette dimérisation semble être différente entre les récepteurs stéroïdiens et les autres récepteurs nucléaires. Les récepteurs stéroïdiens forment une dimérisation symétrique forçant ces récepteurs à se lier à des séquences palindromiques. Chez certains récepteurs nucléaires, la dimérisation se fait de manière asymétrique, c'est à dire tête-à-queue, pour permettre une liaison à des séquences d'ADN répétées de façon directe (Towers et al., 1993 ; Perlmann et al., 1993 ; Kurokawa et al., 1993).

Figure 6. **Représentation des doigts de zinc du DBD du AR.** La séquence des acides aminés 550 à 656 du AR est représentée. Les acides aminés en bleu à la base du premier doigt de zinc représentent l'hélice de reconnaissance de l'ADN. En rouge et en vert sont représentés les acides aminés formant les deux hélices α du deuxième doigt de zinc. Les acides aminés dans des cercles jaunes font partie de la boîte P, responsable de la liaison spécifique à l'ADN. Les acides aminés dans des carrés oranges forment la boîte D, impliquée dans la stabilisation des interactions récepteur-ADN et dans la dimérisation.



1.2.3.1 Éléments de spécificité de la reconnaissance de l'ADN par les récepteurs nucléaires

Les séquences d'ADN reconnues par AR, GR, PR et MR sont sous la forme de palindromes imparfaits avec trois paires de bases séparant les deux demi-sites (Nordeen et al., 1990 ; Freedman et al., 1993). Pour faciliter la lecture du texte, le terme GRE pour élément de réponse aux glucocorticoïdes sera utilisé dans cette section pour la séquence d'ADN reconnue par ces quatre récepteurs stéroïdiens, AGAACA NNN TGTTCT. Bien que l'autre type de récepteur stéroïdiens, représenté par les récepteurs des oestrogènes, lie également des palindromes, les ERs reconnaissent une séquence légèrement différente, PuGGTCA NNN TGACCPy, aussi appelée élément de réponse aux oestrogènes (ERE). Les différences majeures entre ces deux éléments de réponse sont les deux paires de bases centrales dans chaque demi-site soit AGAACA versus PuGGTCA. Le demi-site PuGGTCA est aussi reconnu par d'autres récepteurs nucléaires comme TR, RAR, RXR, VDR et des récepteurs orphelins. Ceux-ci se lient à des demi-sites PuGGTCA disposés soit sous forme palindromique avec aucun espace entre les demi-sites, soit en répétition directe avec trois à cinq paires de bases entre les deux demi-sites, soit à un seul demi-site. La spécificité de liaison aux éléments de réponse aux hormones est donc une combinaison de la séquence primaire, de l'orientation et de l'espacement des demi-sites.

1.2.3.2 Reconnaissance de la séquence primaire

À la base du premier doigt de zinc se trouvent dans l'hélice de reconnaissance de l'ADN, trois acides aminés (Gly577, Ser578 et Val581) conservés chez le AR, GR, PR et MR, qui sont nécessaires pour la reconnaissance spécifique des motifs d'ADN liés (figure 6) (Danielsen et al., 1989 ; Umesono et al., 1989). Ces trois résidus composent la boîte P (tableau I). Chez le ER, cette boîte P contient des résidus différents (Glu203, Gly204 et Ala207) (Mader et al., 1989). Les récepteurs nucléaires

Tableau I. Séquence en acide aminé des boîtes P de différents récepteurs nucléaires et séquence de leur motif d'ADN reconnu.

Récepteurs nucléaires	Boîte P	Demi-site reconnu
Récepteurs stéroïdiens :		
AR	GSCKV	AGAACA
GR	GSCKV	AGAACA
MR	GSCKV	AGAACA
PR	GSCKV	AGAACA
ER	EGCKA	PuGGTCA
Autres récepteurs nucléaires :		
TR	EGCKG	PuGGTCA
RAR	EGCKG	PuGGTCA
RXR	EGCKG	PuGGTCA
VDR	EGCKG	PuGGTCA

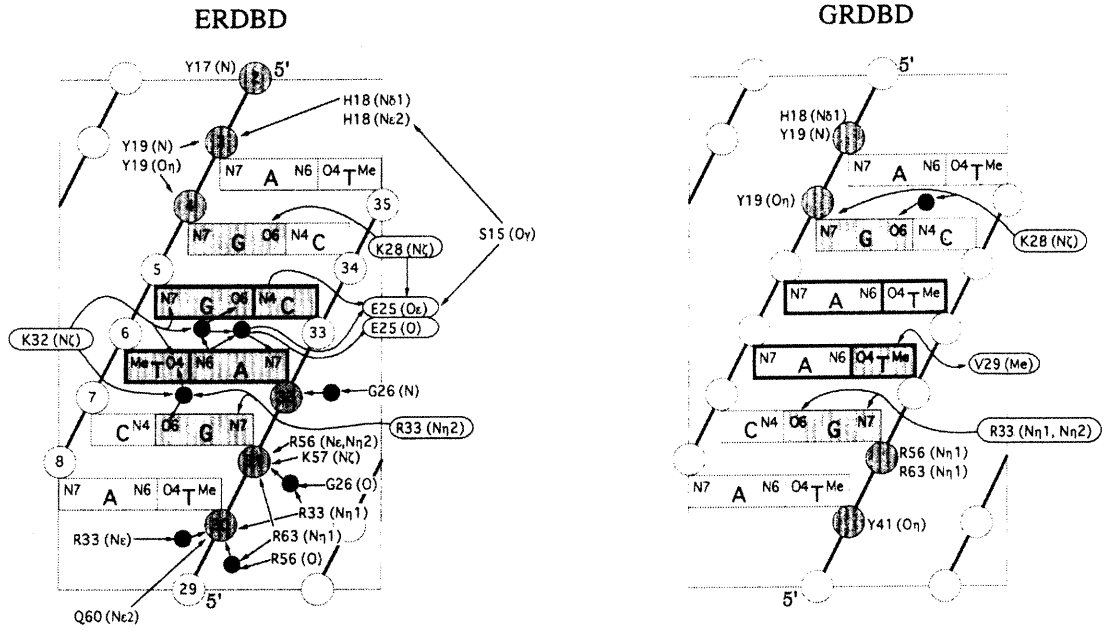
Les résidus de la boîte P sont en gras. GR, récepteur des glucocorticoïdes; MR, récepteur des minéralocorticoïdes; PR, récepteur de la progestérone; ER, récepteur des oestrogènes; TR, récepteur de l'hormone thyroïde; RAR, récepteur de l'acide rétinoïque; RXR, récepteur des rétinoïdes X; VDR, récepteur de la vitamine D.

qui reconnaissent le demi-site PuGGTCA ont par ailleurs une boîte P similaire à celle du ER (les deux premiers résidus sont conservés et une glycine ou une sérine est retrouvée à la place de l'alanine). La substitution de la boîte P de GR par celui de ER et vice versa est suffisante pour échanger le motif d'ADN reconnu (Mader et al., 1989 ; Umesono et al., 1989). Selon les données cristallographiques du DBD du GR lié à son GRE, Val581 effectue une liaison de type Van der Waals avec le T en position +3 du GRE (figure 7B) (Luisi et al., 1991). Pour le ER, la cristallographie du DBD du récepteur lié à un ERE démontre que Glu203 établit un contact direct avec le C en position +4 et un contact indirect par le biais d'une molécule d'eau avec le A en position +3 du ERE (figure 7B) (Schwabe et al., 1993). À l'extérieur de la boîte P, deux autres résidus de l'hélice de reconnaissance de l'ADN font des contacts avec l'ADN de façon similaire dans les complexes GR-DBD/GRE et ER-DBD/ERE (figure 7). La lysine en position 206 du ER interagit avec le G en position -5 du ERE. De plus toujours chez le ER, l'arginine en position 211 forme des contacts directs avec le G en position +2 du ERE. La lysine et l'arginine correspondantes chez le GR font les mêmes interactions avec les G aussi conservés dans le GRE. Cependant, un autre résidu dans l'hélice de reconnaissance de l'ADN du ER (Lys210), mais pas le résidu identique trouvé chez le GR, interagit avec les bases complémentaires des résidus avec lesquels Glu203 fait des contacts. Lorsque les complexes GR-DBD/GRE et ER-DBD/ERE sont superposés à partir de leur hélice de reconnaissance de l'ADN, la conformation de l'ADN diffère d'un complexe à l'autre. Cette différence peut jouer un rôle dans la discrimination de la séquence reconnue et expliquer les modes d'interaction avec l'ADN légèrement différents du ER et du GR.

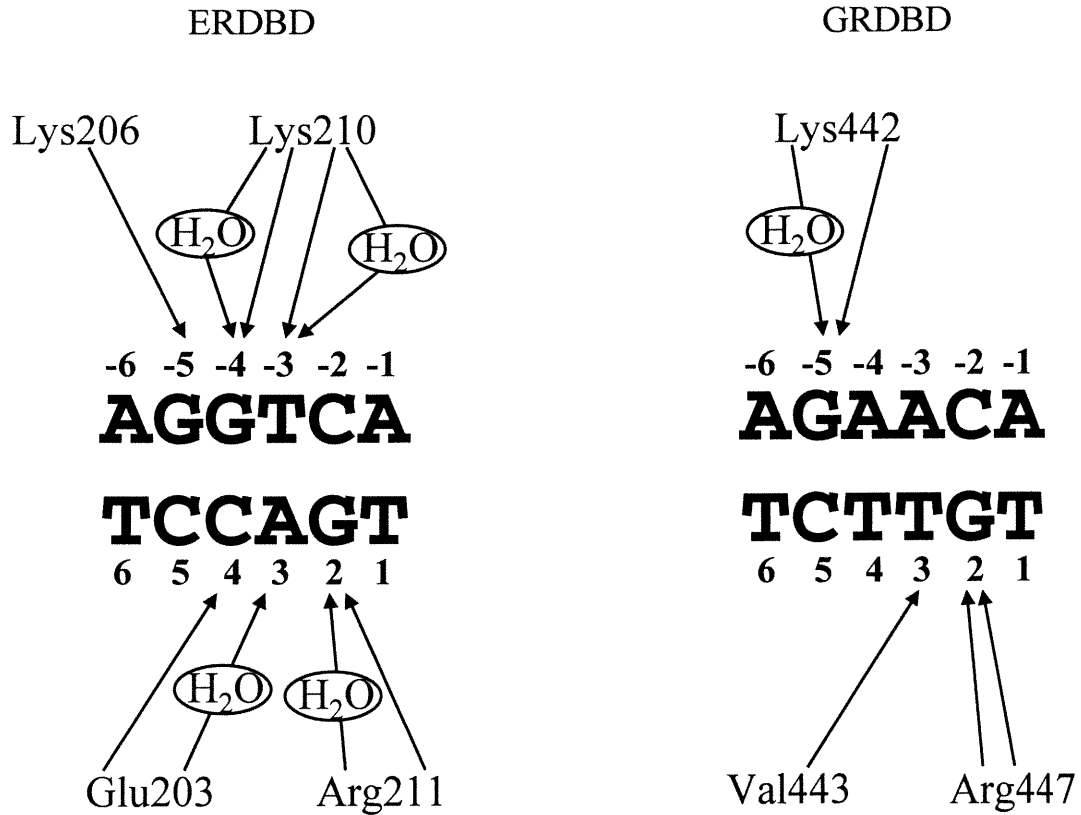
Comme dans d'autres complexes protéine-ADN, la surface d'interaction entre les DBDs et le sillon majeur de l'ADN est supportée par de nombreuses liaisons hydrogènes avec le squelette de phosphate de l'ADN. Des substitutions de résidus contactant les phosphates chez le GR résultent en une perte de la fonction de liaison à l'ADN (Schena et al., 1989).

Figure 7. Les déterminants moléculaires de la reconnaissance spécifique de l'ADN par les récepteurs stéroïdiens. (A) Schémas des contacts spécifiques à l'interface récepteur-ADN selon la cristallographie des complexes ERDBD-ERE et GRDBD-GRE₃₄. Figures tirées de Schwabe et al., (1993) *Cell*, 75(3), 567-578 et de Luisi et al., (1991) *Nature*, 352(6335), 497-505, pour la cristallographie du ERDBD et GRDBD respectivement. (B) La valine en position 443 du GR effectue une liaison de type Van der Waals avec le T en position +3 du GRE. Les autres liaisons sont des liaisons hydrogènes directes ou par le biais d'une molécule d'eau. Les résidus Lys206 et Arg211 chez le ER correspondent aux résidus Lys442 et Arg447 chez le GR, et ils établissent des contacts semblables sur les G en position -5 et +2. Les autres contacts sont spécifiques à chaque récepteur. Sur le schéma du GRDBD, le numéro de l'acide aminé correspondant chez le AR se trouve entre parenthèses.

A.



B.



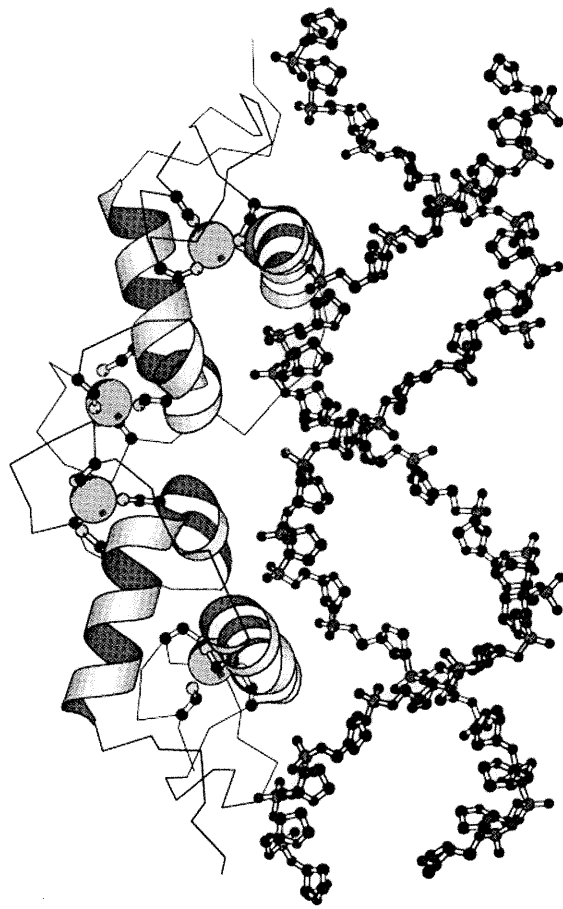
1.2.3.3 Orientation et espacement des motifs répétés

Les DBDs du GR et du ER se lient à leur éléments de réponse de façon coopérative (Dahlman-Wright et al., 1990 ; Alroy et al., 1992 ; Schwabe et al., 1993). La liaison du premier monomère augmente l'affinité du second. Lorsque le deuxième monomère se lie à l'ADN, le premier monomère l'oriente sur son demi-site à travers la formation de contacts protéine-protéine (figure 8). De plus, certains contacts au squelette de phosphates de l'ADN ne semblent s'effectuer que lorsqu'il y a dimérisation des DBDs sur l'élément de réponse (Schwabe et al., 1993). Si l'espace entre les demi-sites du GRE ou du ERE est augmenté ou diminué d'une paire de base, les deux monomères continuent à se lier à l'élément de réponse mais l'affinité de liaison du second DBD est plus faible que pour le premier DBD dû à une perte de la coopération (Luisi et al., 1991; Schwabe et al., 1993). De plus, les GREs avec des espaces entre les demi-sites modifiés empêchent l'activité transcriptionnelle dans les cellules transfectées (Nordeen et al., 1990).

Dans les palindromes reconnus par les récepteurs stéroïdiens, les centres des demi-sites hexamériques sont séparés par neuf paires de bases, ce qui est proche d'un pas d'hélice d'ADN (10.5 paires de bases par tour). Cela permet aux deux monomères de se retrouver sur la même face du duplex d'ADN (figure 8).

Les structures des cristaux des complexes GR-DBD/GRE et ER-DBD/ERE montrent que l'interface de dimérisation est auto-complémentaire et est stabilisée par des ponts salins, des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes. Les contacts sont effectués par des résidus situés entre les deux premières cystéines conservées dans le deuxième doigt de zinc (figure 6). Cette région nommée boîte D a été identifiée comme une région de dimérisation et elle joue un rôle essentiel dans la discrimination de l'espace entre les demi-sites des éléments de réponse aux hormones (Umesono et al., 1989). Des contacts impliqués dans la dimérisation sont aussi effectués par des résidus situés dans le court segment d'hélice α dans le sommet du second doigt de zinc et par un autre résidu situé entre la boîte D et cette hélice α . La boîte D est hautement conservée parmi les récepteurs stéroïdiens liant le

Figure 8. **Liaison des DBDs du GR à l'ADN.** Les DBDs du GR et du AR partagent une grande homologie. Les deux monomères du GR se retrouvent sur la même face du duplex d'ADN. Les monomères forment un dimère symétrique à cause du motif palindromique de la séquence d'ADN liée. Les ions zinc sont figurés en sphères. Seul le squelette de phosphates de l'ADN est montré par souci de clarté. Figure tirée de Freedman et al., (1993) *Journal of Cellular Biochemistry*, 51, 140-150.



motif AGAACA. Les substitutions qui s'y trouvent conservent la nature de l'interface de dimérisation. Mais dans le contexte des récepteurs nucléaires, la boîte D varie et son rôle dans la dimérisation diffère selon les différents sous-groupes de récepteurs. Par exemple, la substitution de la boîte D du GR par celle du VDR et la substitution de la boîte D de ER par celle de RAR abolissent la liaison à l'ADN de façon coopérative (Freedman et al., 1991; Mader et al., 1993).

1.2.4 Domaines de transactivation

Les récepteurs nucléaires possèdent deux domaines de transactivation appelés AF-1 et AF-2 (fonction d'activation-1 et fonction d'activation-2). Le principal domaine de transactivation du AR est le AF-1, trouvé dans la région amino-terminale de la protéine (figure 4). Ce domaine est le moins conservé parmi les domaines des récepteurs nucléaires et chez le AR, il comprend plus de 500 acides aminés (plus de la moitié de la protéine du AR) mais n'est encodé que par un seul exon (exon 1) (Chang et al., 1988). Ce domaine de transactivation recrute des coactivateurs et interagit avec des composants de la machinerie transcriptionnelle de base.

Plusieurs expériences de délétion de parties du domaine de transactivation ont permis de définir les régions nécessaires pour l'activité de transactivation. Même si presque toute la région amino-terminale est requise pour une activité de transactivation maximale, deux régions chevauchantes d'activation de la transcription ont été identifiées chez le AR humain soient TAU-1 (entre les acides aminés 110-379) et TAU-5 (entre les acides aminés 369-494) (Jenster et al., 1995). Ces unités d'activation transcriptionnelle diffèrent suivant leur activité en présence ou absence du LBD. TAU-1 est active seulement en présence du LBD et TAU-5 est active de façon constitutive en l'absence du LBD. Les délétions de larges segments de la région amino-terminale de la protéine pourraient enlever des acides aminés spécifiques impliqués dans l'activité transcriptionnelle ou pourraient causer un changement conformationnel qui réduirait l'activité du AR. Des études plus avancées sur le AR du rat ont localisé une région entre les acides aminés 154-167

correspondant à une hélice α amphipathique et une autre région entre les acides aminés 295-359 (Chamberlain et al., 1996). Différentes régions de transactivation pourraient être actives selon les différents promoteurs, permettant le recrutement de divers coactivateurs et donnant ainsi un mécanisme de régulation spécifique au gène.

Le domaine amino-terminal du AR se distingue par son polymorphisme provenant de la présence de plusieurs régions de répétitions du même acide aminé. Deux d'entre eux varient en longueur parmi la population humaine soient une région de polyglutamines (CAG) située dans le domaine amino-terminal et une région de polyglycines (GGN) située plus en aval dans le domaine amino-terminal (figure 4) (La Spada et al., 1991 ; Sleddens et al., 1992). La fonction exacte de ces régions n'est pas connue mais la longueur de la région de polyglutamines semble influencer l'activité et la stabilité du AR (Mhatre et al., 1993 ; Chamberlain et al., 1994 ; Jenster et al., 1994 ; Kazemi-Esfarjani et al., 1995 ; Choong et al., 1996).

La répétition des nucléotides CAG est impliquée dans une dégénérescence des motoneurones associée à une atrophie spino-bulbaire au niveau musculaire, aussi appelée maladie de Kennedy. Les hommes souffrant de cette maladie sont fréquemment atteints d'une insensibilité partielle aux androgènes. Chez les individus normaux, le nombre de répétitions des nucléotides CAG varie entre 9 et 33 avec une moyenne de 21 ± 2 répétitions. Chez les patients atteints d'atrophie spino-bulbaire musculaire, cette région polymorphique peut contenir entre 38 et 75 répétitions de glutamines (La Spada et al., 1991 ; Matsuura et al., 1992), résultant en des ARs avec une activité de transactivation réduite (Mhatre et al., 1993). L'expansion de la région de polyglutamines semble favoriser l'interaction et la séquestration des protéines contenant de courtes régions de polyglutamines tel le coactivateur transcriptionnel CBP, comme observé également chez d'autres protéines avec de longues régions de polyglutamines (huntingtin et atrophin) (Nucifora et al., 2001).

D'autre part, une augmentation du risque de cancer de la prostate est associée avec des répétitions de CAG plus courtes. L'origine raciale et ethnique est un facteur dans l'incidence du cancer de la prostate. En effet, l'incidence parmi les américains ayant des origines africaines est deux fois plus élevée que chez les autres américains

(Ross et al., 1990). Ces données corrélerent avec la longueur de la région polymorphique de CAG. Les américains d'origine africaine ont en moyenne 18 répétitions de CAG, les américains de peau blanche ont en moyenne 21 codons CAG répétés tandis que les américains d'origine asiatique, qui ont les risques les moins élevés de développer un cancer de la prostate, ont 22 répétitions de CAG (Coetzee et al., 1994). L'effet d'allèles plus courts au niveau des répétitions de CAG sur la fonction des récepteurs est une augmentation de l'activité de transactivation (Irvine et al., 1995, Kazemi-Esfarjani et al., 1995). Deux mécanismes possibles peuvent expliquer ce phénomène. La première possibilité est que la région de répétition des triplets CAG puisse agir comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle avec plus d'effet d'inhibition lorsque la région est plus longue. L'autre alternative est que le récepteur avec une plus courte région polymorphique de glutamines pourrait avoir une conformation plus stable dans le noyau, permettant d'échapper à une dégradation protéolytique dans le cytoplasme. Cependant, il n'est pas clair s'il s'agit d'une résistance à la dégradation ou plutôt d'une répartition nucléo-cytoplasmique différente.

La région de polyglycines contient entre 10 et 31 répétitions de cet acide aminé, la majorité de la population humaine ayant 24 répétitions. Cette région est aussi associée avec une augmentation des risques de cancer de la prostate lorsque la région contient 16 répétitions et moins (Irvine et al., 1995). De plus la délétion de la région de polyglycines diminue la capacité du AR mutant à activer la transcription (Gao et al., 1996).

Le domaine AF-1 semble fonctionner en partie à travers le recrutement de coactivateurs. La majeure partie du domaine amino-terminal du AR (résidus 1-494) est requise pour une activité transcriptionnelle maximale en présence du coactivateur de la famille des p160, SRC-1 (Robyr et al., 2000). Cette région du AR interagit avec une région riche en glutamine de SRC-1 qui est hautement conservée parmi les coactivateurs de la famille des p160. Il a été démontré qu'une région de polyglutamines plus longue sur le AR, allant jusqu'à 42 répétitions, inhibe l'activité transcriptionnelle basale ainsi que l'activité de la transcription médiée par les

coactivateurs de la famille des p160 sans modifier l'expression du AR (Irvine et al., 2000). Ceci peut expliquer en partie les effets phénotypiques observés avec une longueur accrue de la région de polyglutamines.

Un second domaine de transactivation, AF-2 (activation fonction 2), se trouve dans le LBD du AR (figure 4). Sa fonction d'activation de la transcription hormono-dépendante contribue moins à l'activité du récepteur que celle de AF-1. Le domaine AF-2 est une petite région bien conservée parmi les récepteurs nucléaires et sa séquence consiste en une structure α -hélicale composée d'un acide glutamique hautement conservé entouré par des résidus hydrophobes. Cette hélice a une conformation différente en réponse à la liaison du ligand puisqu'elle se rabat sur la poche hydrophobe, emprisonnant le ligand et formant une surface capable de recruter les coactivateurs. Le domaine AF-2 interagit alors avec les motifs LXXLL des coactivateurs où L correspond à une leucine et X à n'importe quel acide aminé (Bevan et al., 1999). Dans le cas du AR, l'interaction entre AF-2 et les motifs LXXLL des coactivateurs est faible et AF-2 du AR préfère interagir avec le motif FXXLF (F pour phénylalanine) situé dans le domaine amino-terminal du AR. Cette interaction entre les domaines amino et carboxy-terminaux du AR, qui a lieu en présence du ligand, augmente la stabilité du récepteur (Zhou et al., 1995a). Deux régions amino-terminales sont impliquées dans cette interaction : les 36 premiers acides aminés de la région amino-terminale ainsi que les résidus 371-503 (Berrevoets et al., 1998). De plus, cette interaction ralentit la dissociation du ligand et prévient la dégradation protéolytique. Une interaction entre le domaine amino-terminal et le LBD a aussi été décrite chez le ER α et le PR mais la fonction exacte et son importance ne sont pas encore bien expliquées (Kraus et al., 1995 ; Tetel et al., 1997 ; 1999). De plus, il semblerait que chez le ER α , l'interaction entre le domaine amino-terminal et le LBD soit indirecte et serait médiée par les coactivateurs (Benecke et al., 2000). Finalement, il n'est pas encore bien démontré si ces interactions entre domaines s'effectuent de façon intramoléculaire ou intermoléculaire lorsque le AR est lié à son ARE sous la forme d'homodimère. Certains proposent un modèle de dimérisation avec une interaction intermoléculaire entre les régions des extrémités de

la molécule du AR dans en une configuration antiparallèle (figure 9) (Wong et al., 1993 ; Langley et al., 1995).

