

Université de Montréal

**Caractérisation moléculaire des récepteurs impliqués dans la
réponse aux activines chez le bovin**

par

Jean-François Ethier

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biologie moléculaire

Février, 1997

© Jean-François Ethier, 1997



QH
506
U54
1998
V.006

Université de Montréal

Corrélation moléculaire des symptômes typiques dans la
réponse aux activités chez le bovin

par

par

Jean-François Fortin

Département de médecine vétérinaire
Faculté des études supérieures

J'agit en qualité de directeur de la Faculté des études supérieures
en vue de l'admission au doctorat en
Médecine vétérinaire
au programme de doctorat en



Évaluation 1998

Jean-François Fortin

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Caractérisation moléculaire des récepteurs impliqués dans la
réponse aux activines chez le bovin**

présentée par:

Jean-François Ethier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Christian Deschepper (président-rapporteur)

Dr. David W. Silversides (directeur de recherche)

Dr. Jacques G. Lussier (codirecteur de recherche)

Dr. Michel Bouvier (membre du jury)

Dr. Guylain Boissonnault (examineur externe)

Thèse acceptée le: 24.03.1998

SOMMAIRE

Les activines sont des facteurs protéiques associés à la famille du TGF- β . Plusieurs études ont déjà démontré que les activines ont des effets biologiques certains dans le processus de reproduction chez les mammifères. L'intérêt premier des études décrites dans cette thèse était d'élucider les événements intracellulaires impliqués dans la transduction du signal des activines dans les tissus reproducteurs de l'espèce bovine.

Plusieurs études précédentes ont démontré que les activines agissent sur leurs cellules cibles en transmettant leur signal via un complexe de récepteurs transmembranaires. Ceux-ci font partie de la famille des récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase. Les études recueillies dans cette thèse présentent le clonage et le séquençage des ADN complémentaires (ADNc) codant pour trois types de récepteurs aux activines bovins, soit les récepteurs de type I (bActRI), de type II (bActRII) et de type IIB (bActRIIB). Des analyses transcriptionnelles ont démontré que les ARNm codant pour ces récepteurs sont exprimés dans tous les tissus impliqués dans la reproduction chez l'espèce bovine. Ainsi, les trois types de récepteurs peuvent potentiellement entrer dans la composition du complexe de transduction du signal des activines.

Ces études doctorales ont également permis de mettre en évidence certaines isoformes des récepteurs aux activines, suggérant que le signal des activines puisse passer par divers complexes de récepteurs. En effet, l'ARNm du récepteur bActRI peut se présenter sous deux isoformes. Le premier de ces isoformes code pour un récepteur aux activines de type I, bActRI₁, dont la

séquence codant pour l'extrémité N-terminale se retrouve de façon inversée et complémentaire à l'extrémité 5' du second isoforme, bActRI₂.

Deux isoformes de bActRIIB ont également été identifiées. Une courte région riche en prolines, située dans le domaine intracellulaire de bActRIIB, peut être éliminée par épissage alternatif. Cette région alternative représente potentiellement un site de liaison aux domaines protéiques de type SH3. Ceci laissait donc supposer que cette portion de bActRIIB interagirait avec une protéine intracellulaire, probablement impliquée dans le mécanisme de transduction du signal des activines. À cet effet, deux protéines de 69 kDa et de 71 kDa (respectivement ARIP1 et ARIP2 pour "Activin Receptor Interacting Protein") ont été identifiées comme pouvant interagir de façon spécifique avec cette courte séquence riche en prolines de bActRIIB. Ce site potentiel de liaison aux domaines SH3 se retrouve également sur bActRII et est fortement conservé parmi les espèces. Il est donc possible que ARIP1 et ARIP2 soient des protéines de liaison communes aux récepteurs activines de type II et de type IIB. La délétion du site de liaison aux domaines SH3 par épissage alternatif permettrait une modulation précise de l'activité des récepteurs aux activines de type IIB.

Les isoformes de bActRI et de bActRIIB identifiés lors de ces études, contribueraient à changer l'activité du complexe de récepteurs transmettant le signal des activines à l'intérieur de la cellule. Cette diversité de récepteurs pouvant être présentée aux activines, pourrait expliquer la plasticité et les multiples effets biologiques attribués aux activines.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
REMERCIEMENTS.....	xv
DÉDICACE.....	xvii
CHAPITRE 1	1
1.1 INTRODUCTION.....	2
1.2 ORIGINE DU CONCEPT INHIBINE/ACTIVINE	3
1.3 DÉCOUVERTE DES ACTIVINES	4
1.4 STRUCTURE DES INHIBINES ET DES ACTIVINES	6
1.5 LA MÉGAFAMILLE DU TGF- β	7
1.6 PROTÉINES DE LIAISON AUX ACTIVINES	8
1.6.1 Follistatine	8
1.6.2 α 2-macroglobuline	11
1.7 EXPRESSION DES ACTIVINES.....	13
1.8 EFFETS BIOLOGIQUES DES ACTIVINES	14
1.8.1 Hypophyse	16
1.8.2 Apoptose	16
1.8.3 Érythropoïèse.....	17
1.8.4 Embryogenèse	17
1.8.5 Spermatogenèse	19
1.8.6 Folliculogenèse.....	19
1.9 RÉCEPTEURS AUX ACTIVINES	22
1.9.1 Structure moléculaire.....	23
1.9.1.1 Récepteurs aux activines de type II	23
1.9.1.2 Récepteurs aux activines de type I.....	25
1.9.2 Expression des récepteurs aux activines	26
1.9.3 Mécanismes d'action.....	28
1.9.3.1 Hétéromérisation des récepteurs	28
1.9.3.2 Spécificité des complexes de récepteurs	32
1.9.3.3 Mécanisme d'activation	33

1.9.3.4 <i>Transduction du signal</i>	36
1.9.4 Action antagoniste des inhibines.....	37
1.10 MÉDIATEURS INTRACELLULAIRES DU SIGNAL DES ACTIVINES	38
1.10.1 FKBP12	38
1.10.2 p21 ^{RAS} farnesyltransférase α	40
1.10.3 MAD	43
1.10.4 FAST-1	45
CHAPITRE 2	47
2.1 ARTICLE 1: BOVINE ACTIVIN RECEPTOR TYPE II CDNA: CLONING AND TISSUE EXPRESSION	47
CHAPITRE 3	56
3.1 ARTICLE 2: BOVINE ACTIVIN RECEPTOR TYPE IIB MRNA DISPLAYS ALTERNATIVE SPLICING INVOLVING A SEQUENCE HOMOLOGOUS TO SH3 BINDING SITES	56
CHAPITRE 4	100
4.1 ARTICLE 3: IDENTIFICATION OF A NOVEL MRNA VARIANT FOR THE BOVINE ACTIVIN TYPE I RECEPTOR.....	100
CHAPITRE 5	120
DISCUSSION	121
CONCLUSION	137
BIBLIOGRAPHIE	138

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

- Tableau 1. Oligonucleotide primer sequences used for amplification of three overlapping bActRII cDNA clones and for the generation of probes 49
- Tableau 2. Homology comparison between bActR type II and activin type II receptors of other species 52

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1. Représentation schématique de la structure des sous-unités inhibine/activine, ainsi que des modifications post-traductionnelles générant les inhibines et les activines biologiquement actives.5

CHAPITRE 2

Figure 1. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) cloning strategy for bovine activin receptor type II cDNA..... 49