En l'absence de ligand, le LBD du AR prévient l'activité de transactivation du domaine amino-terminal. La délétion du LBD rend le récepteur actif de façon constitutive (Gao et al., 1996). Il semble probable que la transactivation ciblée des gènes sous le contrôle du AR requiert l'activité coordonnée des domaines AF-1 et AF-2, même si la contribution de chaque domaine peut dépendre du promoteur et du contexte cellulaire.

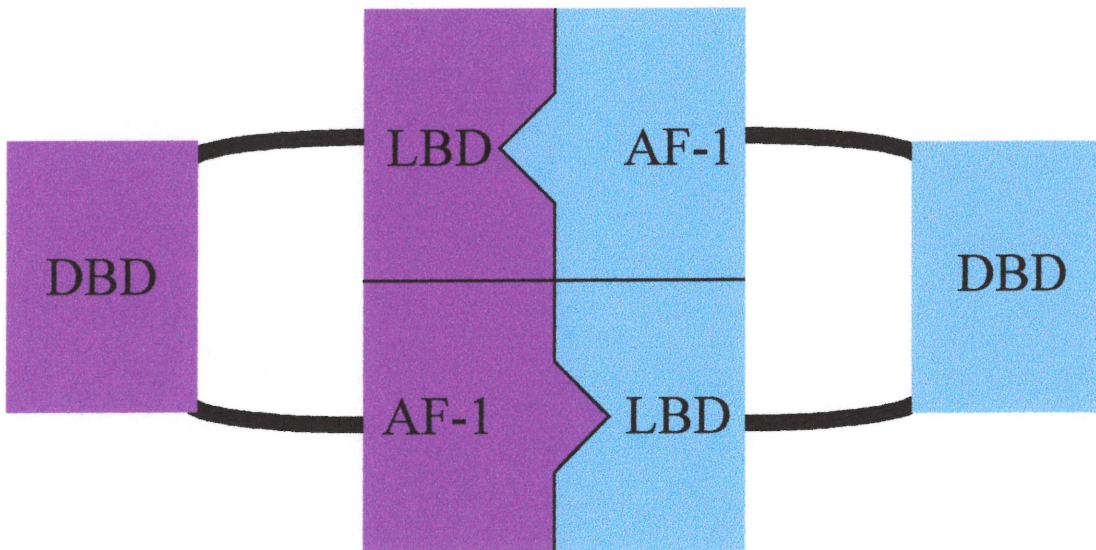
1.2.5 Coactivateurs et corépresseurs

La liaison des homodimères du AR aux éléments de réponse semble réguler la transcription des gènes cibles à travers des interactions avec des coactivateurs et avec les facteurs de transcription qui constituent le complexe de préinitiation de la transcription (Trapman et al., 1996). Les coactivateurs ou corépresseurs sont des protéines recrutées par les facteurs de transcription liés à l'ADN et jouent un rôle dans la régulation de la transcription.

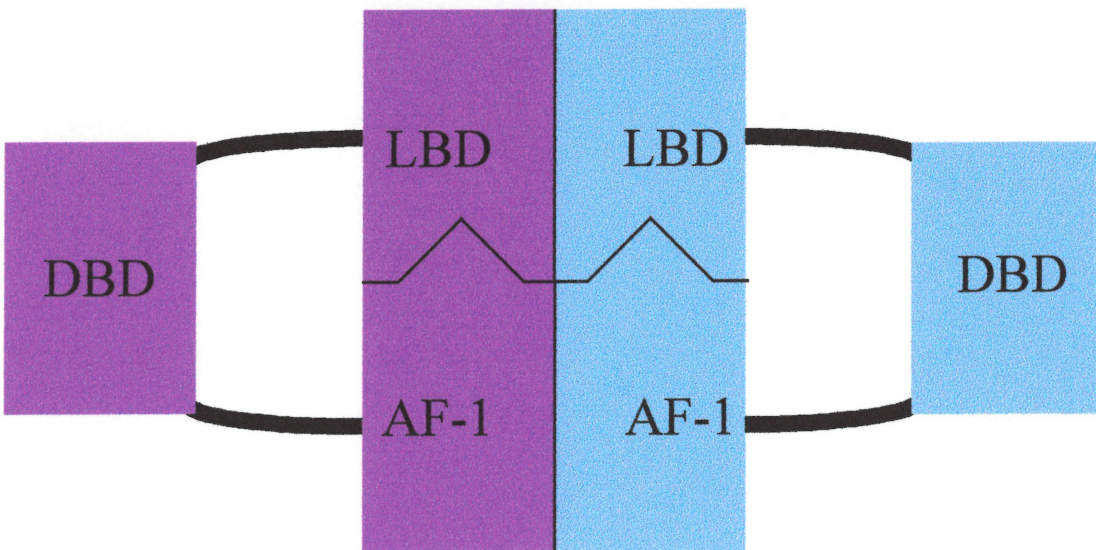
Les coactivateurs transmettent le signal d'activation en participant au recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base et peuvent remodeler et modifier la structure de la chromatine. De nombreux coactivateurs font partie de complexes protéiques et agissent comme pont entre le récepteur lié à l'ADN et les protéines du complexe de préinitiation de la transcription (Horwitz et al., 1996 ; Glass et al., 1997 ; Shibata et al., 1997). D'autres coactivateurs peuvent modifier la structure de la chromatine par modification post-traductionnelle des histones. L'acétylation des histones engendre une déstabilisation de la structure des nucléosomes permettant ainsi aux promoteurs d'être plus accessibles à la liaison d'autres facteurs de transcriptions ainsi que de la machinerie transcriptionnelle de base (Wolffe et al., 1996). Finalement, ils peuvent interagir avec d'autres protéines qui vont elles-mêmes modifier la structure de la chromatine (par exemple arginine methyl-transferases).

Figure 9. Modèles de la formation d'homodimères du AR. (A) Le LBD d'un AR interagit avec l'AF-1 dans le domaine amino-terminal de l'autre AR pour permettre une interaction intermoléculaire générant une configuration anti-parallèle des récepteurs par rapport à la liaison à l'ADN. (B) Le LBD et l'AF-1 du même AR interagissent ensemble de façon intramoléculaire résultant en une configuration parallèle des récepteurs. LBD, domaine de liaison au ligand ; AF-1, fonction d'activation 1 ; DBD, domaine de liaison à l'ADN. Figure inspirée de Cude et al., (1999) *Journal of Molecular Medicine*, 77, 419-426.

A.



B.



Les domaines des récepteurs stéroïdiens impliqués dans le recrutement des coactivateurs sont le domaine de transactivation amino-terminal et le LBD (Aarnisalo et al., 1998 ; Ding et al., 1998 ; Onate et al., 1998). Ces deux domaines coopèrent pour recruter les coactivateurs au niveau du dimère du AR lié à l'ADN. En effet, l'interaction entre le domaine amino-terminal du AR et son LBD crée une nouvelle interface d'interaction protéine-protéine (Ikonen et al., 1997 ; Berrevoets et al., 1998). De plus, différentes régions du domaine de transactivation amino-terminal sont responsables de l'activation de la transcription en absence ou en présence du LBD (Jenster et al., 1995 ; Ikonen et al., 1997).

Plusieurs coactivateurs des récepteurs stéroïdiens ont été identifiés et clonés dont trois membres de la famille des protéines de 160 kDa (p160) comme SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), TIF-2/GRIP-1 (transcription intermediary factor-2/ glucocorticoid receptor-interacting protein-1) et AIB-1 (amplified in breast cancer-1) (Onate et al., 1995 ; Voegel et al., 1996 ; Hong et al., 1996 ; Anzick et al., 1997). Pour le AR, le recrutement de ces coactivateurs de la famille des p160 requiert une interaction fonctionnelle entre le domaine de transactivation amino-terminal et le LBD, et l'interaction avec les coactivateurs se fait avec des parties du domaine de transactivation amino-terminal (Alen et al., 1999).

D'autres récepteurs stéroïdiens, comme PR et GR, peuvent se lier aux mêmes séquences d'ADN que celles reconnues par le AR. Le recrutement de coactivateurs spécifiques pourrait donc être impliqué dans la spécificité de la régulation transcriptionnelle. La protéine ARA70 a été caractérisée comme coactivateur spécifique du AR (Yeh et al., 1996). Ce coactivateur augmente l'activité transcriptionnelle du AR de manière hormono-dépendante, mais n'augmente pas l'activité transcriptionnelle des autres récepteurs stéroïdiens. L'activité transcriptionnelle du AR est aussi augmentée en présence de ARA70 dans les cellules humaines de cancer de la prostate DU145 traitées avec des anti-androgènes (Miyamoto et al., 1998). Ces résultats suggèrent que ARA70 médie l'activité agoniste des anti-androgènes sur le AR.

Une petite séquence LXXLL (aussi appelée NR box, nuclear receptor box), présente chez les coactivateurs, est nécessaire et suffisante pour diriger la liaison des coactivateurs aux récepteurs nucléaires liés à leur ligands (Heery et al., 1997). La capacité de ces protéines à augmenter l'activité transcriptionnelle dépend de l'intégrité des motifs LXXLL et de certains résidus hydrophobes clés dans l'hélice conservée dans le LBD des récepteurs nucléaires. De plus, la spécificité de la liaison de ces motifs aux récepteurs nucléaires n'est pas la même et les résidus immédiatement adjacents aux motifs LXXLL semblent être importants dans ces interactions. (Ding et al., 1998 ; Darimont et al., 1998). Cependant, la liaison du AR aux motifs LXXLL des coactivateurs de la famille des p160 est faible. Il a été démontré qu'une séquence, FXXLF, est reconnue spécifiquement par le AR. Ce motif est présent chez les coactivateurs spécifiques du AR : ARA70, ARA55 et ARA54 (He et al., 2002). Le motif FXXLF des coactivateurs interagit préférentiellement avec le LBD du AR et pourrait entrer en compétition avec le motif FXXLF du domaine amino-terminal impliqué dans l'interaction entre les domaines amino et carboxy-terminaux du AR.

Les corépresseurs, quant à eux, répriment la transcription en inhibant la formation du complexe de préinitiation de la transcription, en induisant une méthylation des histones à des sites spécifiques, en recrutant des protéines avec une activité histone déacétylase stabilisant la chromatine sous sa forme inactive, ou en inhibant l'interaction du récepteur avec des coactivateurs (Shibata et al., 1997). Certains récepteurs nucléaires (RARs, RXRs, TRs et VDR et quelques récepteurs orphelins) peuvent lier l'ADN en absence du ligand et réprimer la transcription. Ces récepteurs recrutent des corépresseurs au niveau de l'ADN et ceci maintient la chromatine sous sa forme inactive empêchant la liaison des facteurs de transcription au niveau de la région du promoteur (Alland et al., 1997 ; Heinzl et al., 1997 ; Nagy et al., 1997). Même si AR et d'autres récepteurs stéroïdiens ne se lient pas à l'ADN en absence de leur ligand, certains antagonistes induisent la liaison de corépresseurs pour inhiber la transcription. Par exemple, le tamoxifène ou la mifepristone répriment la transcription en recrutant des corépresseurs au niveau de leur récepteur,

respectivement ER ou PR (Smith et al., 1997 ; Wagner et al., 1998). Il se pourrait que la liaison de certains anti-androgènes au AR ait le même effet de répression via le recrutement de corépresseurs.

Le SHP (short heterodimer partner), un récepteur orphelin, inhibe à la fois la transactivation de AF-1 et AF-2. Le SHP inhibe l'activité du AR en compétitionnant avec les coactivateurs du AR (Gobinet et al., 2001). Ceci démontre une autre façon possible de réprimer l'action des récepteurs nucléaires, appelée squelching.

1.2.6 Phosphorylation

Les récepteurs stéroïdiens sont des phosphoprotéines qui sont régulées par des protéines ayant des activités kinases (Kemppainen et al., 1992). La phosphorylation de résidus spécifiques pourrait être impliquée dans plusieurs des fonctions du récepteur : liaison du ligand, translocation nucléaire, dimérisation du récepteur, liaison à l'ADN et les interactions protéines-protéines (Blok et al., 1996). Vingt-et-un sites potentiels de phosphorylation ont été identifiés chez le AR, dont quinze localisés dans le domaine de transactivation en amino-terminal (Kuiper et al., 1993). Par contre, seulement cinq de ces sites ont été confirmés : trois résidus dans la région amino-terminale (Ser81, Ser94 et Ser515) et deux résidus dans la région charnière entre le DBD et le LBD (Ser650 et Ser662) (Jenster et al., 1994 ; Zhou et al., 1995b ; Blok et al., 1998).

Les études de mutagenèse sur les résidus Ser81 et Ser94 n'ont aucun effet sur l'activité du AR, mais une mutation du résidu Ser650 résulte en une réduction de 30% de l'activité transcriptionnelle (Jenster et al., 1994 ; Zhou et al., 1995b). Des études ont démontré que lorsque la phosphorylation de deux résidus sérines situés dans la région charnière entre le DBD et le LBD (Ser641 et Ser653) est réduite, une diminution de l'activité transcriptionnelle du AR ainsi qu'une diminution de la liaison à son ligand étaient observées (Blok et al., 1998). La phosphorylation semble donc jouer un rôle important dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du AR.

Les résultats d'études effectuées sur l'interaction entre le LBD et la région amino-terminale ont suggéré que six sites potentiels de phosphorylation situés dans la région amino-terminale pourraient moduler la formation d'homodimères (Langley et al., 1995). L'analyse future de tous les sites potentiels de phosphorylation par mutation permettra de mieux définir le rôle de la phosphorylation dans le fonctionnement du AR.

1.2.7 Spécificité de l'action du AR

En dépit de son homologie avec les autres récepteurs stéroïdiens et du fait que AR peut se lier à un GRE classique, l'action du AR est très spécifique. De plus, les androgènes génèrent des réponses variées dans les différents tissus, démontrant que la régulation des gènes par AR est spécifique selon le tissu. Cette action histo-spécifique peut être obtenue grâce à divers facteurs, incluant une régulation de l'expression du AR selon le tissu et l'interaction avec des facteurs de transcription spécifiques au promoteur ou au tissu.

Plusieurs gènes sous le contrôle des androgènes ont été identifiés chez la souris et le rat mais peu ont été identifiés chez l'humain. Même si certains de ces gènes sont spécifiques à certains tissus (par exemple : PSA et phosphatase acide prostatique) (Shan et al., 1997 ; Virkkunen et al., 1994 ; Cleutjens et al., 1996), plusieurs autres sont impliqués dans des voies de proliférations cellulaire (CDK2, CDK4) (Lu et al., 1997).

Bien que le site GRE soit fixé avec une affinité forte par le AR comme par le GR, PR et MR, d'autres sites plus faibles pourraient avoir une sélectivité plus grande pour le AR. Certains gènes contiennent en effet des éléments de réponse spécifiques au AR comme dans le cas du gène de la probasine (Claessens et al., 1996). Deux AREs ont été caractérisés dans la région 5' flanquant le gène de la probasine et l'un d'eux, ARE2, interagit qu'avec le DBD du AR et non avec le DBD du GR. De plus, dans les expériences de transactivation, l'ARE de la probasine n'est induit que par les androgènes et non par les glucocorticoïdes.

Dans d'autres cas, la régulation spécifique des gènes cibles par le AR résulte des séquences flanquant les AREs ou de la synergie entre plusieurs AREs faibles. Aussi un changement de conformation spécifique à l'élément de réponse lié, l'expression histo-spécifique des coactivateurs et la synergie de l'action du AR avec d'autres facteurs spécifiques au promoteur peuvent contribuer aux effets spécifiques du AR selon le tissu et le promoteur. Enfin, le dialogue avec d'autres voies de signalisation selon le tissu peut conférer une spécificité de l'action des androgènes. Le AR n'est pas seulement activé par la liaison à son ligand, il peut aussi être activé par les voies de transduction du signal par l'entremise des kinases. La manipulation des voies des kinases peut mener à la phosphorylation des résidus sérine, thréonine ou tyrosine du AR. Cependant, les sites de phosphorylation les plus appropriés à cette voie alternative d'activation du AR ne sont pas encore bien connus. Aussi, il n'est pas encore bien compris si la phosphorylation d'autres composantes dans l'expression des gènes régulés par AR, comme les coactivateurs, est importante pour l'activation du AR de manière ligand-indépendante.

1.3 Pathologies associées aux androgènes

Les androgènes sont impliqués dans de nombreuses maladies, allant de manifestations bénignes comme la calvitie jusqu'à des maladies graves comme le cancer de la prostate. La prochaine section sera consacrée aux pathologies humaines affectant la signalisation par les androgènes.

1.3.1 Déficience en 5 α -réductase

Même si la testostérone et la DHT interagissent avec le AR, la DHT a une affinité de liaison deux fois supérieure et se dissocie du récepteur avec une vitesse cinq fois moins grande (Grino et al., 1990). L'incapacité de la 5 α -réductase à convertir la testostérone en DHT résulte en des cas de pseudo-hermaphrodisme avec des individus de génotype mâle (46 X,Y) ayant des structures uro-génitales internes

masculines mais un appareil génital externe soit ambigu, soit féminisé (Griffin et al., 1989)

Les niveaux de testostérone présents lors de l'embryogenèse sont suffisants pour induire une virilisation des canaux de Wolff en structures internes, soient l'épididyme, le conduit déférent et les vésicules séminales. Par contre, le développement des structures externes de l'appareil génital a besoin de DHT ou de niveaux de testostérone plus élevés. Chez certains de ces individus, les taux croissants de testostérone durant la puberté peuvent suffire à causer la virilisation des caractéristiques sexuelles secondaires comme la pousse de la barbe (Imperato-McGinley et al., 1991).

1.3.2 Maladie de Kennedy

La maladie de Kennedy est une atrophie spino-bulbaire musculaire progressive dans laquelle la dégénérescence des motoneurons entraîne une faiblesse et une atrophie musculaire (Harding et al., 1982 ; Choi et al., 1993). Les symptômes cliniques se manifestent généralement lorsque le patient atteint entre 30 et 60 ans (Nance et al., 1997). Cette maladie est transmise sur un mode récessif lié au chromosome X. De plus, les patients démontrent souvent une gynécomastie (développement anormal des glandes mammaires chez l'homme), une atrophie testiculaire et une fertilité réduite en raison d'une insensibilité aux androgènes ainsi que des niveaux élevés de LH (luteinizing hormone), de FSH (follicle-stimulating hormone) et d'oestradiol (La Spada et al., 1991 ; Choi et al., 1993).

Les individus affectés sont porteurs d'une expansion de la région de triplets CAG (codant pour l'acide aminé glutamine), située à l'extrémité 5' de la région codante pour le gène du AR (La Spada et al., 1991 ; Matsuura et al., 1992). En effet les individus atteints de la maladie de Kennedy ont des régions polymorphiques de CAG contenant 38 à 75 répétitions, chez les individus normaux le nombre de répétitions se situe entre 9 et 33. L'augmentation de la longueur de la région

polymorphique CAG affecte négativement l'activation transcriptionnelle du AR régie par les coactivateurs de la famille des p160 (Irvine et al., 2000).

Des régions similaires de polyglutamines sont retrouvées dans une variété d'autres protéines (huntingtin, atrophin, ataxins) qui sont impliquées dans le mécanisme d'autres maladies dégénératives comme la maladie d'Huntington (Wilmot et al., 1998). Ceci démontre l'existence d'un mécanisme neurotoxique commun des régions polymorphiques de CAG répétés.

1.3.3 Cancer du sein chez l'homme

Le cancer du sein chez l'homme est une maladie très rare et ne compte que pour 1% de tous les cas de cancer du sein diagnostiqués. Très peu est connu sur les facteurs génétiques influençant le développement du cancer du sein chez l'homme. Des études ont relié certains cas de cancer du sein chez le mâle avec des mutations du gène BRCA2, avec une fréquence très variée des mutations dans ces études (entre 4 et 40%) (Friedman et al., 1997). D'autres facteurs génétiques pourraient être associés à cette maladie. Par exemple, un polymorphisme dans le gène CYP17 codant pour l'enzyme cytochrome P450c17alpha, enzyme impliquée dans la synthèse des oestrogènes est associé avec un risque plus élevé de cancer du sein chez l'homme.

Près de 80% des tumeurs mammaires humaines expriment le AR (Kuenen-Boumeester et al., 1992), indépendamment du niveau d'expression du ER et du PR. Cependant le rôle des androgènes et de leur récepteur dans le développement du cancer du sein n'est pas encore bien connu et est probablement complexe. En effet, les androgènes peuvent être convertis en oestrogènes par l'action de l'enzyme aromatase, conduisant ainsi à une action stimulatrice sur la croissance des cellules mammaires. Cependant, androgènes et oestrogènes ont souvent des actions opposées sur les tissus ciblés. Deux mutations ponctuelles dans le AR ont été retrouvées chez des individus atteints du syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes et développant un cancer du sein (Wooster et al., 1992 ; Lobaccaro et al., 1993). Il se

pourrait donc que le développement de ces cas de cancer du sein chez les mâles soit dû à la perte d'une action protectrice des androgènes sur les cellules mammaires.

De plus, une augmentation de la longueur de la région de polyglutamines dans le domaine amino-terminal du AR est retrouvée dans la maladie de Kennedy, associée à un développement anormal des seins chez l'individu atteint. Des études sur le rôle de cette région de polyglutamines du AR dans le développement du cancer du sein chez l'homme suggère qu'une région de polyglutamines plus longue pourrait être impliquée dans quelques cas de cancer du sein chez l'homme (Young et al., 2000). Enfin, le rôle de l'autre région polymorphique du AR, la région de polyglycines, pourrait aussi être étudié dans le contexte du cancer du sein chez l'homme. Il est à noter que l'augmentation de la région de polyglycines corrèle avec une diminution de l'activité du AR, suggérant encore une fois un rôle protecteur du AR dans le cancer du sein, à l'opposé de ce qui est observé dans le cancer de la prostate.

1.3.4 Hyperplasie bénigne de la prostate et cancer de la prostate

Les androgènes jouant un rôle clé dans le développement et le fonctionnement de la prostate, il n'est donc pas surprenant qu'ils soient impliqués dans des pathologies de la prostate. Le traitement aux anti-androgènes ou aux oestrogènes ainsi que l'ablation des testicules du fœtus empêchent le développement de la prostate. La différenciation des cellules épithéliales est dépendante de l'action des androgènes (Cunha et al., 1987). Le maintien des structures et fonctions de la prostate est aussi dépendant de la présence continue des androgènes.

L'hyperplasie bénigne de la prostate est relié à un grossissement de la prostate fréquent chez l'homme vieillissant. C'est une maladie commune qui affecte près de 80% des hommes âgés de plus de 60 ans (Berry et al., 1984). La prostate est une glande qui se trouve autour de l'urètre à la sortie de la vessie (col vésical). Un grossissement de la prostate occasionne une compression de l'urètre et par conséquent, une obstruction au passage de l'urine. Il survient alors une diminution du débit urinaire, le patient se trouvant dans l'incapacité de vider complètement sa

vessie, laissant un résidu urinaire après la miction. Les traitements peuvent être d'ordre médicamenteux ou chirurgicaux. Plus récemment l'utilisation du laser et de la thermothérapie s'avère des plus prometteuses.

Les études se contredisent quant au niveau de la DHT dans les tissus de la prostate. Certains démontrent un niveau plus élevé en DHT (Trachtenberg et al., 1980), d'autres indiquent que le niveau est semblable pour les tissus normaux et dans la prostate hyperplasique (Coffey et al., 1990). De plus, les études sur le niveau du AR dans le noyau de cellules provenant de prostate atteinte d'hyperplasie bénigne se contredisent aussi (Barrack et al., 1983 ; Miyamoto et al., 1993). Il se pourrait que les différences au niveau de l'action des androgènes soient les causes de l'hyperplasie bénigne de la prostate et non le contenu en DHT et en AR.

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme âgé de plus de 40 ans. Près de 30% des hommes de plus de 50 ans ont au niveau de leur prostate un cancer de niveau microscopique qui y réside de façon asymptomatique (Coffey et al., 1993). Le diagnostic est essentiellement basé sur la palpation rectale, le dosage sanguin du PSA, et en cas de doute par une ponction-biopsie de la prostate. Les traitements envisagés pour les tumeurs localisées sont une prostatectomie ou une thérapie par radiation. Dans les cas de cancer de la prostate métastatique, les traitements ont pour but d'inhiber l'action du AR (traitement hormonal aux anti-androgènes) ou d'empêcher la croissance des cellules androgènes-dépendantes en bloquant la production de la testostérone (orchidectomie (résection des testicules), oestrogénothérapie ou traitement aux analogues de la LHRH (luteinizing hormone releasing hormone)) (McLeod et al., 1993 ; Soloway et al., 1993 ; Labrie et al., 1993). L'oestrogénothérapie utilise des composés ayant des propriétés oestrogéniques dans le but de diminuer la production de testostérone par les testicules puisque la testostérone peut être transformée en oestrogène. Le traitement aux analogues de la LHRH maintient un bas niveau en testostérone dans le corps en régulant son expression par les testicules.

L'existence de tumeurs de la prostate apparemment insensibles à la thérapie endocrinienne met en doute l'importance du AR. Dans ces cas, la croissance de la

tumeur peut se faire en l'absence de testostérone provenant des testicules et plus précisément de la DHT, son métabolite. Mais certaines études montrent que le AR est un composant important dans une proportion des tumeurs résistantes à la thérapie par hormone. Entre autre, la plupart des tumeurs résistantes à la thérapie par hormone montrent de hauts niveaux d'expression du AR (Hobisch et al., 1995). Aussi, une localisation prédominante du AR dans le noyau des cellules de ces tumeurs semble indiquer une conformation active du récepteur. Dans certains cas, le niveau d'expression de l'ARN messenger du AR est plus élevé qu'avant le début de la thérapie endocrinienne (Koivisto et al., 1997). La surexpression du AR peut être le résultat d'une amplification du gène du AR. Des études d'hybridation *in situ* démontrent une amplification du gène du AR dans 30% des cas récurrents de tumeur résistante à l'hormone suivant l'orchidectomie (Visakorpi et al., 1995). Il semblerait que l'amplification du AR dans les tumeurs soit une réponse à la thérapie hormonale.

Un autre mécanisme pouvant expliquer un AR fonctionnellement actif dans les cancers de la prostate résistants à la thérapie hormonale serait un récepteur tronqué actif de façon constitutive ou un récepteur altéré au niveau de sa structure par des mutations. Parmi les mutations, cinq se situant dans le LBD sont bien étudiées. La plus connue est la mutation ponctuelle du AR retrouvée chez la lignée cellulaire LNCaP décrite dans la section du LBD. Cette mutation a un effet dramatique sur la spécificité du ligand ainsi que sur la fonction de transactivation du AR (Schuurmans et al., 1988 ; Veldscholte et al., 1992a ; Tan et al., 1997). Non seulement cette mutation est retrouvée dans la lignée cellulaire LNCaP, mais aussi chez des patients avec des tumeurs résistantes à la thérapie par hormone (Gaddipati et al., 1994 ; Suzuki et al., 1996 ; Taplin et al., 1999). Deux autres cas décrits de cancer de la prostate correspondent à une mutation sur le même résidu Thr877, mais cette fois-ci changé en sérine. Cela résulte aussi en un récepteur avec une spécificité de ligand diminuée (Taplin et al., 1995 ; Fenton et al., 1997).

Trois autres substitutions d'acides aminés dans le LBD résultent en des récepteurs mutants avec une perte de spécificité de ligand de façon similaire à la mutation Thr877Ala précédemment décrite. Une d'entre elles se trouve dans la

région adjacente, His874Tyr (Tan et al., 1997). Les deux autres se trouvent ailleurs dans le LBD, Val715Met et Val730Met (Culig et al., 1993 ; Newmark et al., 1992). Il serait très probable que les substitutions de ces acides aminés modifient le repliement du LBD du AR ou affectent l'interaction directe entre le récepteur et son ligand. Même si la structure tridimensionnelle du LBD du AR n'est pas connue, la comparaison avec le LBD du PR indique un effet direct sur la liaison du ligand des mutations Thr877Ala et Thr877Ser (Williams et al., 1998).

Un moyen alternatif pour l'activation de la fonction du AR sont les voies de transduction du signal passant par les voies des kinases, indépendantes de la présence des hormones stéroïdiennes. La manipulation des voies des kinases peut culminer vers la phosphorylation du AR sur des résidus sérine, thréonine et tyrosine. Comme démontré pour la lignée cellulaire LNCaP, l'expression des gènes cibles du AR peut être activée par les facteurs de croissance et cytokines comme IGF-1, KGF, EGF et IL-6.

Aussi, la surexpression des coactivateurs du AR, comme le coactivateur spécifique ARA70, peut augmenter la fonction de transactivation du AR en présence de l'oestradiol et des anti-androgènes (Miyamoto et al., 1998 ; Yeh et al., 1998). Des études futures devraient déterminer quels coactivateurs sont surexprimés dans les cellules du cancer de la prostate.

Finalement, la région polymorphique de glutamines plus courte dans le domaine amino-terminal du AR corrèle avec un haut taux de risque de développer un cancer de la prostate (Giovannucci et al., 1997 ; Stanford et al., 1997). Une région de polyglutamines plus courte rend le AR plus actif (Chamberlain et al., 1994 ; Kazemi-Esfarjani et al., 1995). La différence en activité est modeste et n'est observée qu'avec de très courtes régions polymorphiques de glutamines. Il semblerait que cet effet stimulateur de cette région sur la croissance des tumeurs soit lent et impossible à bien étudier dans des expériences de courtes durées.

1.3.5 Syndrome d'insensibilité aux androgènes

Le syndrome d'insensibilité aux androgènes est une maladie liée au chromosome X transmissible de façon génétique découlant de mutations dans le gène du AR. Il existe trois niveaux de sévérité de syndrome : syndrome d'insensibilité complète aux androgènes (CAIS), syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes (PAIS) et syndrome d'insensibilité léger aux androgènes (MAIS).

Les principaux phénotypes chez les individus atteints de CAIS sont : un appareil génital externe féminin ; un vagin incomplet et non-fonctionnel ; une absence de structures dérivées des canaux de Wolff comme l'épididyme, le conduit déférent et les vésicules séminales ; absence de la prostate ; développement de gynécomastie ; l'absence des poils pubiens et axillaires (Quigley et al., 1995). Généralement, les niveaux de testostérone ainsi que ceux de LH sont augmentés à la puberté. Les hauts niveaux en testostérone sont aussi le substrat de l'aromatase produisant des quantités considérables d'oestrogènes responsable d'une plus grande féminisation chez les individus atteints de CAIS.

Les patients atteints de PAIS présentent des phénotypes variant entre une apparence principalement féminine avec un appareil génital ambigu (appareil génital externe féminin ou légère augmentation du clitoris avec une certaine fusion des lèvres), et des phénotypes principalement mâles (syndrome de Reifenstein). Les patients souffrant du syndrome de Reifenstein peuvent présenter un micropénis, une malformation du pénis sur lequel l'urètre se trouve sur la face inférieure et/ou des testicules cachés. Chez les patients atteints de PAIS, les structures dérivées des canaux de Wolff peuvent être partiellement ou complètement développées selon les fonctions perdues par le AR. À la puberté, des augmentations des niveaux de LH, de testostérone et d'oestradiol sont observées mais le degré de féminisation est en général moins grand que chez les patients atteints de CAIS. Finalement, les individus atteints de MAIS présentent de légers symptômes de virilisation incomplète. Ces individus sont parfois infertiles.

Dans le gène de AR, quatre types de mutations peuvent être détectées au niveau de l'ADN chez les patients atteints d'insensibilité aux androgènes : (1) des mutations ponctuelles menant à une substitution d'acide aminé ou à une apparition de codon stop prématuré, (2) des insertions ou délétions de nucléotides résultant à un changement du cadre de lecture ou à une terminaison prématurée, (3) des délétions partielles (plus de dix nucléotides) ou complètes dans la région 3' du gène du AR, et (4) des mutations dans les introns affectant l'épissage de l'ARN du AR.

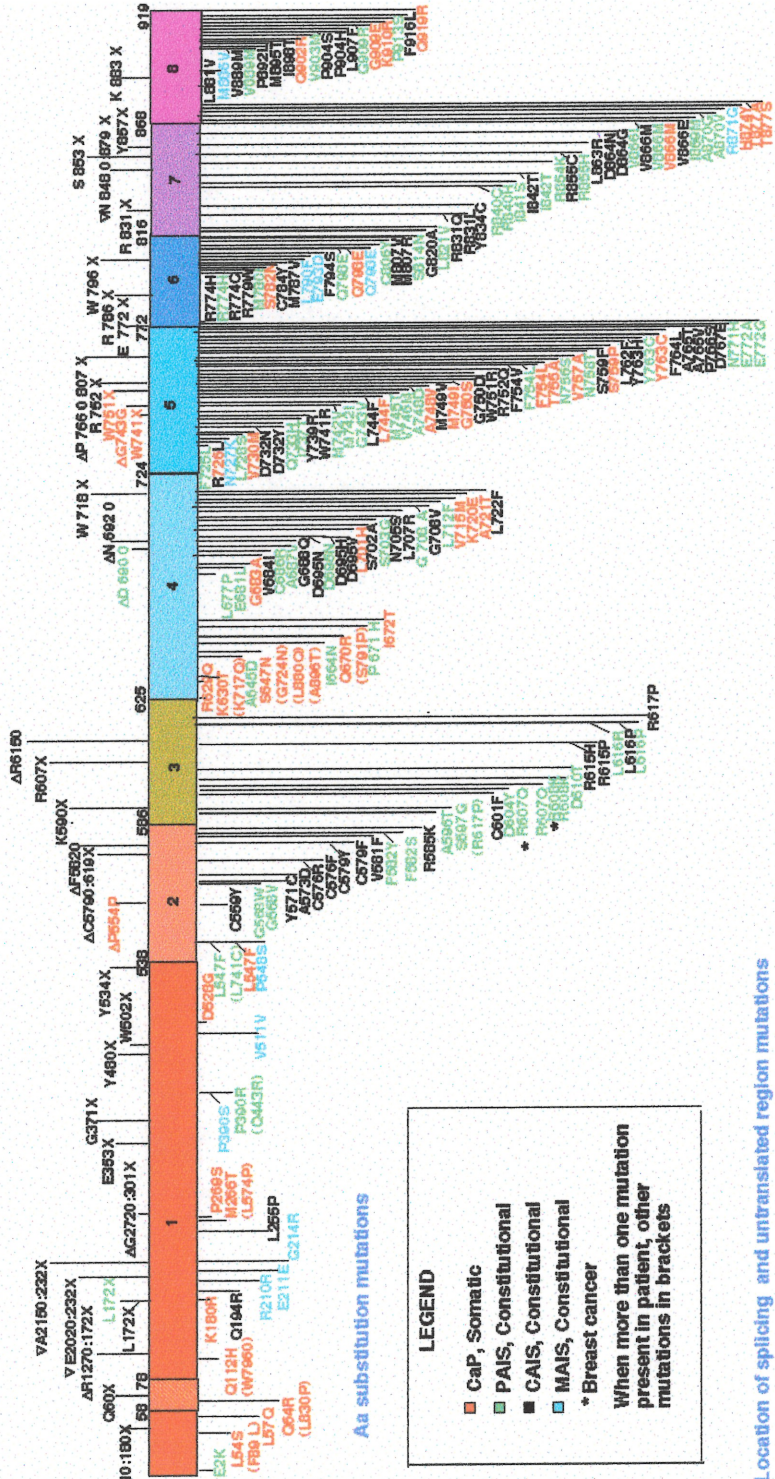
Les mutations ne sont pas fréquentes dans le domaine de transactivation amino-terminal et la plupart des mutations répertoriées résultent en des codon stop ou des terminaisons prématurées causées par les insertions ou délétions de nucléotides (figure 10). Les mutations sont plus fréquentes dans le DBD et les substitutions d'acides aminés laissent le AR se lier normalement à l'hormone mais les propriétés de dimérisation et de liaison à l'ADN du récepteur sont affectées, et par conséquent l'activation de la transcription est aussi affectée. Plus de 30 mutations sont déjà publiées et leur conséquence peut être prédite en se basant sur les données de la cristallographie du DBD du GR (Luisi et al., 1991). Les mutations des cystéines conservées coordonnant les motifs de doigts de zinc résultent tous en des cas de CAIS. Les mutations sur les résidus impliqués dans l'interaction avec les groupes phosphates de l'ADN et dans l'interaction avec les paires de bases de l'ADN entraînent aussi des cas de syndrome d'insensibilité aux androgènes. Plusieurs mutations au niveau de résidus arginines conservés situées dans le DBD réduisent l'activité transcriptionnelle (Mowszowicz et al., 1993 ; Saunders et al., 1992 ; Zoppi et al., 1992). Ces mutations sont situées dans le second doigt de zinc et pourraient interférer avec la liaison du AR à l'ADN.

Deux autres mutations intéressantes se trouvent au niveau des arginines 607 et 608 dans le deuxième motif de doigts de zinc du DBD. Des mutations sur ces résidus arginines sont retrouvées chez des individus atteints de PAIS développant un cancer du sein (Wooster et al., 1992 ; Lobaccaro et al., 1993). Une autre mutation sur un acide aminé de la boîte D situé dans le second motif de doigts de zinc, Ala596Thr, abolit la dimérisation du récepteur chez un patient atteint de PAIS (Gast et al., 1995).

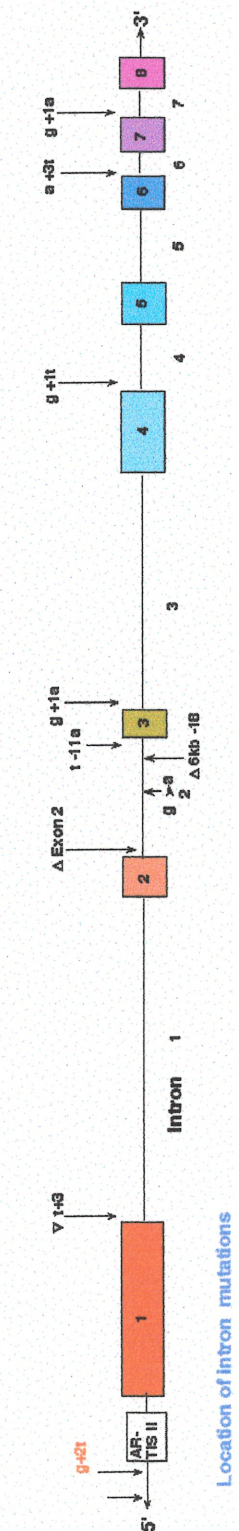
Figure 10. **Banque des mutations dans le gène du AR.** Localisation des mutations répertoriées au 18 janvier 1999 dans le gène du AR. La plupart de ces mutations entraînent un syndrome d'insensibilité aux androgènes (PAIS, CAIS ou MAIS). Figure tirée de www.mcgill.ca/androgendb/ .

ANDROGEN RECEPTOR GENE MUTATIONS, 18-1-99

Premature termination mutations or 1-4 bp Δ



Location of splicing and untranslated region mutations



Location of intron mutations

En se basant sur les données de la structure tri-dimensionnelle du LBD du PR (Williams et al., 1998), il n'est pas surprenant de retrouver plusieurs mutations surtout sur les résidus de l'hélice 5 et de la boucle β (régions impliquées dans la formation de la poche hydrophobe avec les hélices 3, 7, 11 et 12) affectant la liaison au ligand de différentes manières (faible liaison et constante de dissociation normale (Kd), liaison normale et Kd élevé ou pas de liaison). Il est à noter que la région responsable de la fonction d'activation 2 (AF-2) située dans le LBD du AR présente peu de mutations naturelles. Seulement une mutation est observée sur le résidu Ile898 entraînant un cas de patient atteint de CAIS (Hiort et al., 1998). Les mutations dans cette région se trouvant dans l'hélice 12 semblent avoir moins d'impact sur la fonction du AR que les mutations localisées dans l'hélice 5 et la boucle β où presque chaque résidu est retrouvé muté chez des individus atteints de syndrome d'insensibilité aux androgènes.

Peu de cas de délétion partielle ou complète du gène du AR sont rapportés, indiquant une faible fréquence pour ce type de défaut du gène du AR (Brown et al., 1988 ; Akin et al., 1991 ; Quigley et al., 1992). Tous les cas rapportés sont retrouvés chez des patients atteints de CAIS sauf dans deux cas où l'exon 4 est absent menant ainsi à des cas de MAIS (Akin et al., 1991). La délétion de l'exon 3 ou de l'exon 4 garde le même cadre de lecture résultant en des récepteurs non fonctionnels auxquels manquent soit le deuxième motif de doigts de zinc, soit la région charnière entre le DBD et le LBD et la région amino-terminale du LBD. Dans le cas de la délétion de l'exon 3, le LBD est intact et fonctionnel.

Des mutations encore plus rares menant à un syndrome d'insensibilité aux androgènes sont aussi rapportées. Il s'agit de mutations affectant l'épissage de l'ARN du AR. Les mutations décrites sont des substitutions dans le site donneur de l'épissage menant à des épissages déficients avec comme conséquences des pertes d'un ou de plusieurs exons (Ris-Stalpers et al., 1990 ; Evans et al., 1991 ; Yong et al., 1994). Les cas rapportés entraînent tous des cas de CAIS chez les individus atteints.

1.4 Projet de recherche

Les androgènes sont nécessaires dans le développement sexuel mâle ainsi que dans la virilisation lors de la puberté. L'hormone agit par l'entremise de son récepteur, AR, et celui-ci est un facteur de transcription faisant partie de la superfamille des récepteurs stéroïdiens. Les mutations dans le AR sont très fréquentes et sont souvent des mutations ponctuelles. Ces mutations peuvent mener à des phénotypes variés associés à différents degrés d'insensibilité aux androgènes. Les cas extrêmes d'insensibilité totale (CAIS) sont détectés chez des individus ayant un génotype mâles (46, XY) mais avec un appareil génital externe femelle. Les phénotypes des patients atteints de PAIS sont très variés mais sont en général caractérisés par un appareil génital externe ambigu. Les mutations associées à des cas de CAIS ou PAIS peuvent affecter n'importe lequel des trois principaux domaines fonctionnels du AR selon leurs localisations. Ces mutations sont surtout retrouvées dans le LBD, résultant en des récepteurs mutants dont les propriétés de liaison au ligand sont altérées. Des mutations sont aussi fréquemment retrouvées dans le DBD et elles entraînent généralement une perte partielle ou totale de la liaison à l'ADN. Le degré de perte d'affinité pour l'ADN pourrait suffire à expliquer l'association de ces mutations avec des cas de CAIS (perte totale de liaison) ou de PAIS (diminution partielle d'affinité). Cependant une altération de la spécificité de liaison à l'ADN pourrait aussi contribuer à la diversité des phénotypes associés au syndrome de PAIS. Les mutations dans le domaine amino-terminal de transactivation sont, quant à elles, moins fréquentes.

Récemment, un garçon a été diagnostiqué à la naissance avec une hypospadias sévère consistant à un déplacement du méat urinaire vers la région scrotale, un scrotum séparé en deux et les testicules non descendus. Les observations cliniques indiquaient un cas de PAIS. Un tel cas avait été diagnostiqué chez un oncle maternel du patient, mais celui-ci n'avait pas subi d'examen génétique. Le séquençage du gène du AR du patient a permis de détecter une conversion du codon GGA codant pour une glycine en position 577 en un codon AGA correspondant à une arginine.

Cette nouvelle mutation, G577R, se trouve dans le DBD. Le résidu impliqué fait partie de la boîte P responsable de la discrimination entre les motifs ERE et GRE/ARE. Le DBD du AR possède une grande homologie avec celui du GR. Selon les données de la cristallographie du DBD du GR, ce résidu n'est pas impliqué dans des contacts avec l'ADN. Par contre, l'acide aminé correspondant chez ER (un acide glutamique) fait un contact direct avec les deux paires de bases centrales du motif d'ADN lié.

Le but de ce projet était d'étudier l'effet de cette mutation sur l'affinité et la sélectivité de la liaison du AR à l'ADN. Les études de liaison à l'ADN ont été effectuées sur un ensemble de 16 sondes palindromiques d'ADN contenant le motif PuGNNCA, incluant le ERE et le GRE/ARE. De plus, l'effet de cette mutation sur la transactivation de promoteurs synthétiques contenant les motifs PuGNACA liés par AR a aussi été étudié, de même que la transactivation des promoteurs naturels contenant des palindromes imparfaits. Nos résultats ont permis de démontrer que l'effet de cette mutation est une diminution d'affinité inégale sur les différentes séquences liées par le AR, sans gain d'affinité sur les autres séquences examinées. Ces résultats suggèrent que la valine de la boîte P du AR reste le déterminant principal de spécificité dans le récepteur mutant, mais que cette spécificité est restreinte par le remplacement de la glycine en arginine.

CHAPITRE II – ARTICLE

A G577R mutation in the human androgen receptor P box results in selective decreases in DNA binding and in partial androgen insensitivity syndrome.

Nguyen, Denis¹, Steinberg, Sergey V. ¹, Rouault, Etienne¹, Chagnon, Samuel¹, Gottlieb, Bruce⁵, Pinsky, Leonard^{2,3,5}, Trifiro, Mark^{3,4,5} and Mader, Sylvie^{1,4,6*}

¹Department of Biochemistry, Université de Montréal; ²Department of Biology and Department of Pediatrics, McGill University; ³Department of Human Genetics, McGill University; ⁴Department of Medicine, McGill University; ⁵Lady Davis Institute for Medical Research, Sir M. B. Davis-Jewish General Hospital; ⁶McGill Center for Translational Research in Cancer.

* To whom correspondance should be addressed at : Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, C.P.6128 Succursale Centre Ville, Montréal, Québec H3C 3J7 Canada.

Tel: 514-3436111#5173, Fax: 514-3432210, E-mail: sylvie.mader@umontreal .ca

SUMMARY

We have characterized a novel mutation of the human androgen receptor (AR), G577R, associated with partial androgen insensitivity syndrome (PAIS). G577 is the first amino acid of the P box, a region crucial for the selectivity of receptor/DNA interaction. While the equivalent amino acid in the glucocorticoid receptor (also Gly) is not involved in DNA interaction, the residue at the same position in the estrogen receptor (Glu) interacts with the two central base pairs in the PuGGTCA motif. Using a panel of sixteen palindromic probes that differ in these base pairs (PuGNNCA) in gel shift experiments with either the AR DNA-binding domain or the full length receptor, we observed that the G577R mutation does not induce binding to probes that are not recognized by the wt AR. However, binding to the four PuGNACA elements recognized by the wt AR was affected to different degrees, resulting in an altered selectivity of DNA response element recognition. In particular AR-G577R did not interact with PuGGACA palindromes. Modeling of the complex between mutant AR and PuGNACA motifs indicates that the destabilizing effect of the mutation is due to a steric clash between the C β of Arg at position 1 of the P box and the methyl group of the second thymine residue in the TGTTCPy arm of the palindrome. In addition, the Arg side chain can interact with G or T at the next position (PuGCACA and PuGAACA elements, respectively). The presence of C is not favorable however due to incompatible charges, abrogating binding to the PuGGACA element. Transactivation of several natural or synthetic promoters containing PuGGACA motifs was drastically reduced by the G577R mutation. These data suggest that androgen target genes may be differentially affected by the G577R mutation, the first natural mutation characterized that alters the selectivity of

AR/DNA interaction. This type of mutation may thus contribute to the diversity of phenotypes associated with PAIS.

INTRODUCTION

Androgens are necessary for normal prenatal male sexual development (masculinization) and for secondary male sexual development around puberty (virilization). Mutations in the X-linked androgen receptor (AR) can lead to a wide range of clinical conditions associated with different degrees of androgen insensitivity (1). Complete androgen insensitivity syndrome (CAIS) corresponds to subjects with a male genotype (46, XY) but female external genitalia. Partial androgen insensitivity syndrome (PAIS) regroups a range of phenotypes with ambiguous external genitalia, and mild androgen insensitivity syndrome (MAIS) is associated with infertile individuals with male external genitalia (1).

The AR belongs to the superfamily of nuclear receptors, which includes receptors for steroid hormones, retinoic acid, vitamin D3 and thyroid hormone, as well as a large number of orphan receptors (2-4). Nuclear receptors contain six regions of homology organized in three main functional domains. Regions A-B and E-F, which are respectively poorly and well conserved within the family, coincide with two transcriptional activation domains (AF1 and AF2, respectively). Region E-F also contains a dimerization interface and the ligand-binding pocket, and binds coactivators in a ligand-dependent manner (5-7). Region C, the most conserved region, contains two zinc fingers and directs binding to specific sequences of DNA, the hormone response elements. These response elements are composed of PuG^A/TACA motifs, arranged as palindromes in the case of the steroid receptors (8-12). PuG^A/TACA motifs are recognized by receptors for glucocorticoid, androgen, progesterone or mineralocorticoids while PuG^G/TCA motifs are selectively bound by estrogen receptors and receptors for non-steroidal hormones (12-14). Each motif

is bound by one receptor, the two zinc fingers of the DNA-binding domain folding into a structural unit that establishes an array of non-specific contacts with phosphate groups and a few specific contacts with base pairs of the response motif via a DNA recognition helix in the first zinc finger (15,16). While some of these contacts are conserved in all nuclear receptors, three amino acids in this helix (P box) differ between estrogen receptors and other steroid receptors and are responsible for discrimination between the PuGGTCA and PuGAACA motifs (17-19). In addition, a dimerization interface in the second zinc finger (D box) is important for recognition of the spatial arrangement of these motifs as palindromes with a three base pair spacer (13,14,17,19,20).