Figure 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the bovine activin receptor type II cDNA..... 51

Figure 3. Hydrophobicity analysis of the deduced amino acid sequence of bovine activin receptor type II 52

Figure 4. Comparison of activin receptor type II amino acid sequences between species (bovine, mouse, rat and human) 53

Figure 5. Northern blot analysis of bovine activin receptor type II mRNA expression..... 54

CHAPITRE 3

- Figure 1. Schematic representation of the bovine activin type IIB receptor cDNA along with the cloning strategy used in this work..... 90
- Figure 2. Consensus bActRIIB cDNA and its derived amion acid sequence. 91
- Figure 3. Northern analysis of bActRIIB mRNA expression. 92
- Figure 4. Details of the alternative splicing event generating bActRIIB isoforms with or without a juxtamembrane proline rich sequence. 93
- Figure 5A). Structural relationship between the first intracytoplasmic region of the bActRIIB gene, bActRIIB genomic clone H-4 and riboprobes used in the RNase protection assay. 94
- Figure 5B). RNase protection mapping of bActRIIB mRNA showing splicing of the intracellular proline-rich coding sequence. 95
- Figure 6. Positioning of three minimal SH3 binding site consensus sequence in the putative bActRIIB SH3 binding site..... 96
- Figure 7. Aligement of the bActRIIB putative SH3 binding site with the corresponding regions of activin type IIB receptors from different species. 97

Figure 8. Binding of intracellular proteins to the small alternative proline-rich region of bActRIIB. 98

Figure 9. Schematic representation of possible alternatively spliced ActRIIB isoforms. 99

CHAPITRE 4

Figure 1. Consensus bActRI₁ cDNA sequence and its deduced amino acid sequence. 115

Figure 2. Northern analysis of bActRI mRNA expression in bovine female tissues involved in reproduction. 116

Figure 3. Northern analysis of developmental expression of bActRI mRNA in bovine testicles. 117

Figure 4. Details of the 5'end sequence of bActRI₁ and bActRI₂ cDNA isoforms. 118

Figure 5. RT-PCR analysis of bActRI isoform expression. 119

CHAPITRE 5

- Figure 1. Modèle d'épissage alternatif suggéré pouvant générer les isoformes bActRI₁ et bActRI₂..... 125
- Figure 2. Représentation schématique d'un modèle expliquant le mécanisme d'action des récepteurs aux activines..... 132

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α 2-M	α 2-macroglobuline
ACTH	Adrenocorticotroph hormone (corticotropine)
ActRI	Activin type I receptor
ActRIB	Activin type IB receptor
ActRII	Activin type II receptor
ActRIIB	Activin type IIB receptor
ALK	Activine-receptor-like kinase
ARE	Activin-response element (élément de réponse aux activines)
ARIP1	Activin receptor interacting protein 1
ARIP2	Activin receptor interacting protein 2
ARNm	ARN messenger
BMP	Bone morphogenetic protein (protéines de la morphogénèse osseuse)
c ⁷ dGTP	7-deaza-2'deoxyguanosine
CHO	Chinese Hamster ovary cell line (lignée cellulaire ovarienne de hamster chinois)
C-terminal	Carboxy-terminal
DAF-4	récepteur aux BMP de type II de <i>Caenorhabditis elegans</i>
EDF	Erythroid differentiation factor (facteur de différenciation des érythrocytes)
FAST-1	Forkhead activin signal transducer-1
FKBP12	FK506/rapamycin binding protein (protéine de liaison à FK506/rapamycine)
FT α (ou FNTA)	Sous-unité α de la farnesyltransférase

FSH	Follicle-stimulating hormone (hormone folliculo-stimulante)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase
GDF	Growth/differentiation factor (facteur de croissance/différenciation)
GDNF	Glial-derived neurotrophic growth factor
GH	Growth hormone (hormone de croissance)
GnRH	Gonadotrophin-releasing hormone
GST	Glutathione S-transférase
hCG	Human chorionic gonadotrophin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LDL	Low density lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)
LH	Luteinizing hormone (hormone lutéinisante)
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein (récepteur à l' α 2-macroglobuline)
MAD	Mothers against decapentaplegic
MIS	Müllerian-inhibiting substance (hormone anti-müllérienne)
Mv1Lu	Lignée cellulaire d'épithélium pulmonaire de vison
nt	Nucléotide
N-terminal	Amino-terminal
PCR	Polymerase chain reaction
5'RACE	Rapid amplification of 5'cDNA ends
R-IB	Clone cellulaire dérivé de Mv1Lu résistant à TGF- β et aux
	activines
RNase	Ribonucléase

RPA	RNase protection assay
SH3	Src homology 3
T β RI	Récepteur de type I du TGF- β
T β RII	Récepteur de type II du TGF- β
TGF- β	Transforming growth factor- β
TRIP	TGF- β -receptor interacting protein-1
TSR1	TGF- β superfamily receptor type 1

REMERCIEMENTS

L'opportunité m'est donnée de remercier chaleureusement le docteur David W. Silversides qui, en tant que directeur de recherche, fut prodigue tant de son temps précieux que de ses judicieux conseils. Débordant d'un optimisme contagieux, il fut d'une aide inestimable à la réalisation de ce projet de recherche. Je tiens également à remercier le docteur Silversides pour ses recommandations et son vif intérêt quant à mes choix de carrière.

Toujours prêt à discuter et à s'offrir en aide, mon codirecteur, le docteur Jacques G. Lussier, a été une personne ressource indispensable que je tiens à remercier sincèrement.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire de première heure, Isabelle Daneau, Mame Nahé Diouf, Chantal Brisson et Nicolas Pilon, qui entretenaient une atmosphère amicale propice aux échanges scientifiques.

Il me serait bien sûr impardonnable d'oublier de remercier monsieur Serge Harpin du département de virologie, camarade de longue date, qui m'a rendu de fiers services.

Mes remerciements vont également à tous les membres du centre de recherche en reproduction animale (CRRA), qui firent de mon séjour parmi eux une période aussi agréable que mémorable.

Les études doctorales se caractérisant normalement par un engloutissement énorme de temps et de travail, je suis pleinement

reconnaissant de la compréhension et de la patience de ma femme, Karine Fayad. Sa présence à mes côtés et ses mots d'encouragement ont été des plus salutaires. Par la même occasion, j'aimerais remercier les membres de ma famille qui ont toujours été présents et disponibles malgré, parfois, mon indisponibilité.

Enfin, je tiens à remercier l'Université de Montréal et le fonds FCAR pour leur support financier.

DÉDICACE

Aux deux personnes merveilleuses que sont mes grand-mères,
sources inépuisables d'inspiration.

«Un scientifique qui n'est pas
philosophe est un bricoleur dangereux»

Albert Jacquard

CHAPITRE 1

1.1 INTRODUCTION

Le phénomène de la reproduction chez les mammifères est possible grâce à l'interaction de plusieurs facteurs oeuvrant dans l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade. Bien que ce système soit basé principalement sur l'action des hormones gonadotropes hypophysaires, nommément l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), plusieurs autres facteurs importants ont subséquemment été identifiés comme pouvant avoir un rôle dans le développement et le maintien du processus de reproduction. Parmi ces facteurs, il importe de mentionner deux types de facteurs protéiques: les inhibines et les activines.