Naturally occurring mutations in the AR are usually point mutations that can affect any of the three main functional domains, although most mutations cluster in the ligand binding domain, resulting in mutant receptors with altered ligand-binding properties (21,22). Mutations in the DNA-binding domain associated with androgen insensitivity syndrome usually result in a partial or complete loss of DNA binding (23-27), although defects in hormone binding have also been described (24). Here we report a new mutation of the AR that results in conversion of Gly 577 to Arg within the P box of this receptor. We have investigated the effect of this mutation on the affinity of the AR for its ligands and for its DNA response elements. Because of the localization of this mutation within the AR P box, we also investigated whether the G577R mutation altered the selectivity of receptor/DNA interaction. Finally, we have assessed the effect of this mutation on transactivation of synthetic promoters containing PuGNACA elements and natural promoters containing imperfect palindromic elements.

RESULTS

Characterization of mutation G577R in a patient with partial androgen insensitivity syndrome.

Genital skin fibroblasts (GSFs) were obtained from a patient with PAIS (see Materials and Methods) when corrective surgery was performed. AR sequences were amplified by PCR reaction using exon-specific probes and sequenced. A mutation converting a GGA triplet coding for G577 to an AGA triplet (Arg) was detected in exon 2, which encodes the first zinc finger of the AR DNA binding domain (Fig. 1). To ascertain that this mutation was not an artifact due to PCR amplification, exon 2 was reamplified by PCR and a second round of sequencing was performed, confirming the presence of the mutation.

Scatchard analysis was then performed by incubating genital skin fibroblasts with [1,2,4,5,6,7-³H]5 α -dihydrotestosterone (DHT, 110 Ci/mmol), or two synthetic non-metabolizable androgens, [17 α -methyl-³H] mibolerone (MB, 85 Ci/mmol) or [17 α -methyl-³H] methyltrienolone (MT, 86 Ci/mmol). K_d (0.11, 0.09 and 0.07 nM) and B_{max} (31, 37 and 28 fmol/g protein) values obtained were in the normal ranges. Because androgen dissociation rates could not be repeatedly measured using genital skin fibroblasts due to lack of material, the G577R mutation was reintroduced in the wild type receptor using site-directed mutagenesis; lack of other mutations in the region amplified by PCR was confirmed by sequencing. Expression vectors for wild type or mutant ARs were transiently expressed in HeLa or COS-1 cells, and Western analysis of whole cell extracts indicated similar levels of expression for both wild type and mutant receptors in HeLa cells (Fig. 2A) and in COS-1 cells (data not

shown). Hormone dissociation analyses were performed at 37°C with cells transiently transfected with the mutant AR expression vector and incubated with tritiated DHT and MB. Off rates obtained for these hormones (6 and 3 10^{-3} min⁻¹) were in the normal range (6-8 and 2-4, respectively). Together, these results indicate that the G577R mutation is not associated with detectable defects in AR hormone binding properties.

To investigate whether the mutant AR can direct transcriptional activation of androgen responsive genes, HeLa cells were transiently cotransfected with varying amounts of expression vectors for wild type (wt) or mutant (mt) AR together with the pGRE5-CAT reporter vector. This reporter vector contains five copies of the hormone response element present in the rat tyrosine amine transferase (TAT) gene (rTAT GRE, Table 1) upstream of the TATA box of the Adenovirus major late promoter (28). The TAT response element has been shown previously to bind not only the GR but also the AR (29,30). CAT analysis of extracts from transfected cells indicated that levels of transcriptional activation observed with AR-G577R in the presence of MB (2 nM) were not reduced compared to the wt receptor (Fig. 3A). On the other hand, neither the wt nor the mt receptor activated transcription from a reporter gene containing three consensus estrogen response elements (EREs), which are not bound by androgen receptors, confirming that the activation observed with the pGRE5-CAT reporter is mediated by the TAT response elements (Fig. 3B). Thus, these results indicate that mutation G577R does not prevent transcriptional activation of a reporter gene containing multimerized response elements. However, cooperativity of DNA binding or transcriptional activation could mask a reduced affinity for androgen response elements. In addition, different response elements may be affected to different degrees by the mutation.

Mutation G577R alters the affinity and selectivity of AR interaction with androgen response elements

The G577R mutation is located in the P box of the AR, a region shown previously to play a key role in discriminating between estrogen and glucocorticoid/androgen response elements (17-19). These two types of receptor recognition motifs differ by the two central base pairs in the PuGNNCA motifs (GT in EREs, AA or TA in AREs, see Table 1). In order to investigate whether mutation G577R affected the DNA binding affinity and/or selectivity of the AR, we examined the binding profiles of bacterially expressed wt and mt AR DNA-binding domains (DBDs) to a panel of sixteen palindromic probes containing a repeat of each possible PuGNNCA motif. The wt and mt AR DBDs (aa 550 to 656) were expressed to similar levels as assessed by labeling with [³⁵S]-Met of a fraction of the bacterial population used for preparation of whole cell extracts (Fig. 2B). The wt AR DBD bound specifically to four probes, corresponding to the consensus PuGNACA (Fig. 4A, lanes 1, 5, 9, 13; the position of the specific complexes is indicated by the arrowhead). The mt AR DBD did not bind to probes that were not bound by the wt DBD receptor (Fig. 4B). Complexes formed with three of the PuGNACA probes, corresponding to the AA, CA and TA motifs, were weaker than those formed with the wt DBD (Fig. 4C and 4D). Binding to the GA probe by the mt DBD was undetectable (Fig. 4B and 4D). Note that the GA and CA probes were bound to similar extents by the wt DBD (Fig. 4A and 4C), but that the mt DBD only bound the latter probe (Fig. 4B and 4D). In addition, while the wt DBD bound preferentially to the AA and TA elements, the mt DBD preferred AA and CA elements (Fig. 4C and

4D). Thus, the G577R mutation differentially affected binding to the four palindromic PuGNACA elements. In addition, the same differential effect was observed with elements containing a consensus PuGAACA motif and a variable PuGNACA motif (data not shown).

Binding selectivity of the full-length wt and mt receptors was also investigated using whole cell extracts from HeLa cells transiently transfected with expression vectors for either receptor or with the parental pSG5 expression vector. Non-specific bands were observed when extracts from cells transfected with the pSG5 vector were used (Fig. 5C). Similar to what was observed with the isolated wt AR DBD, the full length wt AR bound specifically only to PuGNACA motifs, with a preference for AA and TA elements (Fig. 5A, lanes 1, 5, 9 and 13; the position of the specific complexes is indicated by a full arrow). Specific complexes were also observed with extracts from cells transfected with AR-G577R on probes containing AA, CA and TA elements (Fig. 5B, lanes 1, 5, and 13), but not with the probe containing GA motifs (Fig. 5B, lane 9). In addition, the mt receptor bound preferentially to the AA and CA elements. These changes in the DNA selectivity of the mutant receptor are similar to those observed with the bacterially expressed DNA binding domains. Note that in this experiment, higher concentrations of mt AR protein extract were used to achieve detectable binding.

Mutation G577R compromises transcriptional activity on response elements containing PuGGACA elements and on imperfect response elements.

Although transactivation of the GRE5-TATA promoter, which contains elements composed of one TA and one AA motif (rTAT GRE, Table 1), was not affected by

the G577R mutation, results from the DNA binding experiments suggested that promoters containing PuGGACA elements may not be activated by the mutant receptor because of lack of binding. To test this prediction, we introduced oligonucleotides containing two PuGNACA response elements upstream of the TATA box of the Adenovirus major late promoter and of the CAT gene. The resulting reporter genes were transiently transfected into HeLa cells together with increasing concentrations of expression vectors for wt or mt AR. A dose-dependent increase in transcriptional activation was observed for all four response elements with the wt receptor, with comparable levels of peak transcriptional activity (Fig. 6A). Expression of the reporter genes containing AA, CA and TA elements was also increased with transfection of progressively higher concentrations of expression vector for the mt AR (Fig. 6B). However, no transactivation was observed using PuGGACA motifs with the mutant receptor (Fig. 6B).

We also tested the effect of the G577R mutation on transactivation from natural androgen response elements containing PuGGACA or TGTCCPy motifs. Both the element present in the prostatic binding protein C1 gene (31) and the one present in the androgen receptor gene (ARE1, see table 1 and ref. 32) mediated transactivation by the wt receptor (Fig. 7 C and E), but not detectably by the mt AR (Fig. 7 D and F), whereas both receptors transactivated PuGAACA palindromes to similar levels under the same conditions (Fig. 7 A and B).

In addition to using synthetic minimal promoters, we investigated the effect of the G577R mutation on transactivation of natural promoters by androgens. The MMTV promoter is a viral promoter that responds to glucocorticoids, androgens and progesterone in transient transfections and also when incorporated into minichromosomes or into the cellular genome, although the specificity of the

hormonal response can be restricted depending on the site of integration (33-35). MMTV contains imperfect palindromic elements composed of one PuGAACA arm each (Table 1), the other motif being in both cases related to the PuGTACA motif (PuTACA and PuGTAtc for the upstream and the downstream elements, respectively; (36, 37-39)). Both AR-G577R and the wt receptor transactivated the MMTV reporter vector efficiently (20-30 fold, Fig. 8 A and B). The probasin promoter (40), which is specifically activated by AR but not by GR (29,30,41-43), is composed of two imperfect elements, one of which contains a variant TA motif (Table 1). With this promoter, ~5-fold reduction in transactivation levels was observed with the mutant receptor, down to ~3-fold activation (Fig. 8 C and D; note that different scales are used in panels C and D). Finally, the prostate-specific antigen promoter (44), which contains two imperfect response elements, one of which has a degenerated GA motif, was transactivated by the wt receptor, while hormone addition had little effect on transcriptional activity in the presence of the G577R AR mutant (Fig. 8 E and F). These results demonstrate that transactivation of natural promoters by the AR is affected by the G577R mutation to different degrees.

DISCUSSION

Mutations in the AR associated with androgen resistance cluster mostly in the ligand-binding domain and, to a lesser extent, in the DNA-binding domain. All the mutations found in the DNA-binding domain that correspond to deletions or stop mutations result in CAIS. Missense mutations are associated either with CAIS (currently 15 mutations affecting 11 different amino acids in the androgen receptor gene mutation database) or with PAIS (currently 18 point mutations affecting 13 different amino acids in the androgen receptor gene mutation database). Although analysis of the functional properties of the resulting mutant receptors is often not available, previous mutagenesis analysis of steroid receptors together with structural data resulting from the crystallographic analysis of the ER and GR DNA-binding domains in complex with their response elements provide explanations for the phenotypes associated with some of these mutations. For instance, it is not surprising that mutations C559Y, C576R, C576F, C579Y, C579F, C601F and C611Y are associated with CAIS in view of the stringent requirement that is well documented in the glucocorticoid receptor (45) for Cys residues to coordinate Zn atoms in the two zinc fingers. Other mutations affect residues that in the GR structure are involved in the dimerization interface (A596T), in contacts with phosphate groups (Y571C, R585K, R608K, R615H/P) or with base pairs (K580R, V581F, R585K; please refer to the androgen receptor gene mutation database (21,22) for references). On the other hand, mutation G577R affects an amino acid that is not known to be involved in any of these functions. However, G577 belongs to the DNA binding helix of the AR and is part of the P box, previously defined as crucial for discriminating between estrogen and glucocorticoid response elements (17-19). The corresponding amino

acid in the human ER α , E203, makes specific contacts with the two base pairs that differ between an ERE and an ARE (16). This suggested that mutation G577R has the potential of affecting AR DNA binding affinity and/or selectivity.

We used a panel of sixteen probes differing by the two central bases of the recognition motif (PuGNNCA) to investigate whether the G577R mutation allows binding to motifs not bound by the wt receptor or modulates binding to the sites recognized by the wt receptor. The wt AR bound specifically the four elements corresponding to the PuGNACA palindromes (Fig. 4 and 5). This result is consistent with the crystallographic analysis of the GR-GRE structure (15). Indeed, while G at position -5, T at position +3 and G at position +2 are contacted by a lysine (K580 in AR), a valine (V581 in AR) and an arginine (R585 in AR) in the DNA recognition helix, respectively, no contact involving the bases at position -4 or +4 was observed. The G577R mutant did not bind to response elements in the panel of sixteen probes that were not recognized by the wt receptor. The possibility that mt ARs may bind to estrogen response elements had been previously suggested for mutations associated with breast cancer (46), however no evidence of such alteration in DNA binding selectivity has been found to date. The G577R mutant did not bind the ERE *in vitro*, and a reporter vector containing multimerized estrogen response elements was not transactivated in transient transfections. This result is consistent with previous studies using derivatives of a GR mutant containing the ER P box, and therefore capable of binding to an ERE. Whereas it was found that not only Glu, but also other amino acids (Trp, Tyr, Phe, Asn, His) at the first position of the P box can retain binding to ERE, replacement of Glu by Arg considerably weakened binding to an ERE (47). Similarly, we observed that while E203 in the ER could be replaced by other amino acids such as Asn and His without abrogating binding or transactivation

of an ERE, replacement of Glu by Arg in the ER generated a receptor that did not bind the ERE or any of the 16 PuGNNCA palindromes (E. Rouault, D. Nguyen, and S. Mader, unpublished data). Thus, Arg at this position in the P box does not seem compatible with DNA binding in the context of the ER. However, we observed here that introducing Arg at position 577 of the AR still allowed binding to three of the four PuGNACA palindromes recognized by the wt receptor. The fact that the mt receptor only bound to elements recognized by the wt receptor suggests that Val 581 is still the main determinant for discrimination between the two central base pairs of the motif, but that its function is modulated by the presence of Arg at position 577.

We observed that the G577R mutation resulted in a general weakening of the interactions between AR and the PuGNACA palindromes. Although no structure is available for the AR DNA binding domain complexed to its response element, the conservation of the DNA recognition helix with that of GR (12 out of 13 amino acids are identical, with one Val to Ala substitution) suggests a very similar mode of recognition of the response element motifs. Replacing Gly by Arg in the GR P box would result in a steric clash at the level of the Arg C β with the methyl group of the T at position +3 in the TGTTCPy motif (Fig. 9). Any amino acid other than Gly would lead to a similar incompatibility. This is consistent with the observation that replacement of the first amino acid in the GR P box (Gly) by the corresponding amino acid in the ER (Glu) repressed transactivation from a glucocorticoid-responsive promoter (48), although this effect was not seen by others (19). The crystal structure of a non-cognate complex between a GR mutant carrying both the ER P box and the TR D box (E/TRGR) and a consensus GRE is also available (49). Superimposition of wt GR and the E/TRGR structures indicated a shift in the position of the DNA recognition helix of more than 2 angströms (Fig. 9), resulting in

a structure devoid of steric conflict between the C β atom at the first position of the P box (Glu in the E/TRGR structure) and the thymine at position +3. The position of the mutant GR DBD allowed the presence of five additional fixed water molecules in the protein/DNA interface, imposing a potential entropic burden on the stability of the complex leading to an estimated 10-fold reduction in stability of the complex (49). The E/TRGR receptor does not contain a Val but an Ala in its P box, preventing contacts with T at position +3. However, replacement of Ala by Val in that structure followed by energy minimization indicates that this van der Waals contact was possible within that structure, increasing stability with response elements containing T at position +3 (Fig. 10). Thus this structural model accounts for both the selectivity for PuGNACA elements retained by the mutant G577R receptor and for the overall decrease in stability of these complexes.

Our results indicated in addition that the decrease in binding levels was not proportional on all the PuGNACA elements. Indeed, TA elements were more compromised than CA and AA elements, and GA elements were not bound under the condition of our gel shift assays with protein extracts containing either the mutant full length AR or its isolated DNA binding domain. This correlated also with the absence of transactivation of a reporter gene containing two copies of the GA element by the mt receptor. Therefore we examined whether Arg at position 577 of the AR could discriminate between different bases at position +4, resulting in the observed preference for G and T (C and A at position -4), and in potential conflict with a C (G at position -4). Modeling of the Arg chain into the E/TRGR structure indicated a favorable influence of negatively charged chemical groups on the side of the +4 base exposed in the major groove. Both T and G present only negatively charged groups in the major groove. Arg can establish a hydrogen bond with the O4

of T at position +4, and interacts also with the O6 of G at position -5 (Fig. 9 and 10). Interactions between the Arg amino groups and O6 and N7 of G are also frequently found in protein/DNA complexes (50,51), and could also be modeled in this complex with G at position +4 (data not shown). An A residue would be less favorable due to the presence of both a positively charged group (the N6 amine) and a negatively charged group (N7). Finally, a C residue leads to unfavorable electrostatic interactions because of the presence of only a positively charged group (the N4 amine). This model is therefore consistent with our experimental results.

The effects of mutation G577R on DNA binding are likely to result in different transcriptional activation properties of the mutant receptor compared to the wt AR. Accordingly, synthetic reporter genes containing GA palindromes were not transactivated by the mt receptor. To test the effect of mutation G577R on transactivation mediated by natural AREs, we introduced two copies of response elements found in the regulatory sequences of the androgen responsive C1 and AR genes upstream of a minimal promoter. The elements chosen all contained one GA motif, in addition to other base replacements with respect to the consensus motif. Note that our *in vitro* binding assays indicated that GA motifs severely compromise binding by the mutant receptor even when the other motif is the strong PuGAACA motif (data not shown). The resulting reporter genes were all stimulated by mibolerone with the wt receptor, but the mutant receptor was essentially inactive on these elements.

Although we observed a loss of binding efficiency on all PuGNACA palindromes with the mutant AR, we did not observe a reduction in transcriptional activity on reporter vectors containing two copies of the AA, TA or CA elements. This could be due to cooperativity of DNA binding or transactivation on the two

elements, but the lack of transactivation observed with one response element in front of the minimal promoter did not allow us to test the effect of single mutated elements on transcription. Thus, it remains possible that the differences in DNA binding observed *in vitro* may not drastically affect transcriptional activity from PuGNACA palindromes when N is A, C or T. However, the sequence of the few natural androgen response elements characterized to date (Table 1) often deviate from the consensus palindromic sequence at one or several positions, likely weakening interactions established by K580, V581 or R585. The destabilizing effect of the G577R mutation may be more acute in that context, depending on the nature of the substitutions. In agreement with that prediction, transactivation from promoters that can mediate androgen responsiveness such as the MMTV promoter, and from promoters of natural androgen target genes such as the PB and PSA genes, all of which contain response elements diverging from the consensus at several positions, was affected to various degrees by the AR-G577R mutation. Note in particular that transcription from the probasin promoter, which does not contain GA motifs, was reduced about 5-fold. Thus, the presence of the G577R mutation in the AR is likely to affect regulation of a large number of androgen responsive genes depending on the type of PuGNACA motif and the presence of variations from this consensus motif in one or both repeats of this motif. The finding that several synthetic promoters (minimal promoters containing two PuGNACA palindromes) or natural promoters (MMTV) are still well transactivated by the mutant receptor is consistent with the phenotype of partial androgen insensitivity associated with the mutation. Further, our results suggest that the wide range of phenotypes associated with PAIS may be explained not only by partial loss of AR function but also by the differential effect of some mutations on specific subsets of androgen responsive genes.

MATERIALS AND METHODS

Patient

The subject (patient number 12694) was diagnosed at birth with severe penile scrotal hypospadias with bifid scrotum and retractable testis that could not be brought all the way down. His karyotype was 46,XY and his levels of testosterone and LH were elevated (345 ng/dl and 14.47 Iu/l, respectively, compared to average values of 150 ng/dl and 5 Iu/l in that age group). The patient was treated with testosterone enanthate which resulted in a significant increase in penis size. These clinical observations are indicative of PAIS. It is of note that a partial androgen insensitivity syndrome was diagnosed in a maternal uncle of the patient, who was born with undescended testicles, microphallus and a vaginal opening, but did not undergo genetic evaluation.

Androgen binding properties of the AR in skin fibroblasts

Androgen binding studies were performed on cultured genital skin fibroblasts obtained from skin biopsies of the patient. The androgen-binding properties of the AR were determined according to standard techniques using tritiated hormones (52). The maximum androgen-binding capacity (B_{max}) and the apparent dissociation constant (K_d) of the AR were determined from Scatchard analysis using [17α -methyl- 3H] methyltrienolone (MT, 86 Ci/mmol), [$1,2,4,5,6,7$ - 3H]5 α -dihydrotestosterone (DHT, 110 Ci/mmol), and [17α -methyl- 3H] mibolerone (MB, 85 Ci/mmol).

Dissociation kinetics were determined by incubating COS-1 cells transiently transfected by electroporation (52) with expression vectors for wt and mt ARs (1 μ g)

in the presence of 3 nM tritiated DHT and MB (NEN) for 2 hours. Cells were then incubated with a 200-fold excess of non-labeled hormones for different times (30, 60, 90 or 120 min). Cells were harvested by trypsinization, and lysed in NaOH 0.5 M. Protein concentration of the cell extract was quantitated by Lowry assay, and radioactivity was measured by scintillation counting.

DNA amplification and sequencing of the AR from skin fibroblasts

Synthetic oligonucleotides corresponding to the borders of exons 2-8 were used to amplify the coding portion of each exon in regions C-F of the AR (53). The resulting products were sequenced, and the presence of the G577R mutation in exon 2 was confirmed by an independent round of PCR amplification and sequencing.

Plasmids

pSG5-AR was constructed by subcloning the AR cDNA from pSVhAR-BHEX (49) into the pSG5 expression vector (54). pSG5-AR-G577R was constructed by site directed mutagenesis of the AR cDNA using PCR amplification and by cloning a HindIII-XhoI fragment containing the mutation into pSVhAR-BHEX, followed by subcloning of a KpnI-XhoI fragment into pSG5-AR. The entire HindIII-XhoI fragment was sequenced to exclude artefactual mutations that may have been introduced during the PCR reaction.

The pGRE5-TATA-CAT, and pMMTV-hGH reporter vectors have been described previously (28,52). pPB-hGH was constructed by transferring the androgen responsive region in the probasin promoter from p(-285)PB-CAT (40) in the p ϕ GH vector (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA). pPSA-hGH was

constructed by transferring the androgen responsive region in the prostate-specific antigen promoter from pPA2-CAT (55) in the pϕGH vector.

The bacterial expression vectors pET3-AR[DBD] and pET3-AR[DBD]G577R were constructed by PCR amplification of the cDNA fragment corresponding to amino acids 550 to 656 and subcloning between the KpnI and XhoI sites of the pET31 vector (20). The limits of the AR DNA binding domain were chosen to match those of the previously described ER DNA binding domain (20).

The pRE2-CAT reporter vectors were prepared by replacing the three EREs in pERE3-TATA-CAT (56) by double stranded oligonucleotides containing two response elements flanked by BamHI and BglII sites. The sequences of the top strand oligonucleotide is : 5'GATCCAAATGTCAGNNCACAGTGNNCTATCTAATAAA GTAGCTAGNNCACAGTGNNCTAAGA3'

The ARE C1 and ARE1 hAR reporter vectors were constructed as described for the pRE2-CAT reporter vectors, except that double stranded oligonucleotides containing two copies of the C1 ARE or of the hAR ARE1 flanked by BamHI and BglII sites were used.

***E. coli* expression of the AR DNA binding domain**

The wt and G577R AR DNA binding domains were expressed by transformation of *E. coli* BL21 DE3 cells with pET3-AR[DBD] or pET3-AR[DBD]G577R bacterial expression vectors, and induction of exponentially growing cultures with IPTG (0.5 mM final) for one hour. Whole bacterial extracts were prepared by sonication in extraction buffer (Tris HCl pH 7.4, 25 mM; EDTA pH 8.0, 0.1 mM; NaCl, 400 mM; glycerol, 10%; DTT, 1 mM; PMSF, 1 mM and protease inhibitors) and centrifugation (10,000g, 30 min). Aliquots (1 ml) of each culture reactions were taken prior to IPTG

induction, centrifuged and resuspended in M9 medium containing each amino acid except methionine and cysteine (0.01% weight/volume each). Rifampicin was added (200 $\mu\text{g/ml}$ final) to inhibit bacterial RNA polymerase, and expression of the T7 polymerase was induced with IPTG (0.5 mM final) for 30 min. [^{35}S]-methionine (10 $\mu\text{Ci/ml}$) was then added and cells were further incubated at 37°C for 5 min. Bacteria were then harvested by centrifugation, resuspended in Laemmli buffer, and boiled for 5 min. Labeled proteins were separated by electrophoresis on a 12% polyacrylamide-SDS gel and revealed by fluorography.

Transient transfection, CAT and growth hormone assays

HeLa and COS-1 cells were maintained in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). For transient transfection, cells were switched to medium containing 5% FBS pretreated with activated charcoal to remove traces of hormones. Transient transfections were performed using the calcium-phosphate co-precipitation method as previously described (57). Essentially, HeLa cells were transfected with varying concentrations of expression vectors for ARwt or AR-G577R, pCMV- βGal (2 μg), pRE2-TATA-CAT (2 μg) and pBluescribe-M13+ (to 15 μg total). Precipitates were washed after 16h and MB was added (final concentration 2 nM). Cells were harvested after 24 h and extracts were prepared by freeze-thawing in Tris-HCl pH8.0 (0.25 M). CAT assays were performed after standardization with β -galactosidase activity as previously described (56).

For growth hormone assays, COS-1 cells were transfected with varying concentrations of expression vectors for ARwt or AR-G577R, with pRSV- βGal (2 μg), pPB-hGH, pMMTV-hGH or pPSA-hGH (3 μg) and Bluescribe-M13+ (to 15 μg total). Precipitates were washed after 16h and MB was added (final concentration 2

nM). Cell supernatants were harvested after 24 h and assayed for hGH concentration using an hGH-Elisa kit according to the manufacturer's instructions (Medicorp, Montréal, Canada). Cells were also harvested and β -galactosidase activity was measured to control for transfection efficiency.