Outre leurs actions biologiques observées sur les tissus impliqués dans la reproduction, les inhibines et les activines peuvent également induire une panoplie de réponses chez plusieurs autres types cellulaires. Étant donné cette variété de réponses, il devient intéressant d'étudier et de comprendre les mécanismes de transduction du signal spécifiques aux processus de reproduction. Jusqu'à tout récemment, peu de choses étaient connues sur ce mécanisme de signalisation intracellulaire. C'est le clonage et l'identification des récepteurs aux activines qui a permis d'ouvrir la porte à la caractérisation de la voie de signalisation des activines. Les études doctorales présentées dans cette thèse ont justement pour objet de définir davantage le mécanisme d'action des récepteurs aux activines. Les connaissances actuelles à ce sujet proviennent principalement d'études utilisant des modèles humains, de souris de rat ou de *Xenopus laevis*. Malheureusement, très peu d'études portant sur la voie de signalisation des activines ont été entreprises chez l'espèce bovine. Pourtant, cette espèce est largement utilisée lorsqu'il s'agit d'étudier le rôle

des activines et des inhibines dans les processus de reproduction. Puisqu'il est probable que la réponse aux activines puisse varier d'une espèce à l'autre, il importe donc d'étudier également les mécanismes de signalisation des activines chez le bovin. Ainsi, le but de ces études doctorales était de combler cette lacune en clonant premièrement les ADN complémentaires (ADNc) codant pour les récepteurs aux activines bovines afin d'entreprendre des études sur leur mode de signalisation.

Dans les sections qui suivent, il sera discuté principalement des rôles potentiels attribués aux activines, ainsi que des modèles tentant d'expliquer la voie de signalisation empruntée par les activines, le tout en intégrant les données bibliographiques disponibles et les présents travaux.

1.2 ORIGINE DU CONCEPT INHIBINE/ACTIVINE

L'histoire de la découverte des activines est intimement liée à celle des inhibines. Cette recherche prend racine dans les années 1930, lorsque McCullagh [1932] a démontré qu'il existait une activité hydrosoluble, extraite de testicules bovins, capable d'inhiber l'hypertrophie des cellules hypophysaires survenant après castration chez le rat. C'est donc en référence à cette activité inhibitrice que cette substance de nature non-stéroïdienne fut nommée inhibine. Le concept de l'inhibine fut révisé à la suite de la découverte identifiant les hormones folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH) comme deux hormones hypophysaires bien distinctes. L'inhibine fut alors définie comme étant une substance d'origine gonadique diminuant spécifiquement la relâche de la FSH hypophysaire. Cependant, il a fallu attendre plus de 50 ans avant d'obtenir la première purification de l'inhibine.

Ce n'est donc qu'en 1985 que la recherche sur l'inhibine prit véritablement son envol, lorsque quatre groupes indépendants parvinrent à isoler l'inhibine du fluide folliculaire ovarien bovin [Robertson *et al.*, 1985] et porcin [Ling *et al.*, 1985; Rivier *et al.*, 1985; Miyamoto *et al.*, 1985]. À ce sujet, il est anecdotique de rappeler que la plupart des premières tentatives infructueuses de purification utilisaient à tort des échantillons dérivés des testicules comme sources potentielles d'inhibine. Ce choix était dicté par le fait que l'activité de l'inhibine avait été initialement découverte dans des extraits testiculaires. Il s'est avéré par la suite que les testicules, contrairement au fluide folliculaire ovarien, étaient une source plutôt pauvre en inhibines, expliquant ainsi bien des échecs de purification.

La caractérisation des inhibines a permis de démontrer qu'elles sont des protéines hétérodimériques de 32 kDa, formées d'une sous-unité α reliée par un pont disulfure à une des deux sous-unités β (β_A et β_B) existantes, formant ainsi l'inhibine A et l'inhibine B respectivement (Fig.1).

1.3 DÉCOUVERTE DES ACTIVINES

Lors de la purification des inhibines, deux groupes ont remarqué que certaines fractions adjacentes avaient des propriétés stimulantes sur la relâche de FSH par des cellules d'hypophyse antérieure en culture [Ling *et al.*, 1986; Vale *et al.*, 1986]. Cette substance, qui avait donc un effet biologique antagoniste à celui des inhibines, a ainsi reçu le nom d'activine. Étonnamment, cette nouvelle substance de 28 kDa était en fait un dimère formé de sous-unités β , soit les mêmes sous-unités β qui entraient dans la composition des inhibines. Ainsi, grâce à différentes combinaisons de sous-