Immunoblot analyses

Protein concentrations of whole cell extracts from HeLa or COS-1 cells transiently transfected with 15 μ g expression vectors for the wt or mt AR were estimated using a Bradford assay. Protein extracts (4 μ g) in Laemmli buffer were heat denatured, loaded onto an 8% polyacrylamide-SDS gel and electrophoresed at 125 V. After transfer to a PVDF membrane and incubation of the membranes in blocking solution (TBS 1X, Tween 20 0.05%, BSA 3%) for 20 min, receptor bands were revealed using the F39.4.1 mouse monoclonal antibody at a 1:10000 dilution (58), a horse radish peroxidase-coupled secondary antibody and the Renaissance ECL detection kit (NEN).

Gel shift assays

Whole bacterial extracts containing the wt or mt AR DBD were diluted to 80 mM NaCl and incubated on ice with 2 μ g poly dIdC for 15 min. After addition of [32 P]-labeled, double stranded oligonucleotide probes (50,000 cpm per sample), reactions were incubated at 25 $^{\circ}$ C for 15 min and terminated by addition of 2 μ l of dye mix (0.1% bromophenol blue, 60% glycerol) and loaded onto a 7% polyacrylamide gel in 0.25X TBE (22.5 mM Tris-HCl, 22.5 mM boric acid and 0.5 mM EDTA). Complexes were separated by electrophoresis, and gels were dried and autoradiographed. For quantitation of complexes, both the bands corresponding to

the complex and the free probes were excised and counted by scintillation counting and the percentage of shifted probe was calculated.

Gel shift assays with whole cell extracts from HeLa cells transiently transfected with AR expression vectors (15 μ g per 9 cm dish) were performed essentially as described above except that extracts were diluted to a final KCl concentration of 125 mM and loaded onto a 5% polyacrylamide gel.

Modeling of the interaction between the AR-G577R DNA binding domain and the PuGAACA element.

Modeling of the complex between the AR-G577R DNA binding domain and the PuGAACA element was performed in the Insight II-97 environment using the refined structure of the mutant GR DNA binding domain E/TR_{GR} (1LAT.PDB, 49) by replacement of P box amino acids Glu by Arg and Ala by Val, followed by manual adjustments and energy minimization in the AMBER forcefield to avoid steric clashes (software from Accelrys Inc.).

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks to Dr Robert J. Matusik (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN) for providing us with the probasin and PSA promoters. We are grateful to Sunita de Tourreil and Rose Lumbroso for technical assistance and to Dr. Lenore K. Beitel (Lady Davis Institute, Montreal) for background information and review of this manuscript. This work was supported by a grant from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada to SM. SVS also acknowledges his operating grant from the Canadian Institute of Health Research. SVS and SM are chercheurs-boursiers of the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

1. Gottlieb B, Pinsky L, Beitel LK and Trifiro M 1999 Androgen insensitivity. *Am. J. Med. Genetics* 89: 210-217.
2. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839.
3. Laudet V 1997 Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19: 207-226.
4. Owen GI and Zelent A 2000 Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cellular & Molecular Life Sciences* 57: 809-827.
5. Freedman LP 1999 Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 97: 5-8.
6. McKenna NJ, Lanz RB and O'Malley BW 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 20: 321-344.
7. Xu L, Glass CK and Rosenfeld MG 1999 Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current Opinion in Genetics & Development* 9: 140-147.
8. Klock G, Strähle U and Schütz G 1987 Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature* 329: 734-736.
9. Nordeen SK, Suh BJ, Kühnel B and Hutchinson III CA 1990 Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. *Mol. Endocrinol.* 4: 1866-1873.
10. Roche PJ, Hoare SA and Parker MG 1992 A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol. Endocrinol.* 6: 2229-2235.

11. Lieberman BA, Bona BJ, Edwards DP and Nordeen SK 1993 The constitution of a progesterone response element. *Mol. Endocrinol.* 7: 515-527.
12. Glass CK 1994 Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocr. Rev.* 15: 391-407.
13. Freedman LP and Luisi BF 1993 On the mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptors: a structural and functional perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* 51: 140-150.
14. Zilliacus J, Wright APH, Carlstedt-Duke J and Gustafsson J-A 1995 Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol. Endocrinol.* 9: 389-400.
15. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR and Sigler PB 1991 Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352: 497-505.
16. Schwabe JWR, Chapman L, Finch JT and Rhodes D 1993 The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75: 567-578.
17. Danielsen M, Hinck L and Ringold GM 1989 Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* 57: 1131-1138.
18. Mader S, Kumar V, de Verneuil H and Chambon P 1989 Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive elements. *Nature* 338: 271-274.
19. Umesono K and Evans RM 1989 Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57: 1139-1146.

20. Mader S, Chambon P and White JH 1993 Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucl. Acid Res.* 21: 1125-1132.
21. Gottlieb B, Lehvaslaiho H, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L and Trifiro M 1998 The androgen receptor gene mutations database. *Nucleic Acids Res.* 26: 234-238.
22. Gottlieb B, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L and Trifiro M 1999 Update of the androgen receptor gene mutations database. *Human Mutation* 14: 103-114.
23. Zoppi S, Marcelli M, Deslypere JP, Griffin JE, Wilson JD and McPhaul MJ 1992 Amino acid substitutions in the DNA-binding domain of the human androgen receptor are a frequent cause of receptor-binding positive androgen resistance. *Mol. Endocrinol.* 6: 409-415.
24. Beitel LK, Prior L, Vasiliou DM, Gottlieb B, Kafman M, Lumbroso R, Alvarado C, McGillivray B, Trifiro M and Pinsky L 1994 Complete androgen insensitivity due to mutations in the probable alpha-helical segments of the DNA-binding domain in the human androgen receptor. *Human Molecular Genetics* 3: 21-27.
25. Brüggewirth HT, Boehmer ALM, Verleun-Mooijman MCT, Hoogenboezem T, Kleijer WJ, Otten BJ, Trapman J and Brinkmann AO 1996 Molecular basis of androgen insensitivity. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 58: 569-575.
26. Imasaki K, Okabe T, Murakami H, Tanaka Y, Haji M, Takayanagi R and Nawata H 1996 Androgen insensitivity syndrome due to new mutations in the DNA-binding domain of the androgen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 120: 15-24.
27. Nazereth LV, Stenoien DL, Bingman III WE, James AJ, Wu C, Zhang Y, Edwards DP, Mancini M, Marcelli M, Lamb DJ and Weigel NL 1999 A C619Y mutation in the human androgen receptor causes inactivation and mislocalization of the receptor with concomitant sequestration of SRC-1 (steroid receptor coactivator-1). *Mol. Endocrinol.* 13: 2065-2075.

28. Mader S and White JH 1993 A steroid-inducible promoter for the controlled overexpression of cloned genes in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5603-5607.
29. Rundlett SE and Miesfeld RL 1995 Quantitative differences in androgen and glucocorticoid receptor DNA binding properties contribute to receptor-selective transcriptional regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 109: 1-10.
30. Kasper S, Rennie PS, Bruchovsky N, Lin L, Cheng H, Snoek R, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Shiu RP, Sheppard PC and Matusik RJ 1999 Selective activation of the probasin androgen-responsive region by steroid hormones. *J. Mol. Endocrinol.* 22: 313-325.
31. Claessens F, Celis L, De Vos P, Peeters B, Heyns W, Verhoeven G and Rombauts W 1993 Intronic androgen response elements of prostatic binding protein genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 688-694.
32. Dai JL and Burnstein KL 1996 Two androgen response elements in the androgen receptor coding region are required for cell-specific up-regulation of receptor messenger RNA. *Mol. Endocrinol.* 10: 1582-1594.
33. List HJ, Lozano C, Lu J, Danielsen M, Wellstein and Riegel AT 1999 Comparison of chromatin remodeling and transcriptional activation of the mouse mammary tumor virus promoter by the androgen and glucocorticoid receptor. *Experimental Cell Research.* 252:471-8.
34. Terouanne B, Tahiri B, Georget V, Belon C, Poujol N, Avances C, Orio F Jr., Balaguer P and Sultan C A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 160:39-49.

35. Archer TK, Fryer CJ, Lee HL, Zaniewski E, Liang T, and Mymryk JS. 1995 Steroid hormone receptor status defines the MMTV promoter chromatin structure in vivo. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53:421-9.
36. Gowland PL and Buetti E 1989 Mutations in the hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus differentially affect the response to progestins, androgens, and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3999-4008.
37. Cato ACB, Miksicek R, Schütz G, Arnemann J and Beato M 1986 The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesterone induction. *EMBO J.* 5: 2237-2240.
38. Darbre P, Page M and King RJB 1986 Androgen regulation by the long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. *Mol. Cell. Biol.* 6: 2847-2854.
39. Cato ACB, Henderson D and Ponta H 1987 The hormone response element of the mouse mammary tumor virus mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* 6: 363-368.
40. Rennie PS, Bruchofsky N, Leco KJ, Sheppard PC, McQueen SA, Cheng H, Snoek R, Hamel A, Bock ME, MacDonald BS, Nickel BE, Chang C, Liao S, Cattini PA and Matusik RJ 1993 Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol. Endocrinol.* 7: 23-36.
41. Claessens F, Alen P, Devos A, Peeters B, Verhoeven G and Rombauts W 1996 The androgen-specific probasin promoter element 2 interacts differentially with androgen and glucocorticoid receptors. *J. Biol. Chem.* 271: 19013-19016.
42. Schoenmakers E, Alen P, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W and Claessens F 1999 Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second zinc finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochem J.* 341: 515-521.

43. Schoenmakers E, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W and Claessens F 2000 Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J. Biol. Chem.* 275: 12290-12297.
44. Cleutjens KBJM, van Eekelen CCEM, van der Korput HAGM, Brinkmann AO and Trapman J 1996 Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 6379-6388.
45. Schena M, Freedman LP and Yamamoto KR 1989 Mutations in the glucocorticoid receptor zinc finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities. *Genes Dev* 3: 1590-1601.
46. Lobaccaro JM, Lumbroso S, Belon C, Galtier-Dereure F, Bringer J, Lesimple T, Heron J-F, Pujol H and Sultan C 1993 Male breast cancer and the androgen receptor gene. *Nature Genetics* 5: 109-110.
47. Zilliacus J, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J-A and Wright APH 1994 Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 4175-4179.
48. Zilliacus J, Wright APH, Norinder U, Gustafsson J-A and Carlstedt-Duke J 1992 Determinants for DNA-binding site recognition by the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 24941-24947.
49. Gewirth DT and Sigler PB 1995 The basis for half-site specificity explored through a non-cognate steroid receptor-DNA complex. *Nature Structural Biology* 2: 386-394.
50. Seeman NC, Rosenberg JM and Rich A 1976 Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 804-808.

51. Suzuki M 1994 A framework for the DNA-protein recognition code of the probe helix in transcription factors: The chemical and the stereochemical rules. *Structure* 2: 317-326.
52. Beitel LK, Kazemi-Esfarjani P, Kaufman M, Lumbroso R, DiGeorge AM, Killinger DW, Trifiro MA and Pinsky L 1994 Substitution of arginine-839 by cysteine or histidine in the androgen receptor causes different receptor phenotypes in cultured cells and coordinate degrees of clinical androgen resistance. *J. Clin. Invest.* 94: 546-554.
53. Trifiro M, Gottlieb B, Pinsky L, Kaufman M, Prior L, Belsham DD, Wrogemann K, Brown CJ, Willard HF, Trapman J, Brinkmann AO, Chang C, Liao S, Sergovitch F and Jung J 1991 The 56/58 kDa androgen-binding protein in male genital skin fibroblasts with a deleted androgen receptor gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 75: 37-47.
54. Green S, Issemann I and Sheer E 1988 A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering. *Nucleic Acids Research* 16: 369.
55. Riegman PHJ, Vlietstra RJ, van der Korput JAGM, Brinkmann AO and Trapman J 1991 The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol. Endocrinol.* 5: 1921-1930.
56. Barsalou A, Gao W, Anghel SI, Carriere J and Mader S 1998 Estrogen response elements can mediate agonist activity of anti-estrogens in human endometrial Ishikawa cells. *J. Biol. Chem.* 273: 17138-17146.
57. Banerji J, Rusconi S and Schaffner W 1981 Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27: 299-308.
58. Zegers ND, Claassen E, Neelen C, Mulder E, van Laar JH, Voorhorst MM, Berrevoets CA, Brinkmann AO, van der Kwast TH, Ruizeveld de Winter JA, Trapman J and Boersma WJA 1991 Epitope prediction and confirmation for the

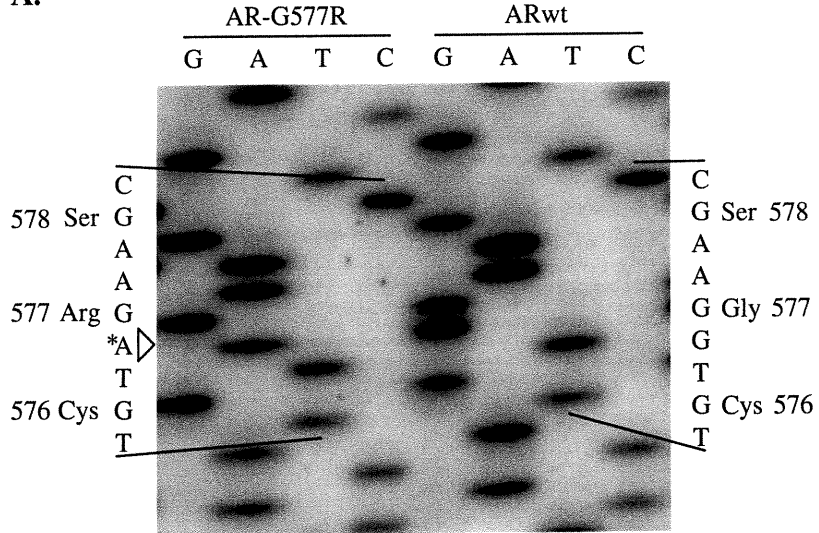
human androgen receptor: generation of monoclonal antibodies for multi-assay performance following the synthetic peptide strategy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1073: 23-32.

59. Claessens F, Celis L, Peeters B, Heyns W, Verhoeven G and Rombauts W 1989 Functional characterization of an androgen response element in the first intron of the C3(1) gene of prostatic binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:833-840.

Fig. 1: The G577R mutation affects the first residue of the AR P box.

A. Autoradiogram of a sequencing reaction of the wt and mt ARs in the region surrounding position 577. The mutation (G to A at the first position in the codon corresponding to Gly 577) is indicated on the sequencing gel by an arrowhead. **B.** Mutations in the AR DNA-binding region associated with defects in androgen responsiveness are indicated by asterisks. The DNA recognition helix is in bold, the P box amino acids are circled, and the G577R mutation is boxed.

A.



B.

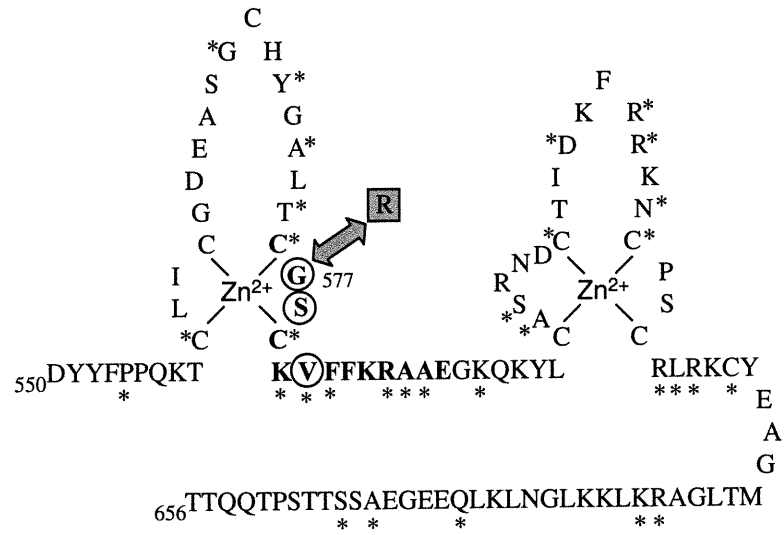
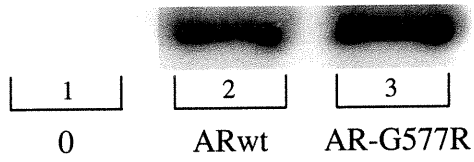


Fig. 2: Expression of the wt and mt full length ARs and of the corresponding DNA binding domains.

A. Expression vectors pSG5-AR (ARwt), pSG5-AR-G577R (AR-G577R), or the parental pSG5 vector (0) were transiently transfected (15 μ g each) in HeLa cells. Whole cell extracts were analyzed for AR expression levels by Western analysis using the F39.4.1 mouse monoclonal antibody at a 1:10000 dilution (58) (similar results were obtained in transient transfections of COS-1 cells). B. Bacterial expression vectors pET3-AR[DBD] (ARwt DBD), pET3-AR[DBD]G577R (AR-G577R DBD) or the parental pET3 vector were transformed into BL21 DE3 cells. Aliquots (1 ml) of exponentially growing cultures were centrifuged and resuspended in M9 medium containing each amino acid except methionine and cysteine (0.01% weight/volume each). Bacteria were incubated with rifampicin (200 μ g/ml final) and IPTG (0.5 mM final) for 30 min. [35 S]-methionine (10 μ Ci/ml) was then added and cells were further incubated at 37 $^{\circ}$ C for 5 min. Bacteria were harvested by centrifugation, resuspended in Laemmli buffer, and boiled for 5 min. Labeled proteins were separated by electrophoresis on a 12% polyacrylamide-SDS gel and revealed by fluorography.

A.

107 kDa—



B.

19.4 kDa—

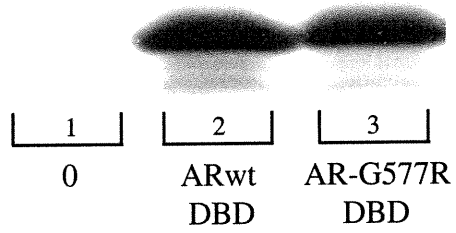


Fig. 3: Both wild type AR and AR-G577R transactivate GRE5-TATA-CAT, but not ERE3-TATA-CAT.

A. and B. Variable amounts (0.25, 1.25, or 6.25 μg) of expression vectors pSG5-ARwt (panel A) or pSG5-AR-G577R (panel B) were transiently transfected in HeLa cells together with pGRE5-CAT reporter vector (2 μg) and with the internal control vector pCMV- β Gal (2 μg) using the calcium phosphate method. After removing the precipitate, the cells were incubated in the presence or absence of mibolerone (MB, 2 nM) for 24 h. Chloramphenicol acetyl transferase (CAT) activity was quantitated in the corresponding whole cell extracts, and the ratio of the transcriptional activity in the presence versus the absence of hormone is indicated. **C. and D.** HeLa cells were transiently transfected as described above except that the pERE3-CAT vector was used instead of pGRE5-CAT. Results are the average of three experiments.

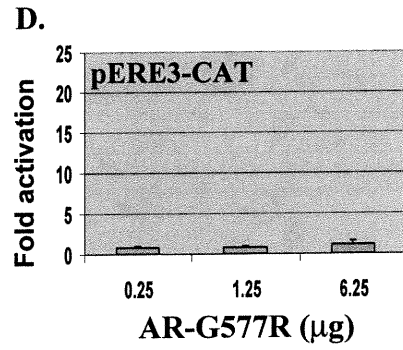
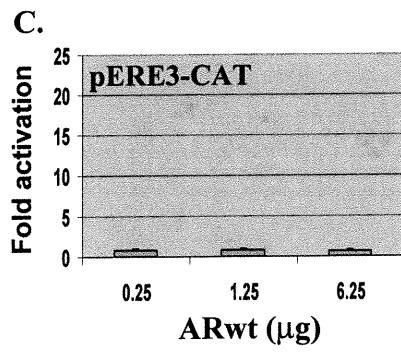
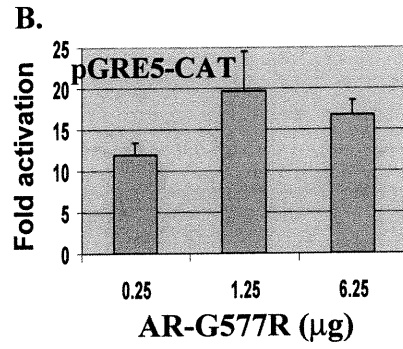
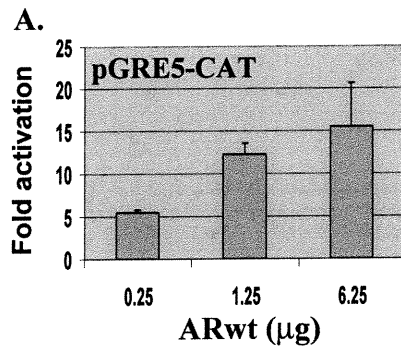


Fig. 4: The wt and mt AR DBDs recognize PuGNACA elements with different specificities.

A. and B. Gel shift analysis was performed using extracts from *E. coli* BL21 DE3 cells expressing the ARwt DBD (panel A) or the AR-G577R DBD (panel B) with a panel of sixteen probes that differ by the two central base pairs in the PuGNNCA motif. The sequence of the probes used for each lane is indicated above the autoradiogram of the gel. The position of the AR-probe complexes is indicated by an arrowhead. The four PuGNACA probes bound by ARwt DBD are underlined. **C and D.** The bands corresponding to the bound and free probe fractions were quantitated by manual excision and scintillation counting for the four PuGNACA elements. The percentage of probe bound by the wt or mt AR DBDs is shown. Results are an average of 7 experiments.

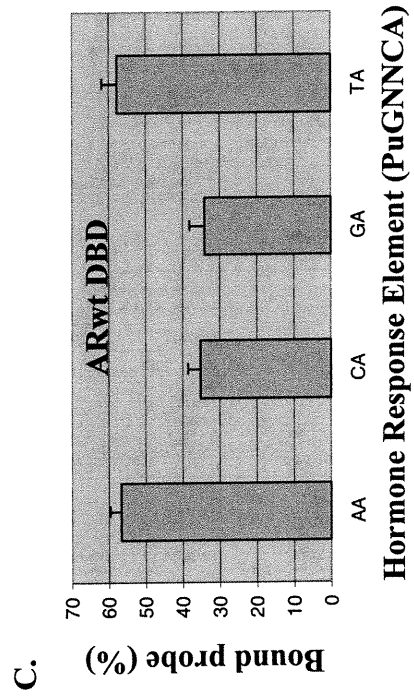
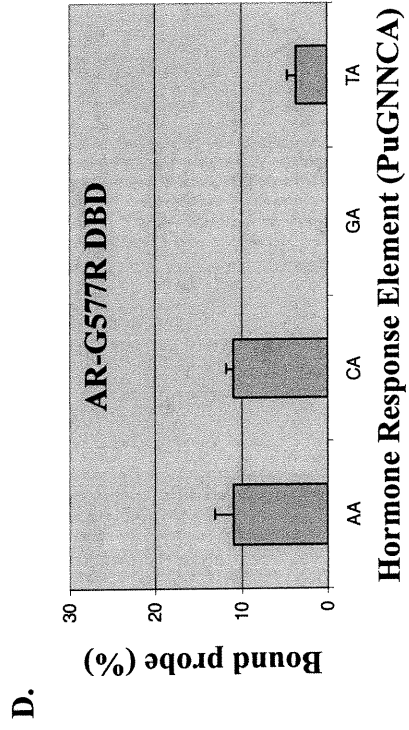
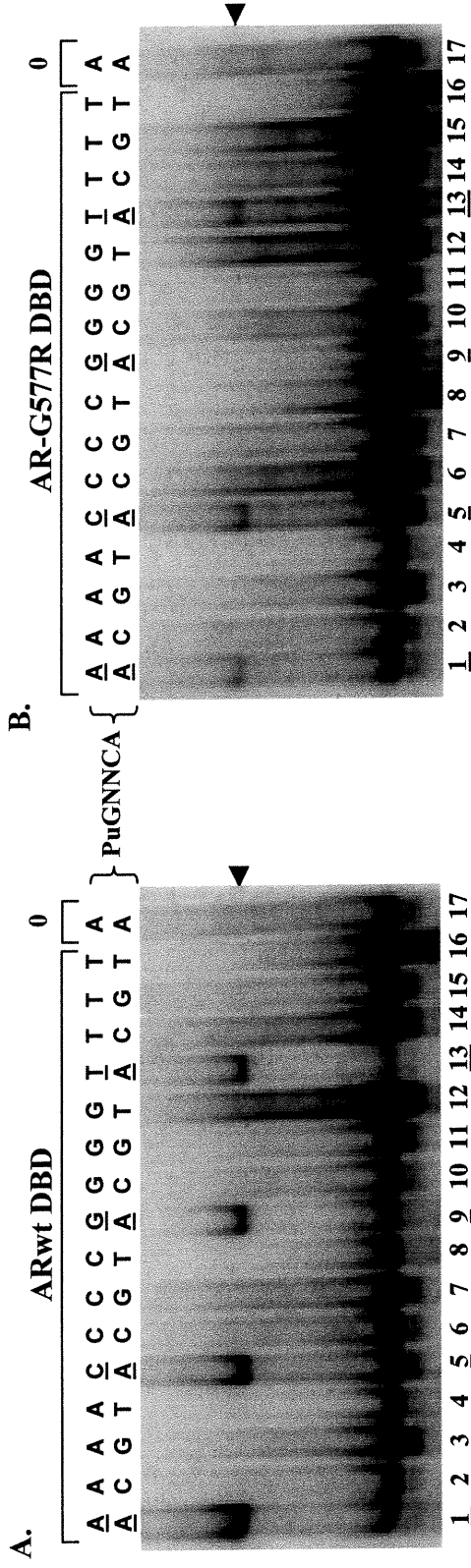


Fig. 5: The wt and mt full length ARs recognize PuGNACA elements with specificities similar to those of the corresponding DBDs.