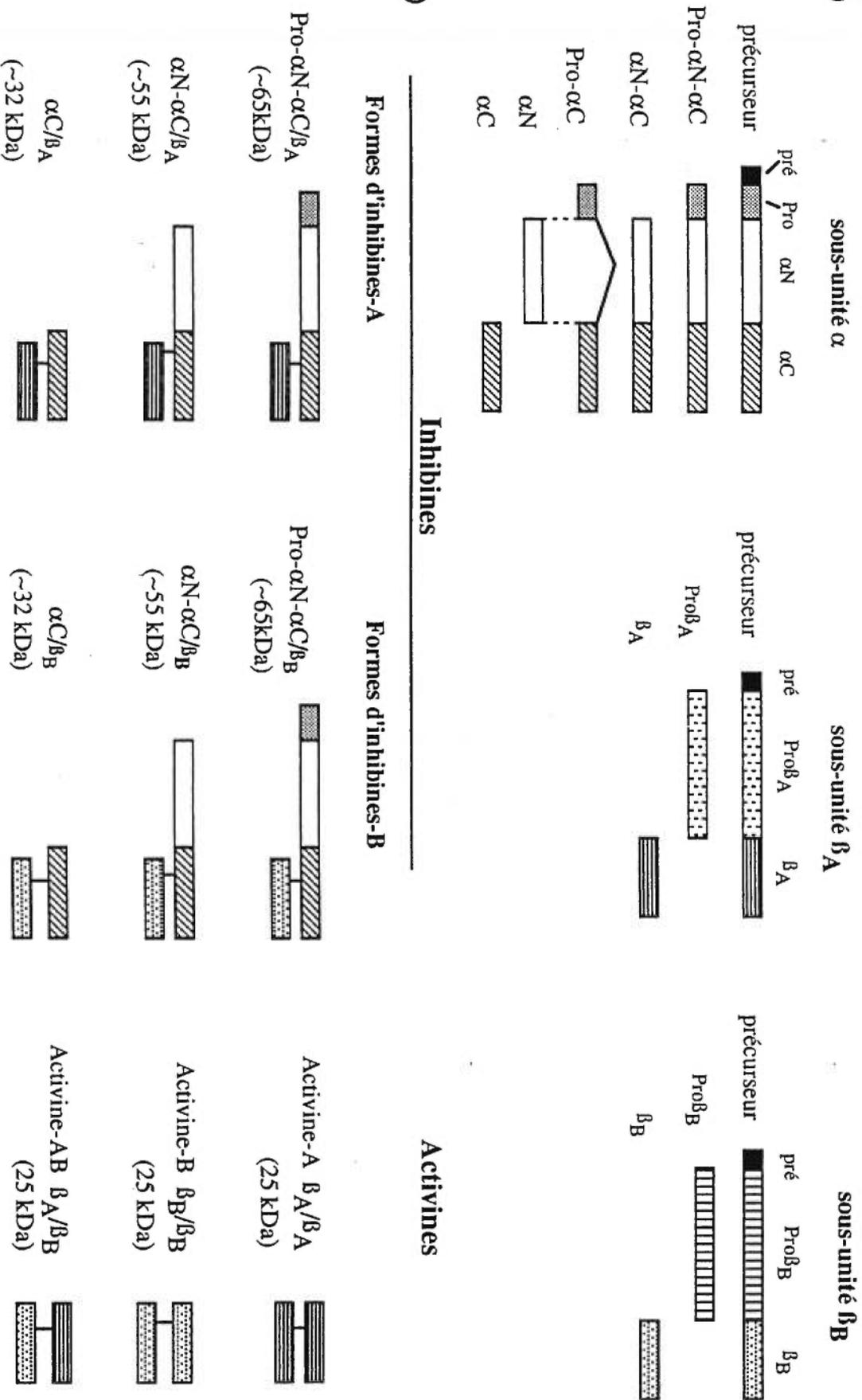


Fig.1 Représentation schématique de la structure des sous-unités inhibine/activine, ainsi que des modifications post-traductionnelles générant les inhibines et les activines biologiquement actives. A) L'ARNm des sous-unités α , β_A , β_B sont traduits en précurseurs protéiques qui sont ultérieurement clivés, afin de générer différents produits. B) Les inhibines sont formées par l'association d'une sous-unité β mature (β_A ou β_B) à l'un des produits dérivés de la sous-unité α , à l'aide d'un pont disulfure. Pour chaque type d'inhibines, trois formes de tailles différentes sont

unités β , il peut exister trois formes d'activines: activine-A, activine-B et activine-AB (Fig.1). De plus, d'autres formes potentielles d'activines ou d'inhibines seraient possibles, car trois autres ADNc de sous-unités β , nommément ceux de la sous-unités β_C [Hötten *et al.*, 1995] de la sous-unité β_D [Oda *et al.*, 1995] et de la sous-unité β_E [Fang *et al.*, 1996] ont récemment été clonés. Par contre, il n'est pas encore certain que ces sous-unités forment réellement des dimères. De plus, aucune activité biologique n'a encore été attribuée à ces activines/inhibines potentielles.

1.4 STRUCTURE DES INHIBINES ET DES ACTIVINES

L'ARNm de la sous-unité α est initialement traduit en un précurseur protéique immature (Fig.1). Ce précurseur est débuté à l'extrémité N-terminal par un peptide signal (pré) qui dirige la sous-unité immature vers la voie sécrétoire. Trois régions, séparées par des sites de clivage, complètent la sous-unité immature α : la région Pro, la région αN et la région αC [Mather *et al.*, 1992]. Chez l'espèce humaine, la région αC possède deux sites de glycosylation potentiels, tandis que chez les autres espèces, dont le bovin, un seul site de glycosylation y est présent [Vale *et al.*, 1990]. Selon le clivage subit par la sous-unité α immature, plusieurs produits peuvent être sécrétés. La région αC est considérée classiquement comme étant la sous-unité α mature qui forme, par association avec une des sous-unités β , les inhibines A et B actives. Toutefois, il a été suggéré dernièrement que des sous-unités α , contenant les régions Pro et αN , puissent également former des inhibines biologiquement actives [Mason *et al.*, 1996]. Ceci explique les multiples

formes d'inhibines de tailles moléculaires différentes pouvant être isolées [Mather *et al.*, 1992; Sugino *et al.*, 1992].

Les sous-unités β_A et β_B sont également produites initialement sous forme de pré-pro-peptides. Les sous-unités β matures sont également libérées par clivage protéolytique, afin de former les inhibines ou les activines (Fig.1). La séquence du pro-peptide β , c'est-à-dire la séquence médiane, serait nécessaire à la formation des ponts disulfures et à l'adoption de la conformation active, ainsi qu'à la sécrétion de dimères matures [Gray et Mason, 1990]. Cependant, contrairement à la sous-unité α , la région du pro-peptide β ($\text{Pro}\beta_A$ ou $\text{Pro}\beta_B$) doit être éliminée, afin de générer des activines biologiquement actives [Mason *et al.*, 1996].

1.5 LA MÉGAFAMILLE DU TGF- β

Suite au clonage des ADNc codant pour les sous-unités inhibine/activine, les activines et les inhibines ont été classées dans la mégafamille du "transforming growth factor- β " (TGF- β); leurs séquences et leur organisation structurale étant similaires à celles du prototype de cette famille, soit le TGF- β [Mason *et al.*, 1985; Forage *et al.*, 1986; Woodruff *et al.*, 1987]. Des facteurs, provenant d'organismes aussi divers que *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* et l'humain, s'ajoutent régulièrement à cette famille de facteurs de croissance et de différenciation qui compte actuellement plus de 30 membres. Parmi les facteurs d'origine mammifère, outre les activines et les inhibines, cette famille regroupe les TGF- β , les protéines de la morphogenèse osseuse (BMP), l'hormone anti-müllérienne

(MIS), les facteurs de différenciation et de croissance (GDF), le "glial-derived neurotrophic growth factor" (GDNF) et le facteur nodal [Kingsley, 1994].

1.6 PROTÉINES DE LIAISON AUX ACTIVINES

1.6.1 FOLLISTATINE

Certaines protéines sériques ont la capacité de lier les activines et les inhibines. C'est lors d'une tentative de purification des récepteurs aux activines, que la follistatine a été identifiée comme étant une protéine de liaison aux activines [Nakamura *et al.*, 1990]. La follistatine était alors déjà connue pour ses propriétés inhibitrices sur la relâche de FSH, avec cependant une efficacité réduite de 70 à 90 % par rapport à celle des inhibines [revu par Michel *et al.*, 1993]. Cependant, contrairement aux inhibines et aux activines, la follistatine n'est pas apparentée à la mégafamille du TGF- β . C'est une protéine monomérique qui peut se présenter sous différents poids moléculaires, grâce à un épissage alternatif de son ARNm et à une glycosylation variable de la protéine [Michel *et al.*, 1993]. Ainsi, six isoformes de la follistatine ayant des poids moléculaires différents furent isolés du fluide folliculaire porcin. Ces isoformes dérivent de deux squelettes protéiques de 315 acides aminés (FS-315) et de 288 acides aminés (FS-288) [Michel *et al.*, 1993], le dernier isoforme ayant subi une délétion de la région C-terminale par épissage alternatif de son ARNm.

Selon les études de Shimonaka *et al.* [1991], deux molécules de follistatine pourraient lier une molécule d'activine, tandis qu'une seule molécule de follistatine pourrait se lier à l'inhibine. Ceci laisse donc supposer

que la follistatine se lie aux sous-unités β et non à la sous-unité α . Toutefois, la stoechiométrie de la liaison n'est pas encore parfaitement résolue. D'ailleurs, un complexe activine-follistatine de très haut poids moléculaire a déjà été observé et qui semblait être un complexe tétramérique composé de deux molécules d'activines liées à deux molécules de follistatines [Michel *et al.*, 1993].

La distribution tissulaire de l'expression de l'ARNm de la follistatine est presque identique à celle des sous-unités inhibine/activine β [Houde *et al.*, 1994; Michel *et al.*, 1990]. On retrouve de faibles quantités d'ARNm de follistatine et de sous-unités β dans les testicules, l'hypophyse, les surrénales et la rate. Par contre, l'ovaire contient une grande quantité d'ARNm de follistatine et de sous-unités β , tandis que le foie n'exprime aucune de ces molécules.

Cette corrélation qui existe dans la localisation de l'expression des ARNm des sous-unités β et de la follistatine appuie l'hypothèse voulant que la follistatine soit un régulateur paracrinien/autocrinien des activines [Michel *et al.*, 1993]. Ainsi, certains chercheurs pensent que la follistatine, grâce à ses propriétés de liaison, contrôlerait la disponibilité des activines et neutraliserait ainsi leur bioactivité. Cependant, la follistatine ne contrecarre pas toutes les activités des activines. Par exemple, le groupe de Mather a démontré que la follistatine n'avait aucun effet inhibiteur sur la synthèse d'ADN stimulée par l'activine dans des co-cultures de cellules de Sertoli et de cellules germinales testiculaires [Mather *et al.*, 1993].

Les travaux de Nakamura *et al.* [1991] ont démontré que la follistatine possède une forte affinité pour les chaînes d'héparane sulfate de la surface des cellules de la granulosa. Par ailleurs, les travaux de Sugino *et al.* [1993] ont dévoilé que la forme tronquée de la follistatine (FS-288) est la principale responsable de cette liaison. Ces résultats suggèrent donc que la follistatine pourrait se lier à la surface des cellules de la granulosa grâce à des protéoglycanes ayant des embranchements de chaînes d'héparane sulfate. Malheureusement, ce type de protéoglycanes accepteurs de follistatine n'est toujours pas identifié à ce jour. Néanmoins, certains groupes de recherche ont proposé que la follistatine, liée à la surface cellulaire, puisse servir à créer une réserve d'activines en immobilisant ces dernières dans la matrice extracellulaire [Jenkin *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1991]. Des études récentes ont effectivement démontré que la forme FS-288 liait l'activine-A à la surface des cellules K562, sans toutefois être en mesure de présenter l'activine à ses récepteurs [de Winter *et al.*, 1996a]. Les activines ainsi séquestrées pourraient néanmoins être transférées aux récepteurs aux activines au moment opportun, afin de transmettre leur signal. Ce mécanisme proposé, qui permettrait de réguler la disponibilité des activines, est non sans rappeler le récepteur de type III des TGF- β (ou bêtaglycan). De fait, ce récepteur du TGF- β de type III est un protéoglycane ancré dans la membrane cellulaire qui présente les TGF- β aux récepteurs du TGF- β de type I et de type II [Wang *et al.*, 1991; López-Casillas *et al.*, 1993].

Suite aux résultats provenant de diverses expériences *in vitro*, la follistatine fut présentée à l'origine comme un antagoniste des activines [Michel *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1990]. Cependant, les résultats provenant des travaux effectués sur des souris transgéniques, dont le gène de

la follistatine a été invalidé par recombinaison homologue, viennent contredire cette hypothèse. Étonnamment, les souris déficientes en follistatine montraient d'étranges similarités phénotypiques avec les souris déficientes en activines [Matzuk, 1995]. Donc, *in vivo*, la follistatine semble plutôt jouer un rôle d'agoniste dans la transmission du signal des activines. En outre, les souris déficientes en follistatine avaient des anomalies supplémentaires qui n'étaient pas présentes chez les souris déficientes en activines, suggérant que la follistatine soit impliquée dans la signalisation de certains autres membres de la mégafamille des TGF- β [Matzuk *et al.*, 1995a]. D'autre part, il est également possible que la follistatine possède sa propre voie de signalisation, donnant lieu à des activités intrinsèques, qui n'auraient pas encore été observées à l'aide des études *in vitro* [Matzuk *et al.*, 1995a].

1.6.2 α 2-MACROGLOBULINE

Les activines, de même que les inhibines, possèdent une affinité pour une seconde protéine retrouvée dans le sérum, l' α 2-macroglobuline (α 2-M) [Krummen *et al.*, 1993; Vaughan et Vale., 1993]. Cette molécule volumineuse, avec ses 725 kDa, est un inhibiteur de protéase à large spectre qui se retrouve en quantité abondante (2-4 mg/ml) dans le sérum [Travis et Salvensen, 1983; James, 1990]. L' α 2-M a déjà été décrite comme pouvant se complexer à une grande variété de cytokines et de facteurs de croissance, dont les facteurs TGF- β ₁ et TGF- β ₂ [Feige *et al.*, 1996a].

Le foie est la principale source d' α 2-M sérique, mais cette molécule peut également être synthétisée et sécrétée localement par divers types cellulaires. C'est le cas entre autres des gonades dans lesquelles l' α 2-M, tout

comme la follistatine [Shukovski *et al.*, 1992; Mercado *et al.*, 1993], est produite de façon hormono-dépendante [Gaddy-Kurten *et al.*, 1989]. Comme en témoigne l'étude du profil d'association, les complexes activine/follistatine et activine/ α 2M se produisent très rapidement *in vivo* [Woodruff *et al.*, 1993a]. Cependant, les caractéristiques de liaison de ces deux types de complexes semblent être différentes puisque l' α 2-M possède une liaison de faible affinité, mais de grande capacité, tandis que la follistatine montre une forte affinité, mais une faible capacité de liaison aux activines [Krummen *et al.*, 1993].

De plus, contrairement au complexe formé avec la follistatine, la formation d'un complexe avec l' α 2-M ne semble pas affecter l'activité biologique des activines [Mather *et al.*, 1993; Krummen *et al.*, 1993]. En fait, le rôle précis de la liaison de l' α 2-M aux activines demeure encore inconnu. Par contre, des études effectuées sur d'autres types de cytokines suggèrent que l' α 2-M puisse stimuler ou inhiber leurs activités, les protéger de la protéolyse, affecter leur biodisponibilité, diriger leurs actions vers des tissus spécifiques ou servir à leur évacuation de la circulation sanguine [James, 1990]. De plus, plusieurs groupes ont étudié certaines formes latentes plasmatiques du TGF- β qui s'avèrent être en fait des complexes α 2-M/TGF- β [revu par Feige *et al.*, 1996b].

L' α 2-M, comme mentionné précédemment, est un inhibiteur de protéase, dont la conformation est modifiée par liaison covalente de protéases (transconformation). Le récepteur de l' α 2-M, le "low-density lipoprotein receptor-related protein" (LRP), est un homologue du récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL). Le LRP, qui se présente comme un

récepteur multifonctionnel, est présent dans la plupart des types cellulaires [Feige *et al.*, 1996b]. L' α 2-M ne peut lier son récepteur LRP que sous sa forme transconformée [Bu et Schwartz, 1994]. Les TGF- β forment préférentiellement des complexes réversibles avec l' α 2-M native, plutôt que des complexes irréversibles avec l' α 2-M transconformée [Crookston *et al.*, 1994]. Ainsi, la formation de complexes α 2-M native/TGF- β serait un moyen de véhiculer le TGF- β ou de contrôler sa biodisponibilité de façon réversible. D'autre part, le TGF- β qui se lie à une molécule d' α 2-M transconformée serait éventuellement internalisé par endocytose, grâce à la liaison du complexe au récepteur LRP [Feige *et al.*, 1996b]. Les prochaines études devront tenter de vérifier si un mécanisme analogue est utilisé dans le contrôle de la biodisponibilité des activines.