A., B. and C. HeLa cells were transiently transfected with 15 μ g of expression vectors for the wt AR (ARwt), the mt AR (AR-G577R) or the parental pSG5 expression vector (0). Whole cell extracts were used in a gel shift assay with the sixteen PuGNNCA probes. A filled arrowhead indicates the position of the AR-containing complexes. An open arrowhead indicates the position of a non specific complex that is observed also in non AR-expressing cells (panel C) and migrates close to the specific band. The four PuGNACA probes bound by wt AR are underlined. Note that higher concentrations of mt AR protein were used to achieve detectable binding. Similar patterns of gel shifts have been observed in three independent experiments.

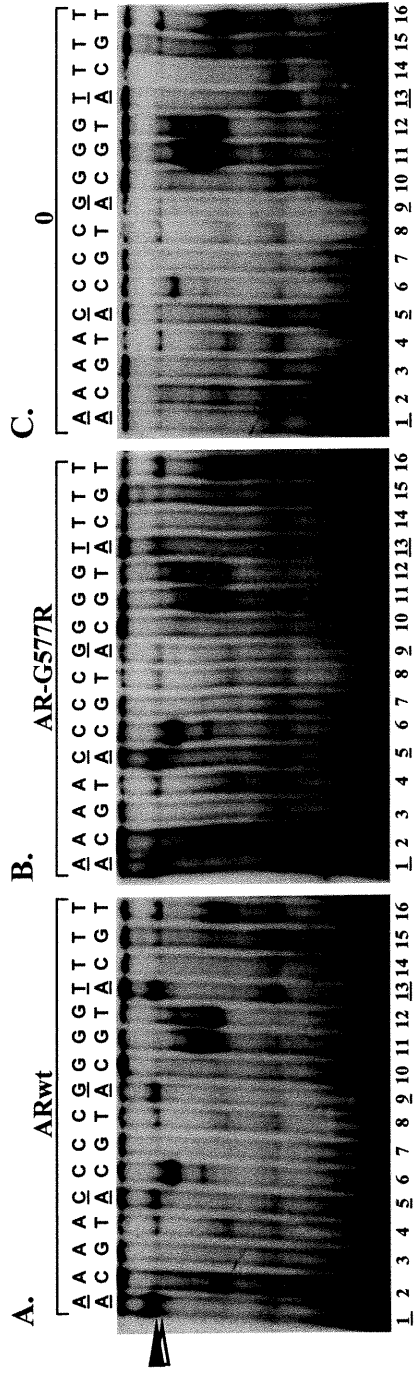
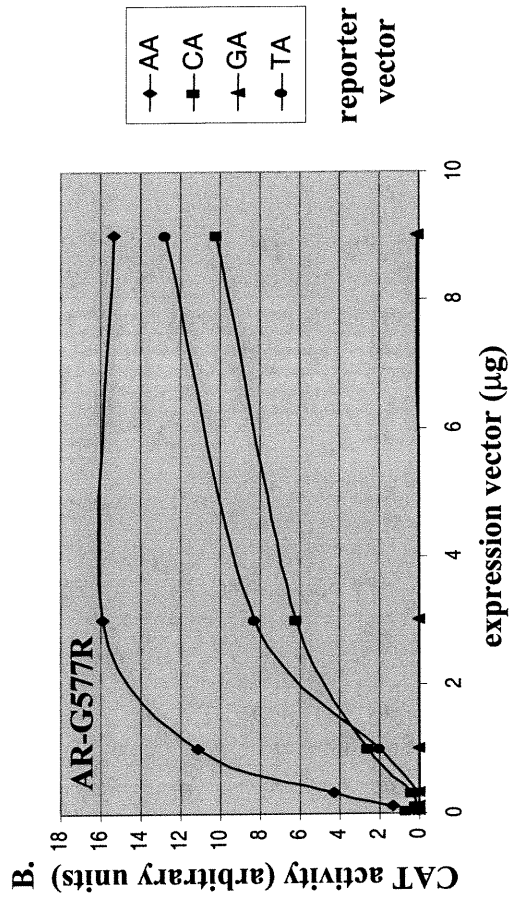
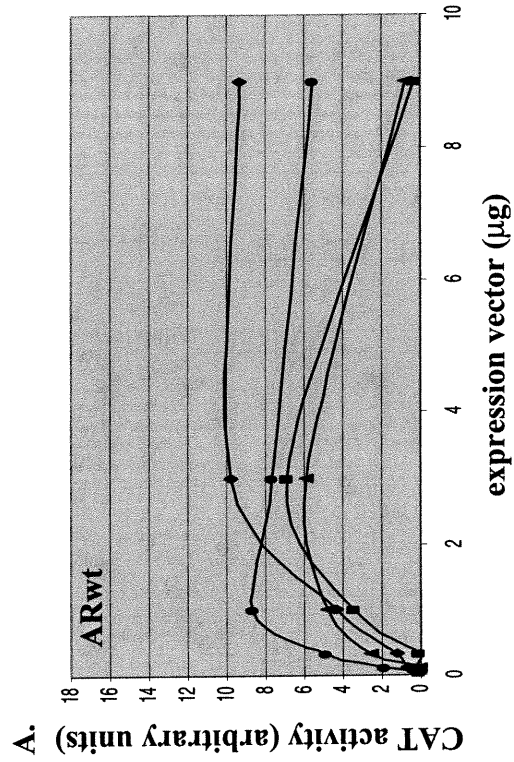


Fig. 6: AR-G577R does not transactivate a reporter vector containing two copies of the PuGGACA elements.

A. and **B.** HeLa cells were transiently cotransfected with varying concentrations of the expression vectors for the wt (ARwt) or the mt AR (AR-G577R), with CAT reporter vectors containing two copies of PuGNACA palindromes (AA, TA, CA or GA) inserted upstream of the Adenovirus major late promoter TATA box (2 μ g), and with the internal control pCMV- β Gal (2 μ g). After the calcium-phosphate precipitate was removed, cells were treated with mibolerone (MB, 2 nM) for 24 h. Chloramphenicol acetyl transferase (CAT) activity was measured in whole cell extracts. The experiment was repeated four times. A typical experiment is shown.

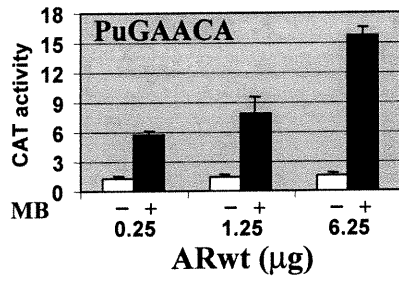


◆-AA
 ■-CA
 ▲-GA
 ●-TA
 reporter
 vector

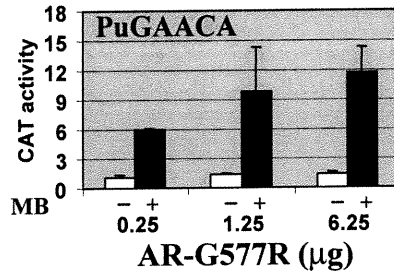
Fig. 7: Transactivation by AR-G577R is impaired with response elements containing GA motifs.

HeLa cells were transiently cotransfected with 0.25, 1.25 or 6.25 μg of expression vectors for the wt (ARwt) or the mt AR (AR-G577R), with 2 μg of reporter vectors containing two copies of the PuGAACA palindrome (**A** and **B**), the C1 ARE (**C** and **D**) or the hAR ARE1 (**E** and **F**), and with the internal control pCMV- β Gal (2 μg). Cells were treated or not with mibolerone (MB, 2 nM) for 24 h after the calcium phosphate precipitate was removed. The chloramphenicol acetyltransferase activity was measured in whole cell extracts after standardization for β -Galactosidase activity. Results are an average of three experiments.

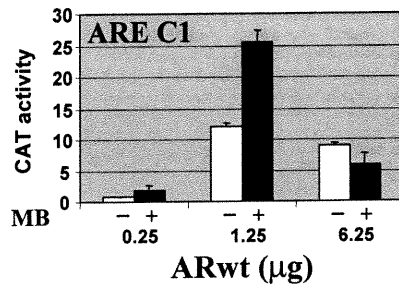
A.



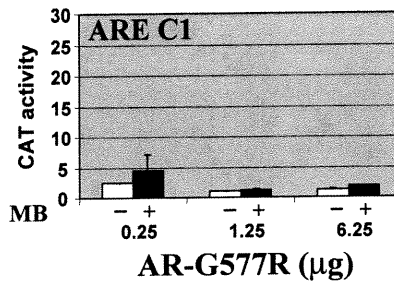
B.



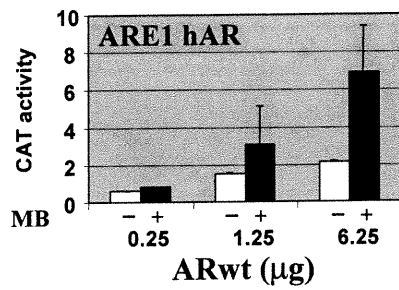
C.



D.



E.



F.

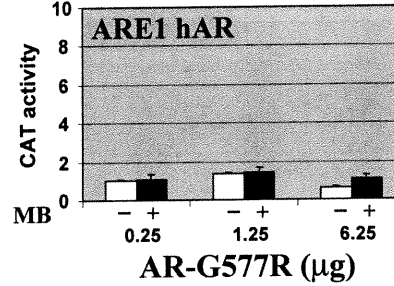


Fig. 8: Transactivation by AR-G577R is impaired with the probasin and PSA promoters.

A. and B. COS-1 cells were transiently cotransfected with 0.33, 1, or 3 μg of the expression vectors for the wt (ARwt) or the mt AR (AR-G577R), with the pMMTV-hGH reporter vector (3 μg), and with the internal control pRSV- βGal (2 μg). Cells were treated or not with mibolerone (MB, 2 nM) for 24 h after the calcium phosphate precipitate was removed. The hGH activity was measured in cell supernatants using an hGH-Elisa kit according to the manufacturer's instructions (Medicorp). hGH activity was adjusted according to β -Galactosidase activity C. and D. COS-1 cells were transiently cotransfected as described above except that the reporter vector contained the rat probasin promoter (pPB-hGH). Please note that different scales are used in panels C and D. E. and F. COS-1 cells were transiently cotransfected as described above except that the reporter vector contained the human PSA promoter (PSA-hGH). Results are an average of three experiments.

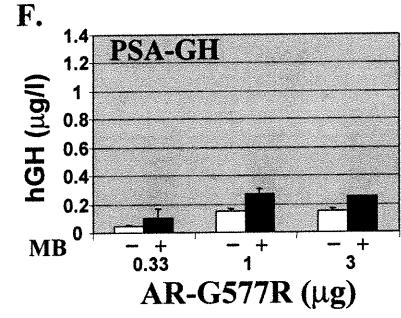
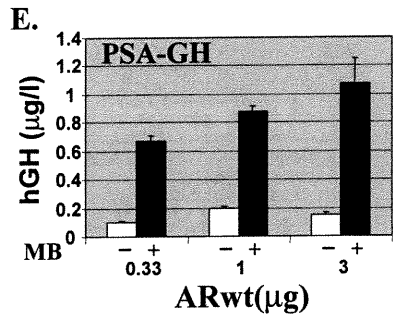
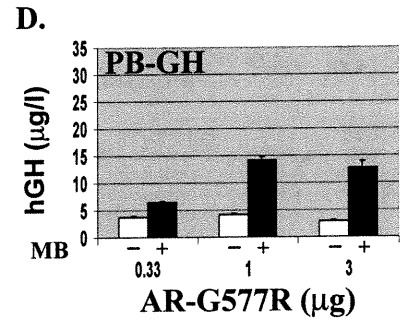
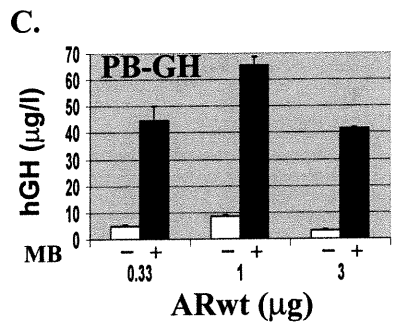
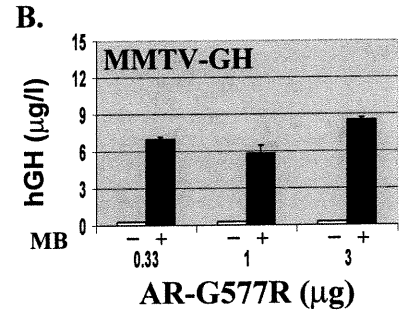
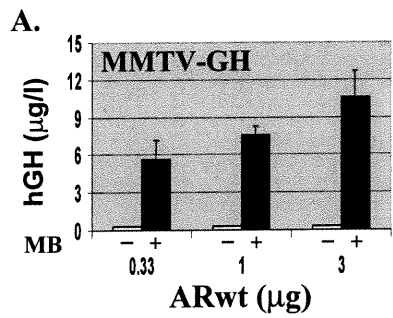


Fig. 9: Schematic description of modeled protein-DNA contacts in the half-complex between AR-G577R and the consensus ARE.

The last five base pairs of the TGTTCT half-site are shown. Note that the DNA is drawn underwound for reasons of clarity. The position of the DNA recognition helix in the GR-GRE complex (15) used as model for the complex between AR wt and the consensus ARE is indicated by an interrupted line. G indicates the position of the Gly residue at the first position of the P box. The position of the AR-G577R DNA recognition helix is based on the structure of the non-cognate complex between the GR mutant E/TRGR (49) and is drawn in bold. The position of the mutant Arg (R) residue and its contacts with the T at position +4 are indicated. Note the steric hindrance that would result between Arg577 C β and the methyl group of T+3 (drawn as a black circle) in the absence of a shift of the recognition helix.

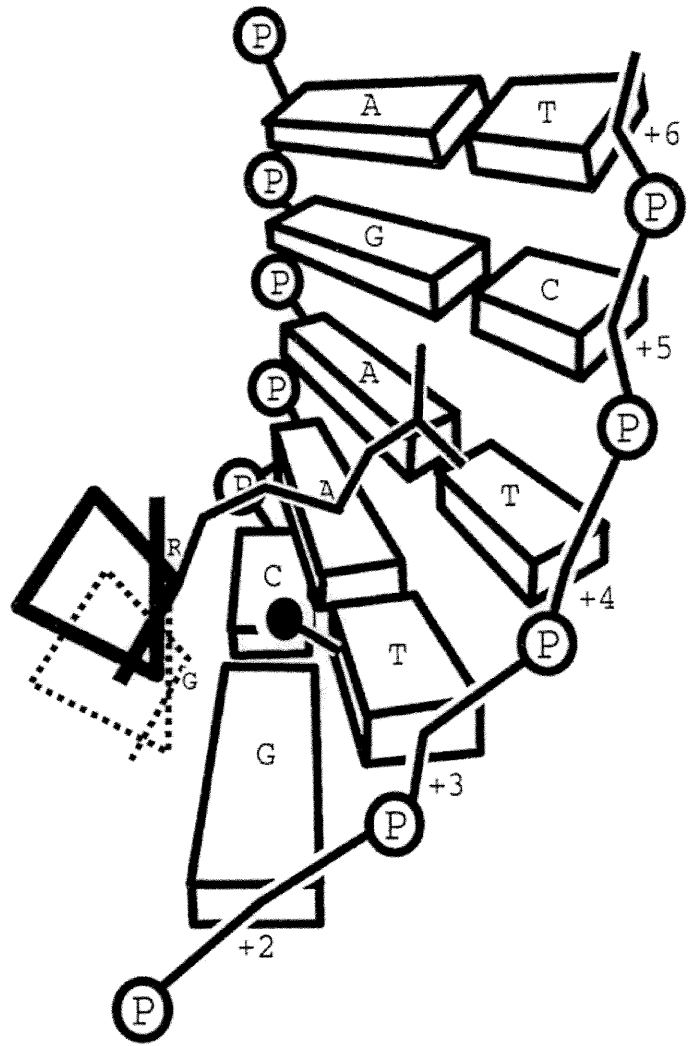


Fig. 10: Stereo view of the contacts between the AR-G577R DNA recognition helix and a PuGAACA half-site in a model derived from the E/TRGR-GRE complex.

Modeling of the complex between the AR-G577R DNA binding domain and the PuGAACA element was performed as described in Materials and Methods. Arrows point to the Ts at positions +3 and +4 and the G at position -5, as well as to the Arg (R) and Val (V) at positions 577 and 581, respectively. Arg interacts with the O4 of T+4, and with the O6 of G-5. Val makes a van der Waals contact with the methyl group of T+3.

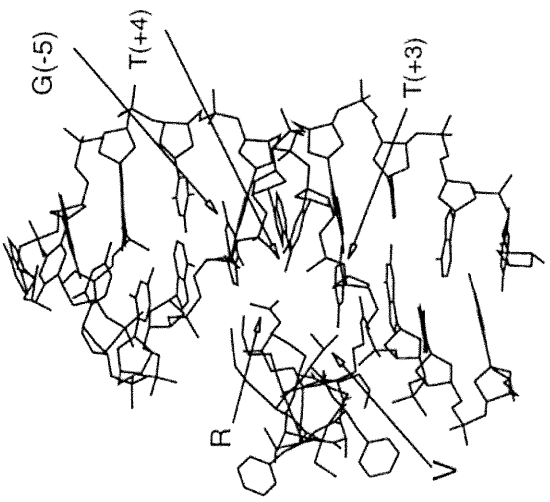
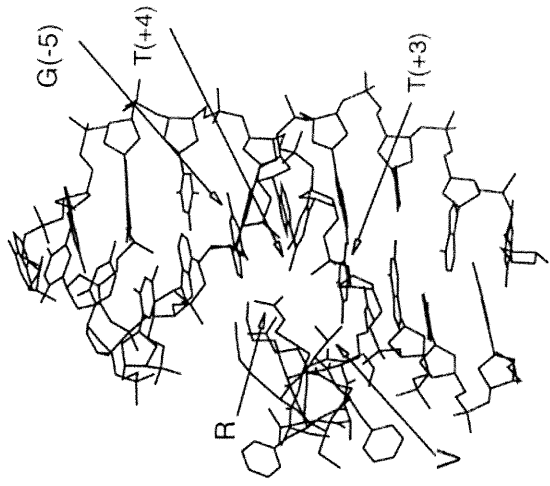


Table 1. Consensus and Natural AREs

Consensus Response Elements		-6.....-1	+1.....+6
Consensus ERE		PuGGTCA	NNN TGACCPy
Consensus ARE		GGA/TACA	NNN TGTTCT
Palindromic AREs		PuGNACA	NNN TGTNCPy
Natural AREs			
		-6.....-1	+1.....+6
rTAT GRE		t GTACA	gga TGTTCT
rProbasin ARE1		AtAgCA	tct TGTTCT
rProbasin ARE2		AGTAC t	cca a GaACC
MMTV-distal ARE		GtTACA	aac TGTTCT
MMTV-proximal ARE		GGT atc	aaa TGTTCT
hPSA androgen response region		GG at CA	ggg a GTCT c
hPSA ARE		AGAACA	gca a GTGCT
rC1 ARE		AGGACA	caa aaa TCC
rC3-(intron 1) ARE		AGTAC g	tga TGTTCT
hAR-ARE1		ct T t C t	gaa TGTCCT
hAR-ARE2		AGTAC t	cct g GaT gg

The sequence of a consensus ARE (10) and of the palindromic sequences bound by AR are shown compared to a consensus ERE. The lower panel provides a non-exhaustive list of natural GRE/AREs. The position of the two bases that differ between the ERE and ARE palindromes is underlined. Sequences that correspond to PuGNACA motifs in either arm of the palindromes are in bold. Refer to refs 29, 40, 36, 44, 31, 59, and 32 for description of the rat (r) TAT, rat probasin, MMTV, human (h) PSA, rat prostatic binding protein components C1 and C3 and human AR promoters, respectively.

CHAPITRE III – DISCUSSION ET PERSPECTIVES

De nombreuses mutations naturelles sont répertoriées au niveau du gène du AR, la plupart se retrouvant dans le LBD et le DBD. Les mutations menant à des délétions ou à des incorporations de codons stop trouvées dans le DBD résultent toutes en des cas de CAIS. Les mutations ponctuelles dans le DBD peuvent entraîner des cas de cancer de la prostate (présentement 8 mutations sont dénombrées dans la banque des mutations du gène du AR, <http://www.mcgill.ca/androgendb/>), des cas de CAIS (présentement, 15 mutations touchant 11 acides aminés différents) et des cas de PAIS (actuellement 18 mutations touchant 14 acides aminés différents incluant la nouvelle mutation G577R caractérisée). Même si la plupart de ces mutations n'ont pas été caractérisées au niveau de la fonction des récepteurs mutants, nous pouvons nous baser sur les données cristallographiques des DBDs du GR complexés à leurs éléments de réponse pour expliquer les phénotypes associés à ces mutations (Luisi et al., 1991). Les mutations touchant les résidus cystéines qui sont coordonnés par un atome de zinc, au sein des deux motifs de doigt de zinc, résultent toutes en des cas de CAIS. Cette coordination des cystéines par l'atome de zinc est très importante puisque non seulement elle stabilise les hélices α situées dans la partie carboxy-terminale de chacun des motifs de doigt de zinc, mais elle stabilise également le repliement du module de doigt de zinc du côté carboxy-terminal, essentiel à la dimérisation. L'effet de mutations portant sur les résidus impliqués dans l'interface de dimérisation, dans l'interaction avec les groupes phosphates de l'ADN et dans l'interaction avec les paires de bases de l'ADN sont aussi expliquées puisque l'absence de ces interactions cruciales pour la fixation du récepteur sur son élément de réponse empêche un positionnement adéquat et une conformation fonctionnelle du récepteur. La nouvelle mutation G577R dans le DBD du AR, associée à un cas de PAIS, s'avère intéressante à étudier puisqu'aucune fonction n'est connue pour le résidu glycine. La glycine fait partie de la boîte P, région importante pour la spécificité de l'interaction récepteur-ADN mais elle n'établit aucun contact avec l'ADN. Cependant l'acide aminé équivalent dans le ER, l'acide glutamique, interagit avec les deux paires de bases centrales dans le motif PuGGTCA. Cette interaction permet au ER de lier un motif différent de celui lié par

le AR et le GR. Ces deux paires de bases centrales sont les seules différences retrouvées entre les éléments de réponse du ER et du AR/GR.

Le but de la présente étude était d'étudier l'effet de la mutation G577R dans le AR sur la sélectivité des interactions récepteur-ADN. Afin d'arriver à cet objectif, nous avons utilisé une panoplie de seize sondes d'ADN palindromiques de motifs PuGNNCA dans nos expériences de retard sur gel, incluant les deux types d'élément de réponse aux récepteurs stéroïdiens, le ERE et le ARE/GRE. Par la suite, nous avons effectué des expériences de transactivation de promoteurs naturels et synthétiques par transfections transitoires dans les cellules HeLa.

3.1 Le récepteur des androgènes reconnaît les motifs PuGNACA.

En l'absence d'étude structurale, la liaison du DBD du AR à son élément de réponse reste mal caractérisée. Cependant, la conservation de 12 des 13 acides aminés de l'hélice de reconnaissance de l'ADN du GR nous donne une bonne idée du mécanisme d'interaction du AR avec l'ADN. En effet, seul le résidu en position 587 de l'hélice de reconnaissance de l'ADN n'est pas conservé, la valine correspondant dans le GR étant substituée par une alanine dans le contexte du AR. Selon les études cristallographiques du DBD du GR avec un GRE, ce résidu ne joue aucun rôle dans la reconnaissance de l'ADN. Il était donc prévisible que, comme le GR, le AR puisse lier les palindromes PuGNACA NNN TGTNCPy puisque les acides aminés Lys580, Val581 et Arg585 correspondant aux résidus dans le GR qui font des contacts avec les paires de bases de l'ADN sont conservés. Selon les données cristallographiques du DBD du GR, la Lys580 devrait établir un contact direct et un contact par l'intermédiaire d'une molécule d'eau avec le G en position -5 (voir figure 7B pour la numérotation des bases). La Val581 devrait, quant à elle, effectuer une liaison de type Van der Waals avec le T en position +3. Pour sa part, l'Arg585 devrait former deux contacts directs avec le G en position +2. Aucun contact n'est observé en position -4 ou +4 du motif d'ADN. Il n'est donc pas

surprenant que n'importe quelle base à cette position permette une liaison au AR (motifs PuGNACA).

Les études cristallographiques du DBD du ER (Schwabe et al., 1993) et du GR ne permettent pas de restreindre l'identité des bases en positions (+/-)1 et (+/-)6. La séquence consensus, qui comporte une purine en position -6 et un A en position -1, provient de l'analyse fonctionnelle des éléments de réponse issus de différents promoteurs de gènes cibles. Nous avons étudié l'identité de la base en position -1 en effectuant des expériences de retard sur gel. Nos expériences ont démontré dans le contexte du ERE que seule une purine à la position -1 permettait une liaison entre le ER et le palindrome de motif PuGGTCN. Cependant, nous n'avons pas effectué la même étude dans le contexte du ARE ou GRE. Il serait donc intéressant de poursuivre nos expériences pour comparer le rôle de la base en position -6 du motif NGGTCA et NGAACA dans un ERE et un ARE/GRE, respectivement. Même si ces bases ne font pas de contact avec les acides aminés des récepteurs, l'identité de ces positions peut être restreinte seulement à cause de la séquence des bases. En effet, l'angle entre deux bases consécutives et donc la position des bases diffèrent suivant la nature de ces bases (Pu/Pu versus Py/Pu).

3.2 La mutation G577R dans le AR altère l'affinité et la sélectivité des interactions entre le récepteur et ses éléments de réponses.

Nos résultats indiquent que la mutation G577R dans le AR altère l'affinité et la sélectivité des interactions du AR avec ses motifs cibles PuGNACA. En particulier, la liaison aux motifs PuGGACA est abolie ainsi que la transactivation d'éléments synthétiques ou naturels contenant ces motifs. La modélisation moléculaire par le programme Insight a été effectuée à partir de la structure cristallographique du complexe entre un GRE et le DBD du GR, en introduisant comme substitution à la première position de la boîte P une arginine à la place d'une glycine, ce qui correspond à la mutation G577R dans le AR que nous avons caractérisée. Un encombrement stérique est observé au niveau du carbone β de l'arginine avec le

groupe méthyle du T à la position +3 du motif TGTTCPy. Ceci a un effet déstabilisant sur l'interaction entre le AR et son élément de réponse, expliquant de façon générale l'affinité réduite de liaison observée entre le mutant G577R dans le AR et tous les motifs liés par le AR de type sauvage. Un effet similaire serait aussi observé avec tout autre acide aminé à l'exception de la glycine à cette position étant donnée que seule la glycine est dépourvue de chaîne latérale. Il est envisageable que plus la chaîne latérale est encombrante, tel que chez les acides aminés aromatiques, plus l'effet est drastique. Seul le cas de la proline à cette position est incertain: compte tenu de la structure particulière de sa chaîne latérale, il se peut que l'effet d'encombrement ne soit pas présent, ou au contraire qu'un effet plus drastique soit observé puisque la présence d'une proline induit un coude dans l'hélice α .

Pour ce qui est de la différence de sélectivité d'interaction avec l'ADN entre le récepteur sauvage et le mutant, les expériences de liaison à l'ADN démontrent que dans le cas du AR de type sauvage, les motifs PuGAACA et PuGTACA sont préférentiellement liés comparativement aux motifs PuGCACA et PuGGACA. Pour le mutant G577R, ce sont les motifs PuGAACA et PuGCACA qui sont les mieux liés, le motif PuGTACA est moins bien lié et le motif PuGGACA n'est pas lié. Dans le cas du AR de type sauvage, la glycine en première position de la boîte P ne fait aucun contact avec l'ADN de par l'absence de chaîne latérale. Il est possible qu'une glycine à cette position impose une conformation de l'hélice de reconnaissance de l'ADN rendant certains motifs préférés à d'autres. Dans le cas du mutant G577R, nous avons eu recours à une modélisation moléculaire pour examiner les causes de l'absence de liaison au motif PuGGACA. Nous avons utilisé comme structure de départ celle d'un mutant de GR contenant la boîte P du ER et la boîte D du TR (Gewirth et al., 1995). Dans cette structure, un déplacement latéral de l'hélice de reconnaissance de l'ADN permet d'accommoder le remplacement de Gly par Glu à la première position de la boîte P. Nous avons modélisé dans cette structure le remplacement de Glu par Arg en première position de la boîte P, et Ala par Val à la troisième position. Cette modélisation indique que le contact Van der Waals entre Val et T en position +3 de l'élément de réponse observé pour le GR de type sauvage

peut avoir lieu même après le déplacement de l'hélice de reconnaissance de l'ADN. De plus, en présence d'Arg à la première position de la boîte P, une influence favorable des charges négatives dans le sillon majeur de l'ADN en position +4 est constatée. Pour les motifs PuGAACA et PuGCACA qui ont respectivement un T et un G à la position +4, des interactions peuvent être établies entre le groupe amine chargé positivement de l'arginine et les groupes chargés négativement que présentent ces bases dans le sillon majeur de l'ADN. Un lien hydrogène entre le O4 du T à la position +4 et l'arginine peut être établi. De plus, l'arginine peut interagir avec le O6 du G en position -5 (figure 9 de l'article). Lorsqu'un G se retrouve en position +4, des interactions entre l'arginine et O6 et N7 du G peuvent être établies. La réduction de la liaison avec le motif PuGTACA comparativement aux deux précédents, peut s'expliquer par le fait que ce motif possède un A en position +4 et présente une charge positive sur le N6 en plus de la charge négative sur le N7 du A. Enfin lorsqu'un C est retrouvé à la position +4, comme dans le cas du motif PuGGACA qui n'est pas lié par le mutant G577R, seule une charge positive se retrouve sur le N4, ce qui mène à des interactions électrostatiques défavorables avec l'arginine elle-même chargée positivement. Ceci explique donc l'absence de liaison avec ce motif pour le mutant G577R dans le AR. Il est intéressant de souligner une étude avec le DBD du GR possédant la boîte P du ER auquel l'acide aminé en première position de la boîte P a été substitué par tous les acides aminés possibles (Zilliaccus et al, 1995). Dans cette étude, lorsqu'une arginine est en première position de la boîte P, le récepteur mutant ne se lie pas au motif PuGGACA. Par contre, les trois autres motifs PuGNACA sont liés avec le même ordre d'affinité que par le mutant G577R dans le AR.

Si la glycine en position 577 dans le AR avait été remplacée par une lysine, la spécificité de liaison aux motifs PuGNACA aurait probablement été la même que celle observée avec la mutation G577R dans le AR à cause de la charge positive présente dans les chaînes latérales de la lysine et de l'arginine. Par contre, la substitution de la glycine par un acide glutamique, l'acide aminé correspondant chez le ER, entraînerait une inversion dans l'ordre de préférence de liaison aux motifs

PuGNACA comparativement au mutant G577R dans le AR. En effet, l'acide glutamique étant chargé négativement, il va interagir avec les charges positives de la base en position +4 exposées dans le sillon majeur de l'ADN. Le C présente une charge positive, le A possède une charge positive et une négative, tandis que le T et le G n'ont que des charges négatives. Donc le mutant G577E se lierait préférentiellement au motif PuGGACA, un peu moins au motif PuGTACA et ne se lierait pas aux motifs PuGAACA et PuGCACA. L'étude de Zilliacus (Zilliacus et al, 1995) confirme bien cette hypothèse puisque le motif PuGGACA est le seul des quatre motifs PuGNACA à être effectivement lié par le GR comprenant la boîte P du ER avec un acide glutamique comme première position de la boîte P. Cependant, grâce aux deux autres mutations dans la boîte P, d'autres motifs PuGNNCA, dont le ERE, sont aussi liés dans cette étude. La mutation du premier acide aminé de la boîte P du AR en un acide glutamique, acide aminé correspondant chez le ER, ne devrait pas être suffisante pour changer sa spécificité en un récepteur liant un ERE malgré le fait que l'acide glutamique fait un contact direct avec un C en position +4 et un contact indirect par le biais d'une molécule d'eau avec le A en position +3 (Schwabe et al., 1993). En effet, il a été démontré chez le GR que lorsque celui-ci a un acide glutamique en première position de la boîte P, le récepteur mutant ne se lie pas à un ERE. Par contre, le récepteur mutant se lie faiblement à un GRE (PuGAACA) et il se lie encore très bien au motif PuGGACA comparativement au GR de type sauvage (Zilliacus et al, 1992). Ceci nous laisse croire que la valine en troisième position de la boîte P reste déterminante pour la spécificité de la liaison du GR et AR à l'ADN, à cause de sa liaison de type Van der Waals avec le groupe méthyle du T en position +3 de l'élément de réponse et ce malgré l'ajout de contacts possibles effectués par l'acide aminé en première position de la boîte P.

3.3 Rôle de l'acide aminé à la première position de la boîte P.

Une étude sur la première position de la boîte P du ER a été réalisée au laboratoire pour vérifier la fidélité d'un code de reconnaissance de l'ADN proposé

par Suzuki (Suzuki et al., 1994). Ce code se base sur des principes chimiques et stéréochimiques (taille des acides aminés et possibilité d'interaction entre bases et acides aminés par le biais de liaisons hydrogènes ou hydrophobes). La conclusion de cette étude est que toutes les mutations essayées sur l'acide glutamique en position 203 (premier acide aminé de la boîte P dans le ER) ont résulté en des récepteurs mutants qui peuvent encore se lier au palindrome normalement lié par le ER de type sauvage (motif PuGGTCA), à l'exception de la substitution en arginine (E203R). Cette liaison au motif PuGGTCA peut s'expliquer par le fait que la lysine en position 210 n'est pas mutée et continue à faire des contacts avec les deux paires de bases centrales du motif. Par contre, ces mutations permettent un gain de liaison à d'autres motifs dérivés du motif PuGNNCA, le motif PuGGTCA restant toutefois le mieux lié par les récepteurs mutants. Dans le cas de l'arginine à la première position de la boîte P dans le ER, soit le mutant E203R, aucun des motifs PuGNNCA testés n'est lié, y compris le motif PuGGTCA. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'arginine substituée à la place de l'acide glutamique ne peut pas interagir avec les mêmes bases des paires de bases centrales du motif PuGGTCA soient le C et le A sur le brin complémentaire. La chaîne latérale de l'arginine positivement chargée favoriserait des interactions avec le G et le T sur le brin opposé et entre en conflit avec la lysine en position 210 qui effectue les mêmes contacts selon les études cristallographiques du DBD du ER. Dans le contexte du AR, la mutation du premier acide aminé de la boîte P soit la glycine en une arginine permet au récepteur mutant de se lier encore à trois des quatre motifs PuGNACA reconnus par le AR de type sauvage. Ceci s'explique par le fait que dans le AR, la lysine correspondante ne fait aucun contact avec l'ADN, mais effectue un pont salin avec l'acide glutamique situé quatre positions plus loin.

Il semble donc que bien que l'acide aminé en première position de la boîte P effectue un contact direct avec la base située en position +4 dans le ER (données cristallographiques) et dans le mutant G577R du AR (modélisation moléculaire du mutant G577R dans le AR), son rôle dans la sélectivité du motif d'ADN lié soit secondaire par rapport à d'autres acides aminés de l'hélice de reconnaissance de

l'ADN. Dans le cas du ER, l'acide aminé qui forme les contacts cruciaux dans la discrimination du motif d'ADN lié pourrait être la lysine en position 210. Ce résidu effectue deux contacts directs sur les paires de bases centrales du motif PuGGTCA lié par le ER. L'acide aminé en première position de la boîte P contribue à réduire le nombre de motifs liés par son contact avec la base en position +4. En effet, nous avons observé que le remplacement de l'acide glutamique par l'asparagine, la glycine ou l'histidine, permet la liaison de plusieurs motifs PuGNNCA. Cependant quand l'acide glutamique occupe cette position, seul le palindrome avec le motif PuGGTCA (ERE consensus) est fortement lié, et le motif PuGGGCA est très faiblement lié. L'acide glutamique à cette position dans le contexte du ER, joue donc un rôle restrictif et ne permet la liaison du récepteur qu'à certains motifs d'ADN. Dans le cas du AR, l'acide aminé qui effectue les interactions prédominantes dans la sélectivité du motif d'ADN lié est la valine en position 581. Cette valine effectue une liaison de type Van der Waals avec le groupe méthyle du T en position +3 et les motifs PuGNACA sont donc liés par le AR. L'acide aminé en première position de la boîte P ne fait que diminuer l'affinité pour les motifs PuGNACA, et restreindre le nombre de motifs liés en effectuant un contact avec la base en position +4. Dans le cas de la mutation G577R dans le AR, seulement trois des motifs PuGNACA sont liés. Si un acide aminé chargé négativement comme l'acide glutamique ou l'acide aspartique occupait cette position, le nombre de motifs liés se réduirait probablement à deux, pour les raisons expliquées plus haut. En fait, seule la glycine (présente dans les récepteurs de type sauvage) dépourvue de chaîne latérale, permet une bonne affinité de liaison à tous les motifs PuGNACA. Chez le AR tout comme chez le ER, l'acide aminé occupant la première position de la boîte P jouera un rôle dans la restriction du nombre de motifs d'ADN liés.

3.4 La sélectivité de la liaison à l'ADN : rôle des acides aminés n'effectuant pas de contact avec l'ADN.

Il est également possible que des résidus ne contactant pas l'ADN influencent la sélectivité de liaison à l'ADN. Dans le contexte du ER, la Lys210 fait un contact avec les paires de bases centrales du motif PuGGTCA. Dans le contexte du AR/GR le même résidu fait un pont salin avec l'acide glutamique situé quatre positions après, à la fin de l'hélice de reconnaissance de l'ADN. Il est possible que cette interaction empêche le résidu lysine de faire les contacts observés chez le ER. L'acide glutamique à la fin de l'hélice de reconnaissance de l'ADN n'est pas conservé chez le ER, une glutamine étant retrouvée à cette position. Il se pourrait qu'il y ait absence de séquestration de la lysine par la glutamine chez le ER permettant une interaction de cette Lys avec l'ADN. Cette interaction contribuerait aussi à un réseau ordonné et orchestré par des molécules d'eau entre l'hélice de reconnaissance de l'ADN et les quatre paires de bases centrales du motif du ERE (PuGGTCA). Chez le AR/GR, ce réseau ordonné par des molécules d'eau n'est pas retrouvé puisqu'une interaction hydrophobe est impliquée dans la discrimination du motif lié.

Pour démontrer le rôle restrictif de cette lysine dans la spécificité de liaison du ER, nous pourrions introduire une mutation de la lysine en alanine. Ceci permettrait de vérifier qu'un plus grand nombre de sondes PuGNNCA pourrait être lié par le récepteur muté. De plus, une substitution de la glutamine en position 214 du ER par un acide glutamique pourrait permettre de tester si ce résidu peut séquestrer la lysine en position 210. La lysine n'interagissant plus avec les paires de bases centrales, cela favoriserait la liaison du ER de type sauvage et du récepteur mutant E203R à de nouveaux éléments de réponse. Il est toutefois possible que l'interaction entre la lysine et l'acide glutamique dans AR ou GR serve seulement à neutraliser la charge d'une lysine ne pouvant faire de contacts avec l'ADN dans le cas de ces récepteurs.

Il est possible que des acides aminés en dehors de l'hélice de reconnaissance de l'ADN puissent aussi jouer un rôle dans la sélectivité de la liaison à l'ADN. Une

autre étude au laboratoire amorcée récemment porte sur le rôle du deuxième doigt de zinc dans la liaison à l'ADN. En effectuant des constructions de chimères du DBD du ER avec le DBD du GR, il a été constaté que lorsque le premier doigt de zinc provient du ER et le deuxième doigt de zinc provient du GR, le DBD chimérique lie une douzaine d'éléments de réponse de motifs PuGNNCA, dont le motif PuGGTCA normalement lié par le ER, alors que seuls les palindromes contenant les motifs PuGGTCA et PuGGGCA sont liés par le ER de type sauvage. D'autres DBDs chimériques ont été construits et la région entre la boîte D et l'hélice α à la fin du deuxième doigt de zinc semble jouer un rôle dans la spécificité de liaison à l'ADN. La région est composée de dix acides aminés dont trois sont différents entre le ER et le GR. Ces trois résidus participent à l'interface de dimérisation chez le GR mais seulement deux d'entre eux sont impliqués chez le ER. Le résidu asparagine en position 232 chez le ER ne joue pas un rôle dans la dimérisation mais le résidu correspondant dans le GR, à savoir l'isoleucine en position 487, interagit avec la leucine en position 475 de l'autre unité du dimère via des interactions hydrophobes. Quand cette interaction hydrophobe supplémentaire est ajoutée dans le contexte du ER, le récepteur peut donc fixer un plus grand nombre d'éléments de réponse de motifs PuGNNCA que le ER de type sauvage. Grâce à ces résultats préliminaires, nous pensons que l'interface de dimérisation peut jouer un rôle dans la sélectivité de liaison à l'ADN en modulant la position des DBDs par rapport au sillon majeur de l'ADN.

3.5 Bases moléculaires du mécanisme d'interaction récepteur-ADN *in vivo*.

Malgré les données de la cristallographie, beaucoup reste à faire afin de comprendre les mécanismes de reconnaissance de l'ADN par les récepteurs, et d'obtenir un modèle des bases de l'interaction récepteur-ADN permettant de prédire les effets de mutations dans AR ou ER, ou de variations dans la séquence des éléments de réponse sur la sélectivité et l'affinité de liaison avec l'ADN. En effet, les éléments de réponse naturels aux androgènes sont souvent des palindromes

imparfaits, comportant une ou plusieurs substitutions au niveau de la séquence palindromique consensus GG(A/T)ACA NNN TGTTCT. Ces substitutions réduisent la force des interactions effectuées par Lys580, Val581 ou Arg585. Il serait donc intéressant d'étudier la contribution de chacun des trois différents contacts à la force d'interaction avec l'ADN par l'introduction de mutation à chacune de ces trois positions (remplacement par une alanine). La même étude peut être réalisée avec le ER, mais dans ce cas-ci, il y aurait quatre résidus à tester soit Glu203, Lys206, Lys210 et Arg211. La Lys206 et l'Arg211 établissent les mêmes contacts que la Lys580 et l'Arg585 du AR.

La plupart des AREs provenant de promoteurs naturels étudiés dans ce projet, ont dans l'un des deux bras du palindrome un motif pouvant effectuer les trois contacts entre le récepteur et les bases du motif d'après la cristallographie du DBD du GR avec un GRE. D'après ces mêmes études cristallographiques, en utilisant un GRE modifié ne permettant que des contacts spécifiques pour une unité du dimère sur l'un des deux bras du palindrome (les deux motifs PuGAACA sont séparés par quatre paires de bases au lieu de trois), des contacts non-spécifiques sont formés par l'autre unité du dimère. Ceci implique qu'un seul bras du palindrome doit être identique au palindrome consensus ou du moins doit pouvoir effectuer les contacts spécifiques pour permettre la liaison du dimère à l'élément de réponse. Dans le cas des AREs étudiés, il se pourrait bien que seulement une des deux unités du dimère effectue des contacts spécifiques et l'autre unité établisse des contacts non spécifiques plus ou moins forts avec l'ADN permettant une liaison transcriptionnellement productive du AR sur ces AREs. De plus, des études démontrent que la séquence des palindromes imparfaits peut contribuer à la spécificité de liaison par les récepteurs stéroïdiens (Nelson et al., 1999). En effet, certains palindromes imparfaits sont mieux liés par le AR que le GR ou le PR, même si ces récepteurs reconnaissent la même séquence palindromique consensus. Afin de comprendre ces effets, il serait intéressant d'effectuer la cristallographie du DBD du AR lié à un palindrome imparfait.

Enfin, des études ont indiqué que les régions entourant les éléments de réponse peuvent moduler la spécificité et l'affinité de liaison par les récepteurs nucléaires (Dana et al., 1994 ; Vanacker et al., 1999). De plus, il a été démontré qu'une région située en aval du deuxième doigt de zinc des récepteurs nucléaires orphelins monomériques NGFI-B et SF1 (boîte A) interagit avec les séquences en amont de sites PuGGTCA (Wilson et al., 1992 ; 1993). Nous pouvons donc supposer que les séquences flanquantes permettent de discriminer entre les différents récepteurs liant les mêmes motifs (PuGGTCA et PuGAACA). Il serait intéressant de caractériser les séquences entourant les éléments de réponse naturels du AR et de déterminer si ces séquences peuvent, en effet, influencer la stabilité et la spécificité des complexes récepteur-ADN.

BIBLIOGRAPHIE

Aarnisalo P, Palvimo JJ, Janne OA. CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998 Mar 3;95(5):2122-7.

Akin JW, Behzadian A, Tho SP, McDonough PG. Evidence for a partial deletion in the androgen receptor gene in a phenotypic male with azoospermia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991 Dec;165(6 Pt 1):1891-4.

Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W, Peeters B. The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1999 Sep;19(9):6085-97.

Alland L, Muhle R, Hou H Jr, Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 1997 May 1;387(6628):49-55.

Alroy I, Freedman LP. DNA binding analysis of glucocorticoid receptor specificity mutants. *Nucleic Acids Res.* 1992 Mar 11;20(5):1045-52.

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997 Aug 15;277(5328):965-8.

Arnold AP, Gorski RA. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 1984;7:413-42.

Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987 Jul 17;237(4812):268-75.

Barrack ER, Bujnovszky P, Walsh PC. Subcellular distribution of androgen receptors in human normal, benign hyperplastic, and malignant prostatic tissues: characterization of nuclear salt-resistant receptors. *Cancer Res.* 1983 Mar;43(3):1107-16.

Baum MJ. Neuroendocrinology of sexual behavior in the male. *Behavioral Endocrinology* 1992;97-130.

Benecke A, Chambon P, Gronemeyer H. Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep.* 2000 Aug;1(2):151-7.

Berrevoets CA, Doesburg P, Steketee K, Trapman J, Brinkmann AO. Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2). *Mol. Endocrinol.* 1998 Aug;12(8):1172-83.

Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urol.* 1984 Sep;132(3):474-9.

Bevan CL, Hoare S, Claessens F, Heery DM, Parker MG. The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol. Cell. Biol.* 1999 Dec;19(12):8383-92.

Blok LJ, de Ruiter PE, Brinkmann AO. Androgen receptor phosphorylation. *Endocr. Res.* 1996 Aug;22(3):197-219.

Blok LJ, de Ruiter PE, Brinkmann AO. Forskolin-induced dephosphorylation of the androgen receptor impairs ligand binding. *Biochemistry* 1998 Mar 17;37(11):3850-7.

Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 1995 Jun 1;375(6530):377-82.

Brinkmann AO, Klaasen P, Kuiper GG, van der Korput JA, Bolt J, de Boer W, Smit A, Faber PW, van Rooij HC, Geurts van Kessel A, Voorhorst MM, Mulder E, Trapman J. Structure and function of the androgen receptor. *Urol. Res.* 1989;17(2):87-93.

Brown TR, Lubahn DB, Wilson EM, Joseph DR, French FS, Migeon CJ. Deletion of the steroid-binding domain of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988 Nov;85(21):8151-5.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997 Oct 16;389(6652):753-8.

Caamano CA, Morano MI, Dalman FC, Pratt WB, Akil H. A conserved proline in the hsp90 binding region of the glucocorticoid receptor is required for hsp90 heterocomplex stabilization and receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 1998 Aug 7;273(32):20473-80.

Carter CS. Hormonal influences on human sexual behavior. *Behavioral Endocrinology* 1992;131-142.

Celotti F, Negri Cesi P. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992 Oct;43(5):469-77.

Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.* 1994 Aug 11;22(15):3181-6.

Chamberlain NL, Whitacre DC, Miesfeld RL. Delineation of two distinct type 1 activation functions in the androgen receptor amino-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 1996 Oct 25;271(43):26772-8.

Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 1988a Apr 15;240(4850):324-6.

Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988b Oct;85(19):7211-5.

Chang C, Saltzman A, Yeh S, Young W, Keller E, Lee HJ, Wang C, Mizokami A. Androgen receptor: an overview. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1995;5(2):97-125.

Choi WT, MacLean HE, Chu S, Warne GL, Zajac JD. Kennedy's disease: genetic diagnosis of an inherited form of motor neuron disease. *Aust. NZ J. Med.* 1993 Apr;23(2):187-92.

Choo JJ, Emery PW, Rothwell NJ. Dose-dependent effects of an anabolic steroid, nandrolone phenylpropionate (Durabolin), on body composition and muscle protein metabolism in female rats. *Ann. Nutr. Metab.* 1991;35(3):141-7.

Choong CS, Kemppainen JA, Zhou ZX, Wilson EM. Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol. Endocrinol.* 1996 Dec;10(12):1527-35.

Choudhry R, Hodgins MB, Van der Kwast TH, Brinkmann AO, Boersma WJ. Localization of androgen receptors in human skin by immunohistochemistry: implications for the hormonal regulation of hair growth, sebaceous glands and sweat glands. *J. Endocrinol.* 1992 Jun;133(3):467-75.

Claessens F, Alen P, Devos A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W. The androgen-specific probasin response element 2 interacts differentially with androgen and glucocorticoid receptors. *J. Biol. Chem.* 1996 Aug 9;271(32):19013-6.

Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO, Trapman J. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J. Biol. Chem.* 1996 Mar 15;271(11):6379-88.

Coetzee GA, Ross RK. Re: Prostate cancer and the androgen receptor. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994 Jun 1;86(11):872-3.

Coffey DS, Walsh PC. Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol. Clin. North Am.* 1990 Aug;17(3):461-75.

Coffey DS. Prostate cancer. An overview of an increasing dilemma. *Cancer* 1993 Feb 1;71(3 Suppl):880-6.

Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Cato AC, Hittmair A, Radmayr C, Eberle J, Bartsch G, Klocker H. Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol. Endocrinol.* 1993 Dec;7(12):1541-50.

Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr. Rev.* 1987 Aug;8(3):338-62.

Dahlman-Wright K, Siltala-Roos H, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA. Protein-protein interactions facilitate DNA binding by the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* 1990 Aug 15;265(23):14030-5.

Dana SL, Hoener PA, Wheeler DA, Lawrence CB, McDonnell DP. Novel estrogen response elements identified by genetic selection in yeast are differentially responsive to estrogens and antiestrogens in mammalian cells. *Mol. Endocrinol.* 1994 Sep;8(9):1193-207.

Danielsen M, Hinck L, Ringold GM. Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* 1989 Jun 30;57(7):1131-8.

Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.* 1998 Nov 1;12(21):3343-56.

DeFranco DB. Regulation of steroid receptor subcellular trafficking. *Cell Biochem. Biophys.* 1999;30(1):1-24.

Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1992 Oct;88(1-3):15-22.

Ding XF, Anderson CM, Ma H, Hong H, Uht RM, Kushner PJ, Stallcup MR. Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol. Endocrinol.* 1998 Feb;12(2):302-13.

Evans BA, Ismail RA, France T, Hughes IA. Analysis of the androgen receptor gene structure in a patient with complete androgen insensitivity syndrome. *J. Endocrinol.* 1991;129(Suppl.):65.

Faber PW, Kuiper GG, van Rooij HC, van der Korput JA, Brinkmann AO, Trapman J. The N-terminal domain of the human androgen receptor is encoded by one, large exon. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1989 Feb;61(2):257-62.

Fenton MA, Shuster TD, Fertig AM, Taplin ME, Kolvenbag G, Bublely GJ, Balk SP. Functional characterization of mutant androgen receptors from androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 1997 Aug;3(8):1383-8.

Figg WD, Sartor O, Cooper MR, Thibault A, Bergan RC, Dawson N, Reed E, Myers CE. Prostate specific antigen decline following the discontinuation of flutamide in patients with stage D2 prostate cancer. *Am. J. Med.* 1995 Apr;98(4):412-4.

Freedman LP, Luisi BF, Korszun ZR, Basavappa R, Sigler PB, Yamamoto KR. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 1988 Aug 11;334(6182):543-6.

Freedman LP, Towers TL. DNA binding properties of the vitamin D3 receptor zinc finger region. *Mol. Endocrinol.* 1991 Dec;5(12):1815-26.

Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr. Rev.* 1992 May;13(2):129-45.

Freedman LP, Luisi BF. On the mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptors: a structural and functional perspective. *J. Cell. Biochem.* 1993 Feb;51(2):140-50.

Friedman LS, Gayther SA, Kurosaki T, Gordon D, Noble B, Casey G, Ponder BA, Anton-Culver H. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. *Am. J. Hum. Genet.* 1997 Feb;60(2):313-9.

Froesch BA, Takayama S, Reed JC. BAG-1L protein enhances androgen receptor function. *J. Biol. Chem.* 1998 May 8;273(19):11660-6.

Gaddipati JP, McLeod DG, Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Finger MJ, Moul JW, Srivastava S. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):2861-4.

Gao T, Marcelli M, McPhaul MJ. Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1996 Sep;59(1):9-20.

Gao T, McPhaul MJ. Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists. *Mol. Endocrinol.* 1998 May;12(5):654-63.

Gast A, Neuschmid-Kaspar F, Klocker H, Cato AC. A single amino acid exchange abolishes dimerization of the androgen receptor and causes Reifenstein syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1995 Apr 28;111(1):93-8.

Gewirth DT, Sigler PB. The basis for half-site specificity explored through a non-cognate steroid receptor-DNA complex. *Nat. Struct. Biol.* 1995 May;2(5):386-94.

Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997 Apr 1;94(7):3320-3.

Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coactivators. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1997 Apr;9(2):222-32.

Gobinet J, Auzou G, Nicolas JC, Sultan C, Jalaguier S. Characterization of the interaction between androgen receptor and a new transcriptional inhibitor, SHP. *Biochemistry* 2001 Dec 18;40(50):15369-77.

Gonzalez-Cadavid NF, Swerdloff RS, Lemmi CA, Rajfer J. Expression of the androgen receptor gene in rat penile tissue and cells during sexual maturation. *Endocrinology* 1991 Sep;129(3):1671-8.

Gorski RA. Critical role for the medial preoptic area in the sexual differentiation of the brain. *Prog. Brain Res.* 1984;61:129-46.

Griffin JE, Wilson JD. The androgen resistance syndromes: 5 α -Reductase deficiency, testicular feminization, and related disorders. *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* 1989;1919-44.

Grino PB, Griffin JE, Wilson JD. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 1990 Feb;126(2):1165-72.

Harding AE, Thomas PK, Baraitser M, Bradbury PG, Morgan-Hughes JA, Ponsford JR. X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: a report of ten cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1982 Nov;45(11):1012-9.

He WW, Fischer LM, Sun S, Bilhartz DL, Zhu XP, Young CY, Kelley DB, Tindall DJ. Molecular cloning of androgen receptors from divergent species with a polymerase chain reaction technique: complete cDNA sequence of the mouse androgen receptor and isolation of androgen receptor cDNA probes from dog, guinea

pig and clawed frog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990 Sep 14;171(2):697-704.

He B, Minges JT, Lee LW, Wilson EM. The FXXLF motif mediates androgen receptor-specific interactions with coregulators. *J. Biol. Chem.* 2002 Mar 22;277(12):10226-35.

Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 1997 Jun 12;387(6634):733-6.

Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie JR, Seto E, Eisenman RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 1997 May 1;387(6628):43-8.

Hiort O, Sinnecker GH, Holterhus PM, Nitsche EM, Kruse K. Inherited and de novo androgen receptor gene mutations: investigation of single-case families. *J. Pediatr.* 1998 Jun;132(6):939-43.

Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, Bartsch G, Klocker H, Hittmair A. Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer Res.* 1995 Jul 15;55(14):3068-72.

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985 Dec 19-1986 Jan 1;318(6047):635-41.

Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL, Stallcup MR. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding

domains of steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996 May 14;93(10):4948-52.

Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol. Endocrinol.* 1996 Oct;10(10):1167-77.

Housley PR, Sanchez ER, Danielsen M, Ringold GM, Pratt WB. Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. A two-site model for hsp90 binding to the steroid binding domain. *J. Biol. Chem.* 1990 Aug 5;265(22):12778-81.

Ikonen T, Palvimo JJ, Janne OA. Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J. Biol. Chem.* 1997 Nov 21;272(47):29821-8.

Imperato-McGinley J, Miller M, Wilson JD, Peterson RE, Shackleton C, Gajdusek DC. A cluster of male pseudohermaphrodites with 5 alpha-reductase deficiency in Papua New Guinea. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 1991 Apr;34(4):293-8.

Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA. The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res.* 1995 May 1;55(9):1937-40.

Irvine RA, Ma H, Yu MC, Ross RK, Stallcup MR, Coetzee GA. Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum. Mol. Genet.* 2000 Jan 22;9(2):267-74.

Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO. Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem. J.* 1993 Aug 1;293 (Pt 3):761-8.

Jenster G, de Ruiter PE, van der Korput HA, Kuiper GG, Trapman J, Brinkmann AO. Changes in the abundance of androgen receptor isotypes: effects of ligand treatment, glutamine-stretch variation, and mutation of putative phosphorylation sites. *Biochemistry* 1994 Nov 29;33(47):14064-72.

Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 1995 Mar 31;270(13):7341-6.

Jost A. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1970 Aug 6;259(828):119-30.

Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)_n-expanded neuronopathies. *Hum. Mol. Genet.* 1995 Apr;4(4):523-7.

Kelley D, Sassoon D, Segil N, Scudder M. Development and hormone regulation of androgen receptor levels in the sexually dimorphic larynx of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 1989 Jan;131(1):111-8.

Kemppainen JA, Lane MV, Sar M, Wilson EM. Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones. *J. Biol. Chem.* 1992 Jan 15;267(2):968-74.

Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, Trapman J, Cleutjens K, Noordzij A, Visakorpi T, Kallioniemi OP. Androgen receptor gene

amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 1997 Jan 15;57(2):314-9.

Komi PV, Karlsson J. Skeletal muscle fibre types, enzyme activities and physical performance in young males and females. *Acta Physiol. Scand.* 1978 Jun;103(2):210-8.

Kraus WL, McInerney EM, Katzenellenbogen BS. Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 Dec 19;92(26):12314-8.

Kuonen-Boumeester V, Van der Kwast TH, van Putten WL, Claassen C, van Ooijen B, Henzen-Logmans SC. Immunohistochemical determination of androgen receptors in relation to oestrogen and progesterone receptors in female breast cancer. *Int. J. Cancer* 1992 Oct 21;52(4):581-4.

Kuiper GG, de Ruiter PE, Trapman J, Boersma WJ, Grootegoed JA, Brinkmann AO. Localization and hormonal stimulation of phosphorylation sites in the LNCaP-cell androgen receptor. *Biochem. J.* 1993 Apr 1;291 (Pt 1):95-101.

Kurokawa R, Yu VC, Naar A, Kyakumoto S, Han Z, Silverman S, Rosenfeld MG, Glass CK. Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev.* 1993 Jul;7(7B):1423-35.

Labrie F, Belanger A, Simard J, Labrie C, Dupont A. Combination therapy for prostate cancer. Endocrine and biologic basis of its choice as new standard first-line therapy. *Cancer* 1993 Feb 1;71(3 Suppl):1059-67.

Landel CC, Kushner PJ, Greene GL. The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins. *Mol. Endocrinol.* 1994 Oct;8(10):1407-19.

Langley E, Zhou ZX, Wilson EM. Evidence for an anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer. *J. Biol. Chem.* 1995 Dec 15;270(50):29983-90.

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991 Jul 4;352(6330):77-9.

Lobaccaro JM, Lumbroso S, Belon C, Galtier-Dereure F, Bringer J, Lesimple T, Namer M, Cutuli BF, Pujol H, Sultan C. Androgen receptor gene mutation in male breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* 1993 Nov;2(11):1799-802.

Lu S, Tsai SY, Tsai MJ. Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Res.* 1997 Oct 15;57(20):4511-6.

Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 1988a Apr 15;240(4850):327-30.

Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS, Wilson EM. The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol. Endocrinol.* 1988b Dec;2(12):1265-75.

Lubahn DB, Tan JA, Quarmby VE, Sar M, Joseph DR, French FS, Wilson EM. Structural analysis of the human and rat androgen receptors and expression in male reproductive tract tissues. *Ann. NY Acad. Sci.* 1989a;564:48-56.

Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM, French FS. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989b Dec;86(23):9534-8.

Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991 Aug 8;352(6335):497-505.

Lyon MF, Glenister PH. Reduced reproductive performance in androgen-resistant Tfm/Tfm female mice. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1980 Jun 23;208(1170):1-12.

Mader S, Kumar V, de Verneuil H, Chambon P. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* 1989 Mar 16;338(6212):271-4.

Mader S, Chambon P, White JH. Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 1993 Mar 11;21(5):1125-32.

Matsuura T, Demura T, Aimoto Y, Mizuno T, Moriwaka F, Tashiro K. Androgen receptor abnormality in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology* 1992 Sep;42(9):1724-6.

McLeod DG. Antiandrogenic drugs. *Cancer* 1993 Feb 1;71(3 Suppl):1046-9.

McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD. Genetic basis of endocrine disease. 4. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993 Jan;76(1):17-23.

Mhatre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, Pinsky L. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat. Genet.* 1993 Oct;5(2):184-8.

Michel G, Baulieu EE. An approach to the anabolic action of androgens by an experimental system. *Environ. Qual. Saf. Suppl.* 1976;(5):54-9.

Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E. Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987 Mar 13;143(2):740-8.

Miyamoto KK, McSherry SA, Dent GA, Sar M, Wilson EM, French FS, Sharief Y, Mohler JL. Immunohistochemistry of the androgen receptor in human benign and malignant prostate tissue. *J. Urol.* 1993 May;149(5):1015-9.

Miyamoto H, Yeh S, Wilding G, Chang C. Promotion of agonist activity of antiandrogens by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998 Jun 23;95(13):7379-84.

Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr. Rev.* 1987 Feb;8(1):1-28.

Moore MC, Lindzey J. The physiological basis of sexual behavior in male reptiles. *Biology of the Reptilia* 1992;70-113.

Mowszowicz I, Lee HJ, Chen HT, Mestayer C, Portois MC, Cabrol S, Mauvais-Jarvis P, Chang C. A point mutation in the second zinc finger of the DNA-binding domain of the androgen receptor gene causes complete androgen insensitivity in two siblings with receptor-positive androgen resistance. *Mol. Endocrinol.* 1993 Jul;7(7):861-9.

Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 1997 May 2;89(3):373-80.

Nance MA. Clinical aspects of CAG repeat diseases. *Brain Pathol.* 1997 Jul;7(3):881-900.

Nelson CC, Hendy SC, Shukin RJ, Cheng H, Bruchofsky N, Koop BF, Rennie PS. Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* 1999 Dec;13(12):2090-107.

Newmark JR, Hardy DO, Tonb DC, Carter BS, Epstein JI, Isaacs WB, Brown TR, Barrack ER. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992 Jul 15;89(14):6319-23.

Nordeen SK, Suh BJ, Kuhnel B, Hutchison CA 3D. Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. *Mol. Endocrinol.* 1990 Dec;4(12):1866-73.

Nucifora FC Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 2001 Mar 23;291(5512):2423-8.

O'Nate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 1995 Nov 24;270(5240):1354-7.

O'Nate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, O'Malley BW. 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.* 1998 May 15;273(20):12101-8.

Perlmann T, Rangarajan PN, Umesono K, Evans RM. Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes. Dev.* 1993 Jul;7(7B):1411-22.

Pochi PE, Strauss JS. Endocrinologic control of the development and activity of the human sebaceous gland. *J. Invest. Dermatol.* 1974 Mar;62(3):191-201.

Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1993 Oct 15;268(29):21455-8.

Quigley CA, Evans BA, Simental JA, Marschke KB, Sar M, Lubahn DB, Davies P, Hughes IA, Wilson EM, French FS. Complete androgen insensitivity due to deletion of exon C of the androgen receptor gene highlights the functional importance of the second zinc finger of the androgen receptor in vivo. *Mol. Endocrinol.* 1992 Jul;6(7):1103-12.

Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr. Rev.* 1995 Jun;16(3):271-321.

Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 1995 Dec 14;378(6558):681-9.

Ricciardelli C, Horsfall DJ, Skinner JM, Henderson DW, Marshall VR, Tilley WD. Development and characterization of primary cultures of smooth muscle cells from the fibromuscular stroma of the guinea pig prostate. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1989 Nov;25(11):1016-24.

Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Faber PW, Schweikert HU, van Rooij HC, Zegers ND, Hodgins MB, Degenhart HJ, Trapman J, Brinkmann AO. Aberrant splicing of androgen receptor mRNA results in synthesis of a nonfunctional receptor protein in a patient with androgen insensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990 Oct;87(20):7866-70.

Robyr D, Wolffe AP, Wahli W. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol. Endocrinol.* 2000 Mar;14(3):329-47.

Ross JK, Pusateri DJ, Shultz TD. Dietary and hormonal evaluation of men at different risks for prostate cancer: fiber intake, excretion, and composition, with in vitro evidence for an association between steroid hormones and specific fiber components. *Am. J. Clin. Nutr.* 1990 Mar;51(3):365-70.

Roy AK, Chatterjee B. Androgen action. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1995;5(2):157-76.

Sack JS, Kish KF, Wang C, Attar RM, Kiefer SE, An Y, Wu GY, Scheffler JE, Salvati ME, Krystek SR Jr, Weinmann R, Einspahr HM. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant

complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001 Apr 24;98(9):4904-9.

Sanchez ER, Faber LE, Henzel WJ, Pratt WB. The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70- and 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry* 1990 May 29;29(21):5145-52.

Sassoon D, Kelley DB. The sexually dimorphic larynx of *Xenopus laevis*: development and androgen regulation. *Am. J. Anat.* 1986 Dec;177(4):457-72.

Saunders PT, Padayachi T, Tincello DG, Shalet SM, Wu FC. Point mutations detected in the androgen receptor gene of three men with partial androgen insensitivity syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 1992 Sep;37(3):214-20.

Schena M, Freedman LP, Yamamoto KR. Mutations in the glucocorticoid receptor zinc finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities. *Genes Dev.* 1989 Oct;3(10):1590-601.

Schuermans AL, Bolt J, Voorhorst MM, Blankenstein RA, Mulder E. Regulation of growth and epidermal growth factor receptor levels of LNCaP prostate tumor cells by different steroids. *Int. J. Cancer* 1988 Dec 15;42(6):917-22.

Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 1993 Nov 5;75(3):567-78.

Shan JD, Porvari K, Ruokonen M, Karhu A, Launonen V, Hedberg P, Oikarinen J, Vihko P. Steroid-involved transcriptional regulation of human genes encoding

prostatic acid phosphatase, prostate-specific antigen, and prostate-specific glandular kallikrein. *Endocrinology* 1997 Sep;138(9):3764-70.

Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent. Prog. Horm. Res.* 1997;52:141-65.

Sleddens HF, Oostra BA, Brinkmann AO, Trapman J. Trinucleotide repeat polymorphism in the androgen receptor gene (AR). *Nucleic Acids Res.* 1992 Mar 25;20(6):1427.

Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* 1997 Jun;11(6):657-66.

Soloway MS, Matzkin H. Antiandrogenic agents as monotherapy in advanced prostatic carcinoma. *Cancer* 1993 Feb 1;71(3 Suppl):1083-8.

Sonoda T, Itami S, Kurata S, Takayasu S. Influences of gonadal and adrenal androgens on the side glands of *Suncus murinus*. *Endocrinol. Jpn.* 1991 Jun;38(3):253-8.

Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA, Ostrander EA. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res.* 1997 Mar 15;57(6):1194-8.

Sultan C, Lumbroso S, Poujol N, Belon C, Boudon C, Lobaccaro JM. Mutations of androgen receptor gene in androgen insensitivity syndromes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993 Nov;46(5):519-30.

Suzuki M, Yagi N. DNA recognition code of transcription factors in the helix-turn-helix, probe helix, hormone receptor, and zinc finger families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 Dec 20;91(26):12357-61.

Suzuki H, Akakura K, Komiya A, Aida S, Akimoto S, Shimazaki J. Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: relation to antiandrogen withdrawal syndrome. *Prostate* 1996 Sep;29(3):153-8.

Syms AJ, Nag A, Norris JS, Smith RG. Glucocorticoid effects on growth, and androgen receptor concentrations in DDT1MF-2 cell lines. *J. Steroid Biochem.* 1987 Aug;28(2):109-16.

Tan J, Sharief Y, Hamil KG, Gregory CW, Zang DY, Sar M, Gumerlock PH, deVere White RW, Pretlow TG, Harris SE, Wilson EM, Mohler JL, French FS. Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol. Endocrinol.* 1997 Apr;11(4):450-9.

Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 1995 May 25;332(21):1393-8.

Taplin ME, Bubley GJ, Ko YJ, Small EJ, Upton M, Rajeshkumar B, Balk SP. Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res.* 1999 Jun 1;59(11):2511-5.

Tetel MJ, Jung S, Carbajo P, Ladtkow T, Skafar DF, Edwards DP. Hinge and amino-terminal sequences contribute to solution dimerization of human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 1997 Jul;11(8):1114-28.

Tetel MJ, Giangrande PH, Leonhardt SA, McDonnell DP, Edwards DP. Hormone-dependent interaction between the amino- and carboxyl-terminal domains of progesterone receptor in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol.* 1999 Jun;13(6):910-24.

Thody AJ, Shuster S. Control and function of sebaceous glands. *Physiol. Rev.* 1989 Apr;69(2):383-416.

Tilley WD, Marcelli M, Wilson JD, McPhaul MJ. Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989 Jan;86(1):327-31.

Towers TL, Luisi BF, Asianov A, Freedman LP. DNA target selectivity by the vitamin D3 receptor: mechanism of dimer binding to an asymmetric repeat element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993 Jul 1;90(13):6310-4.

Trachtenberg J, Hicks LL, Walsh PC. Androgen- and estrogen-receptor content in spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 1980 May;65(5):1051-9.

Trapman J, Klaassen P, Kuiper GG, van der Korput JA, Faber PW, van Rooij HC, Geurts van Kessel A, Voorhorst MM, Mulder E, Brinkmann AO. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988 May 31;153(1):241-8.

Trapman J, Brinkmann AO. The androgen receptor in prostate cancer. *Pathol. Res. Pract.* 1996 Jul;192(7):752-60.

Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 1994;63:451-86.

Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol. Endocrinol.* 2000 Aug;14(8):1162-74.

Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989 Jun 30;57(7):1139-46.

Vanacker JM, Pettersson K, Gustafsson JA, Laudet V. Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO J.* 1999 Aug 2;18(15):4270-9.

Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, van Rooij HC, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990a Dec 14;173(2):534-40.

Veldscholte J, Voorhorst-Ogink MM, Bolt-de Vries J, van Rooij HC, Trapman J, Mulder E. Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: high affinity for progestagenic and estrogenic steroids. *Biochim. Biophys. Acta* 1990b Apr 9;1052(1):187-94.

Veldscholte J, Berrevoets CA, Brinkmann AO, Grootegoed JA, Mulder E. Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation. *Biochemistry* 1992a Mar 3;31(8):2393-9.

Veldscholte J, Berrevoets CA, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics

and response to antiandrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992b Mar;41(3-8):665-9.

Virkkunen P, Hedberg P, Palvimo JJ, Birr E, Porvari K, Ruokonen M, Taavitsainen P, Janne OA, Vihko P. Structural comparison of human and rat prostate-specific acid phosphatase genes and their promoters: identification of putative androgen response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994 Jul 15;202(1):49-57.

Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, Palotie A, Tammela T, Isola J, Kallioniemi OP. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat. Genet.* 1995 Apr;9(4):401-6.

Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 1996 Jul 15;15(14):3667-75.

Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 1995 Dec 14;378(6558):690-7.

Wagner BL, Norris JD, Knotts TA, Weigel NL, McDonnell DP. The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 1998 Mar;18(3):1369-78.

West NB, Chang CS, Liao SS, Brenner RM. Localization and regulation of estrogen, progestin and androgen receptors in the seminal vesicle of the rhesus monkey. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990 Sep;37(1):11-21.

Wilbert DM, Griffin JE, Wilson JD. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983 Jan;56(1):113-20.

Williams SP, Sigler PB. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 1998 May 28;393(6683):392-6.

Wilmot GR, Warren ST. A new mutational basis for disease. *Genetic Instability and Hereditary Neurological Diseases* 1998;3-12.

Wilson TE, Paulsen RE, Padgett KA, Milbrandt J. Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* 1992 Apr 3;256(5053):107-10.

Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell. Biol.* 1993 Sep;13(9):5794-804.

Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 Feb 15;91(4):1234-8.

Wolffe AP, Pruss D. Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 1996 Mar 22;84(6):817-9.

Wong CI, Zhou ZX, Sar M, Wilson EM. Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH₂-terminal and steroid-binding domains. *J. Biol. Chem.* 1993 Sep 5;268(25):19004-12.

Wooster R, Mangion J, Eeles R, Smith S, Dowsett M, Averill D, Barrett-Lee P, Easton DF, Ponder BA, Stratton MR. A germline mutation in the androgen receptor gene in two brothers with breast cancer and Reifenstein syndrome. *Nat. Genet.* 1992 Oct;2(2):132-4.

Yeh S, Chang C. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996 May 28;93(11):5517-21.

Yeh S, Miyamoto H, Shima H, Chang C. From estrogen to androgen receptor: a new pathway for sex hormones in prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998 May 12;95(10):5527-32.

Yong EL, Chua KL, Yang M, Roy A, Ratnam S. Complete androgen insensitivity due to a splice-site mutation in the androgen receptor gene and genetic screening with single-stranded conformation polymorphism. *Fertil. Steril.* 1994 May;61(5):856-62.

Young IE, Kurian KM, Mackenzie MA, Kunkler IH, Cohen BB, Hooper ML, Wyllie AH, Steel CM. The CAG repeat within the androgen receptor gene in male breast cancer patients. *J. Med. Genet.* 2000 Feb;37(2):139-40.

Zhou ZX, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM. A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J. Biol. Chem.* 1994 May 6;269(18):13115-23.

Zhou ZX, Lane MV, Kemppainen JA, French FS, Wilson EM. Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol. Endocrinol.* 1995a Feb;9(2):208-18.

Zhou ZX, Kempainen JA, Wilson EM. Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. *Mol. Endocrinol.* 1995b May;9(5):605-15.

Zilliacus J, Wright AP, Norinder U, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J. Determinants for DNA-binding site recognition by the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1992 Dec 15;267(35):24941-7.

Zilliacus J, Wright AP, Carlstedt-Duke J, Nilsson L, Gustafsson JA. Modulation of DNA-binding specificity within the nuclear receptor family by substitutions at a single amino acid position. *Proteins* 1995 Jan;21(1):57-67.

Zoppi S, Marcelli M, Deslypere JP, Griffin JE, Wilson JD, McPhaul MJ. Amino acid substitutions in the DNA-binding domain of the human androgen receptor are a frequent cause of receptor-binding positive androgen resistance. *Mol. Endocrinol.* 1992 Mar;6(3):409-15.