1.7 EXPRESSION DES ACTIVINES

Depuis la découverte des inhibines et des activines, l'expression de leurs gènes a été démontrée dans plusieurs tissus, tant gonadiques qu'extragonadiques. Chez le rat, le groupe de Meunier *et al.* [1988] a détecté l'ARNm de la sous-unité inhibine α dans les ovaires, les testicules, le placenta, l'hypophyse, les glandes surrénales, la rate, les reins, le cerveau et la moelle épinière. Toujours selon la même étude, les niveaux d'expression de l'ARNm des sous-unités β sont généralement plus faibles que ceux de la sous-unité α . On retrouve l'ARNm de la sous-unité β_A dans les ovaires, les testicules, le placenta, la moelle osseuse, la rate, le cerveau et la moelle épinière, tandis que l'ARNm de la sous-unité β_B ne semble être présent que dans les ovaires, les testicules, le placenta, l'hypophyse et le cerveau. Cependant, ces études ne

pouvaient affirmer la présence réelle d'activines dans ces tissus, puisque les sous-unités β ont également le potentiel de rentrer dans la composition des inhibines en présence de la sous-unité α . Fort heureusement, une étude récente chez l'humain vient confirmer la présence de la protéine activine-A dans plusieurs de ces tissus puisqu'elle a été localisée par immunohistochimie dans les testicules (cellules de Sertoli et de Leydig), les ovaires (cellules de la granulosa de follicules matures et de corps jaunes seulement), l'hypophyse, le pancréas, la thyroïde, les glandes surrénales et le cerveau [Wada *et al.*, 1996]. De plus, un suivi de l'expression des sous-unités α , β_A et β_B dans les follicules ovariens, lors du cycle menstruel chez la femme, a permis de constater que leur expression était régulée selon le développement folliculaire [Roberts *et al.*, 1993].

1.8 EFFETS BIOLOGIQUES DES ACTIVINES

Tout d'abord, il est important de signaler que l'activine-A est la forme la plus souvent purifiée et que c'est également la seule forme d'activine recombinante produite en quantité suffisante pour effectuer des tests biologiques. Il convient donc d'informer le lecteur que les actions biologiques des activines rapportées jusqu'à maintenant doivent être attribuées plus spécifiquement à l'activine-A. Il est malheureusement difficile de spéculer sur l'activité relative des trois formes d'activines, car les données disponibles à ce sujet sont quelque peu contradictoires. Les travaux de Nakamura *et al.* [1992a] suggèrent que l'activine-B purifiée du fluide folliculaire soit moins active que les formes A et AB, tandis que les activines-A et B recombinantes, produites par le groupe de Mason *et al.* [1989], exhibaient la même efficacité à relâcher la FSH de cellules hypophysaires en culture et à induire

l'accumulation d'hémoglobine dans les cellules K562. Ces différences peuvent s'expliquer par le degré de purification des échantillons d'activines utilisés. En effet, il semble difficile d'obtenir des préparations d'activines exemptes de contaminants; ces derniers pouvant avoir des effets négatifs sur l'activité des activines.

Lorsque l'on examine les activités biologiques des activines et des inhibines, il est étonnant de constater l'antagonisme fonctionnel qui existe entre ces facteurs, malgré leur similitude structurale due au partage des mêmes sous-unités β . Comme mentionné précédemment, les activines ont été découvertes grâce à leur réponse antagoniste à celle des inhibines face à la relâche de FSH hypophysaire. En fait, plusieurs des réponses aux activines sont contrées par les inhibines. Par contre, il faut indiquer que certaines cellules sensibles aux activines n'ont pas d'action adverses de la part des inhibines. Cependant, le contraire est inexact, puisque les inhibines n'ont pas d'effets biologiques connus contre lesquels les activines ne seraient pas antagonistes [Mathews, 1994].

Vu la quantité appréciable d'actions biologiques attribuées aux activines, tant dans les tissus reproducteurs que non-reproducteurs, et sachant que les activines ont été successivement étiquetées d'hormones à action paracrinienne ou autocrinienne, de facteurs de croissance et de cytokines, Woodruff et Mather [1995] ont proposé de définir les activines comme étant des agents "multicriniens". L'objectif de cette introduction n'est pas de décrire exhaustivement toutes les actions biologiques des activines, mais plutôt d'apporter suffisamment d'information pour que le lecteur puisse visualiser l'hétérogénéité des réponses générées par les activines.

1.8.1 HYPOPHYSE

Plusieurs évidences indiquent maintenant que les activines sont des modulateurs locaux des fonctions hypophysaires. Outre leur effet stimulateur sur la production de FSH par les gonadotropes, il a été démontré que les activines, du moins la forme A, peuvent également agir sur les autres types cellulaires de l'hypophyse. Par exemple, lors d'essais *in vitro*, l'addition d'activine-A inhibe la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) et de la corticotropine (ACTH) [Bilezikjian et Vale, 1992].

1.8.2 APOPTOSE

Depuis quelques années, certains groupes considèrent l'activine-A comme un agent apoptotique spécifique à certains types cellulaires. Il a été démontré que l'administration continue d'activine-A à des rats et à des souris, causait une réduction de la masse du foie, qui était associée à une quantité considérable d'hépatocytes en état d'apoptose [Schwall *et al.*, 1993; Hully *et al.*, 1994]. Cette action apoptotique des activines a en outre été confirmée *in vitro* à l'aide d'hépatocytes en culture. L'activine-A peut également induire l'apoptose chez certaines lignées cellulaires d'hybridomes et de myélomes [Nishihara *et al.*, 1993]. Il est également intéressant d'indiquer que la follistatine est en mesure d'empêcher spécifiquement l'activine-A de causer l'apoptose dans tous ces types cellulaires [Schwall *et al.*, 1993; Nishihara *et al.*, 1993]. De plus, les travaux de Koseki *et al.* [1995] ont également montré que la surexpression de BCL-2, qui est un proto-oncogène connu pour ses

qualités de répression de l'apoptose, pouvait prévenir l'effet cytotoxique de l'activine-A.

1.8.3 ÉRYTHROPOÏÈSE

C'est en 1988 que le groupe de Murata *et al.* [1988] découvrit que le facteur de différenciation des érythrocytes (EDF) était en fait l'équivalent de l'activine-A. Bilezikjian et Vale [1992] ainsi que DePaolo *et al.* [1991] ont passé en revue les effets de l'activine-A sur l'érythropoïèse. Mentionnons tout de même que l'activine-A provoque la différenciation des lignées cellulaires érythroleucémiques humaines K562 et HEL [Bilezikjian et Vale, 1992]. De plus, l'administration d'activine-A à des rates ayant subi une ovariectomie et traitées à l'oestrogène, cause une augmentation relativement rapide de la concentration d'érythrocytes et de l'hémoglobine dans la circulation [Schwall *et al.*, 1989]. La présence potentielle de récepteurs aux activines à la surface cellulaire d'une lignée cellulaire érythroleucémique [Hino *et al.*, 1989], la détection de l'ARNm de la sous-unité β_A dans la moelle osseuse [Meunier *et al.*, 1988], ainsi que la sécrétion du dimère activine-A par une lignée cellulaire leucémique [Murata *et al.*, 1988] sont des observations qui soutiennent l'hypothèse voulant que les activines aient un rôle déterminant dans l'érythropoïèse.

1.8.4 EMBRYOGENÈSE

Plusieurs études sur *Xenopus laevis* permettaient de croire que les activines étaient des facteurs importants du développement des vertébrés, plus spécifiquement lors de l'induction du mésoderme, laquelle est considérée

comme une des étapes initiales de l'embryogenèse [Thomsen *et al.*, 1990; Kondo *et al.*, 1991; Hemmati-Brivanlou et Melton, 1992]. De plus, la confirmation de la présence des activines dans les embryons de souris renforçait l'idée voulant que les activines soient des facteurs inducteurs du mésoderme chez les mammifères [Albano *et al.*, 1993]. Cependant, on doit maintenant s'interroger sur ce rôle potentiel des activines chez les vertébrés supérieurs, puisque la génération de souris ayant une déficience en sous-unité β_A [Matzuk *et al.*, 1995b], ou en sous-unité β_B [Vassalli *et al.*, 1994], de même que pour les deux sous-unités simultanément [Matzuk *et al.*, 1995b], démontrent clairement que les activines ne sont pas essentielles à la formation du mésoderme lors de l'embryogenèse. En effet, ces souris mutantes étaient viables jusqu'au moment de la parturition et ne montraient aucune anomalie apparente dans la formation du mésoderme. Les activines auraient tout de même un rôle à jouer dans l'embryogenèse, mais plutôt lors du développement tardif de l'embryon. D'ailleurs, la déficience en sous-unité β_B entraînait un développement anormal des paupières des souris, tandis que le manque de sous-unité β_A provoquait des anomalies cranofaciales importantes.

Il existe, à ce jour, peu de données sur l'implication des inhibines/activines dans le développement des ruminants. Il a toutefois été démontré que l'inhibine est présente dans les testicules foetaux bovins et ce, en concentration croissante lors de la gestation, pour atteindre un maximum entre le 210^e jour et la parturition [Torney *et al.*, 1990; Torney *et al.*, 1992]. L'inhibine a également été retrouvée dans l'ovaire foetal bovin, mais en concentrations plus faibles que dans les testicules. La seule étude disponible discutant du rôle des activines dans l'embryogenèse des ruminants démontre

que l'activine-A est détectée dans le liquide amniotique ovin en concentrations beaucoup plus importantes que la follistatine [de Kretser *et al.*, 1994].

1.8.5 SPERMATOGENÈSE

Bien qu'à l'origine on ait associé les inhibines testiculaires à une interaction endocrine sur l'hypophyse, l'hypothèse actuelle généralement acceptée propose que les inhibines aient un rôle paracrinien et/ou autocrinien sur le contrôle des fonctions testiculaires [Mather *et al.*, 1992]. De même, les activines auraient un rôle à jouer dans les testicules, mais il serait plutôt local. Il a été démontré que l'activine-A était un stimulateur [Mather *et al.*, 1990] de la prolifération des spermatogonies, tandis que les inhibines agissaient comme des inhibiteurs [van Dissel Emiliani *et al.*, 1989].

1.8.6 FOLLICULOGENÈSE

La quête de facteurs contrôlant le développement et la différenciation des follicules ovariens a permis de remarquer que les activines pouvaient être d'importants régulateurs intraovariens. Il faut par contre être vigilant dans l'interprétation des résultats obtenus par différents groupes de recherche, car les conclusions qui en sont tirées sont souvent contradictoires. Par exemple, les études *in vivo* de Woodruff *et al.* [Woodruff *et al.*, 1990; Woodruff et Mather, 1995] démontrèrent que l'activine-A cause l'atrésie folliculaire lorsque administrée en injection intraovarienne, tandis que les études *in vitro* de plusieurs groupes, dont celle de Xiao *et al.* [1992], suggèrent plutôt que l'activine-A favorise la folliculogenèse. Il est toutefois possible que, selon Xiao *et al.* [1992], cette divergence d'action puisse être due aux doses

d'activines utilisées. En effet, les études *in vivo* utilisaient des concentrations d'activines 500 fois plus élevées que celles des études *in vitro*. Ces doses élevées d'activines ne correspondraient pas aux conditions physiologiques ovariennes.

Néanmoins, malgré certains résultats contradictoires, il est maintenant admis que l'activine-A peut moduler plusieurs fonctions ovariennes. Une des étapes critiques de la folliculogenèse semble être l'acquisition d'une sensibilité à la FSH par les follicules. À cet effet, plusieurs travaux témoignent de l'action de l'activine-A sur l'augmentation de cette sensibilité en provoquant une hausse de la quantité de récepteurs à la FSH à la surface des cellules de la granulosa de rates [Xiao *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1993; Minegishi *et al.*, 1995].

L'activine-A semble avoir un effet direct sur la synthèse de plusieurs hormones ovariennes. Les cellules de la granulosa en culture augmentent leur biosynthèse d'inhibine en présence d'activine-A [Sugino *et al.*, 1988; LaPolt *et al.*, 1989], tandis que la stéroïdogenèse semble être influencée par l'activine-A de façon dépendante du développement des follicules [Shukovski *et al.*, 1993; Miró et Hillier, 1992; Shukovski et Findlay, 1990; Hillier et Miró, 1993].

L'activine-A est capable d'induire la prolifération de cellules de la granulosa de rates [Miró et Hillier, 1996], ainsi que la différenciation *in vitro* des cellules de la granulosa bovines [Findlay, 1993] et de rates [Xiao *et al.*, 1992]. Une autre étude sur des cellules de la granulosa bovines suggère que l'activine-A prévient ou retarde le processus de lutéinisation [Shukovski et Findlay, 1990]. Une des études les plus élégantes à ce sujet a été effectuée sur

des complexes ovocyte-granulosa de rates mis en culture [Li *et al.*, 1995]. Il fut démontré qu'en présence d'activine-A seule, la prolifération des cellules de la granulosa est stimulée, tandis qu'en présence de FSH, l'activine-A induit une réorganisation des complexes ovocyte-granulosa pour former des structures folliculaires *in vitro*.

En résumé, les activines, du moins l'activine-A, par leurs actions paracrinienes et autocrinienes sur les follicules ovariens, seraient des modulateurs importants des récepteurs à la FSH sur les follicules pré-antraux et favoriseraient la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa.

L'invalidation homozygote par recombinaison homologue du gène de la sous-unité β_B chez la souris fournit certains indices précieux sur l'implication *in vivo* de l'activine-B, de l'activine-AB ou de l'inhibine-B dans le processus de reproduction. Il fut constaté que le taux de fertilité était fortement diminué chez les individus femelles [Vassalli *et al.*, 1994]. Toutefois, la cause réelle de ces troubles n'est malheureusement pas encore élucidée. Par contre, il a été intéressant de constater qu'il y avait une surexpression de la sous-unité β_A dans les ovaires de souris ayant une déficience en sous-unité β_B . D'autre part, l'expression de la sous-unité α n'y était pas modifiée, suggérant une surproduction d'activine-A au détriment de l'inhibine A. Reste à savoir maintenant si l'infertilité de ces femelles est causée par une déficience en activine-B ou AB (ou même en inhibine-B), ou plutôt par une surproduction d'activine-A.

1.9 RÉCEPTEURS AUX ACTIVINES

Les activines étant des facteurs protéiques sécrétés dans le milieu extracellulaire, il doit exister un mécanisme capable de transmettre leur signal à l'intérieur des cellules cibles. Ce mécanisme se traduit premièrement par la présence de récepteurs à la surface cellulaire. C'est en 1988 qu'eurent lieu les premières études sur l'identification de sites de liaison de haute affinité pour les activines [revu par Mathews, 1994]. Comme prévu, ces sites de liaison se retrouvèrent dans plusieurs tissus et types cellulaires sensibles à l'action biologique des activines. Plusieurs types de sites de liaison des activines furent identifiés par marquage d'affinité à l'aide de réactions de pontage (cross-linking) de [¹²⁵I]activine. Cela a permis de prédire l'existence d'au moins deux types de récepteurs d'environ 50 kDa et de 60-70 kDa, ayant respectivement des tailles similaires aux récepteurs de type I et de type II du TGF-β. Ainsi, afin de respecter la nomenclature adoptée pour désigner les récepteurs du TGF-β, les récepteurs aux activines ont été classifiés comme étant des récepteurs de type I et de type II [Mathews, 1994]. Les TGF-β se lient également à plusieurs autres protéines membranaires de poids moléculaires beaucoup plus élevés [Derynck, 1994]. Cependant, parmi ces espèces protéiques, celle qui est pour l'instant la mieux caractérisée est ce que l'on nomme désormais le récepteur de type III du TGF-β ou bêtaglycan. Ce récepteur est en fait un protéoglycane et possède un squelette protéique de 130 kDa [López-Casillas *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991]. Une autre protéine réceptrice de haut poids moléculaire, l'endogline, ferait partie du système de signalisation des TGF-β [Cheifetz *et al.*, 1992]. L'endogline est une glycoprotéine qui possède un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique ayant une certaine homologie avec ceux du récepteur de type

III [López-Casillas *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991]. Cependant, les données bibliographiques disponibles ne font aucunement mention de la caractérisation de semblables récepteurs de type III pour les activines, bien que certains indices laissent supposer qu'ils puissent exister [McCarthy et Bicknell, 1994].

1.9.1 STRUCTURE MOLÉCULAIRE

1.9.1.1 Récepteurs aux activines de type II

L'expression dans les cellules COS d'une librairie d'ADNc, provenant de la lignée de cellules corticotrophes murines AtT20, a permis d'isoler le premier ADNc codant pour un récepteur aux activines [Mathews et Vale, 1991] qui, en raison de son poids moléculaire, a été classifié comme un récepteur de type II (ActRII). Le séquençage de cet ADNc a dévoilé que ActRII est un récepteur n'ayant qu'un seul domaine transmembranaire, flanqué de chaque côté d'un domaine de liaison extracellulaire en N-terminal et d'un domaine intracellulaire en C-terminal. La portion intracellulaire du récepteur possède un domaine de kinase spécifique aux résidus sérines et thréonines.

En utilisant des oligonucléotides basés sur les séquences des ADNc codant pour les deux récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase connus de l'époque, soit *daf-1* de *Caenorhabditis elegans* et ActRII, le groupe de Attisano *et al.* [1992] a cloné par PCR l'ADNc d'un second récepteur aux activines chez la souris. Celui-ci possède également la structure et le poids moléculaire d'un récepteur de type II et a donc été nommé récepteur aux activines de type IIB (ActRIIB). Chez la souris, l'épissage alternatif de l'ARNm d'ActRIIB génère 4 isoformes du récepteur: ActRIIB₁ à ActRIIB₄. En effet, il existe deux courtes séquences, situées de chaque côté du domaine

transmembranaire, pouvant être éliminées ou ajoutées. La séquence alternative du domaine extracellulaire semble influencer la liaison des activines à ActRIIB, puisque les isoformes conservant cette séquence (ActRIIB₁ et ActRIIB₂), ont 3 à 4 fois plus d'affinité pour l'activine-A que les autres isoformes. Par contre, la séquence alternative intracellulaire n'affecte nullement l'affinité de liaison des isoformes de ActRIIB. Jusqu'à présent, aucune autre fonction particulière n'a été attribuée à cette séquence alternative intracellulaire de ActRIIB.

Depuis le clonage initial des ADNc d'ActRII et d'ActRIIB chez la souris, plusieurs équipes ont isolé chez plusieurs autres organismes, dont le rat, l'humain et *Xenopus laevis*, les ADNc d'ActRII [Feng *et al.*, 1993; Donaldson *et al.*, 1992; Nishimatsu *et al.*, 1992] et de ActRIIB [Legerski *et al.*, 1992; Hildén *et al.*, 1994; Mathews *et al.*, 1992]. Un récepteur aux activines a également été identifié chez *Drosophila melanogaster* [Childs *et al.*, 1993] qui semble être à mi-chemin entre ActRII et ActRIIB puisqu'il montre autant d'homologie avec la séquence des récepteurs de type II qu'avec celle des récepteurs de type IIB.

Selon certaines études de liaison effectuées sur les différents types de récepteurs aux activines murins [Attisano *et al.*, 1992] et humains [Donaldson *et al.*, 1992], deux groupes de récepteurs semblent se dessiner. L'activine-A aurait une plus grande affinité de liaison pour les isoformes ActRIIB₁ et ActRIIB₂ ($K_d=100$ pM) que pour le récepteur ActRII et les isoformes ActRIIB₃ et ActRIIB₄ ($K_d=310-380$ pM). Cependant, d'autres études de liaison parviennent à des résultats totalement inverses, puisque des affinités se rapprochant de celle du premier groupe de récepteurs (ActRIIB₁ et ActRIIB₂)

ont été observées pour un ActRII humain ($K_d=125$ pM) [Attisano *et al.*, 1993], ainsi que pour un ActRII murin ($K_d=180$ pM) [Mathews et Vale, 1991]. En outre, selon Nakamura *et al.* [1992b], chez la souris, ActRIIB aurait plutôt une affinité semblable au deuxième groupe de récepteurs, avec un K_d de 345 pM. Cependant, il faut signaler que, lors des études de Nakamura *et al.*, le (ou les) isoforme(s) d'ActRIIB utilisés n'ont pas été identifiés, et pouvaient donc consister en un mélange de plusieurs isoformes d'ActRIIB.

1.9.1.2 Récepteurs aux activines de type I

En 1993, plusieurs groupes indépendants ont isolé une série de récepteurs transmembranaires à activité de sérine/thréonine kinase, en utilisant des méthodes de clonage basées sur le PCR, [Attisano *et al.*, 1993; Ebner *et al.*, 1993a; He *et al.*, 1993; Matsuzaki *et al.*, 1993; ten Dijke *et al.*, 1993; Tsuchida *et al.*, 1993]. Ces molécules étaient de la taille d'un récepteur du TGF- β de type I, précédemment identifié par marquage d'affinité au [125 I]TGF- β à l'aide de réactions de pontage. Les ligands de ces récepteurs n'étaient cependant pas connus, jusqu'à ce que plusieurs groupes [Ebner *et al.*, 1993b; Tsuchida *et al.*, 1993; Attisano *et al.*, 1993] identifient, parmi ces nouvelles molécules, le récepteur aux activines de type I (ActRI). Ce récepteur est donc également connu sous différents noms (ALK2, R1, tsr 7L, ActX1R, SKR1), selon le laboratoire où il a été isolé. Il a été démontré que ActRI ne peut lier l'activine à lui seul et doit obligatoirement être en présence d'ActRII ou d'ActRIIB pour être en mesure de le faire [Ebner *et al.*, 1993b; Tsuchida *et al.*, 1993; Attisano *et al.*, 1993].

Un deuxième récepteur de type I, ayant également une forte affinité pour l'activine-A uniquement en présence d'ActRII ou ActRIIB, a été ultérieurement identifié et est maintenant considéré par certaines équipes comme un récepteur aux activines de type IB (ActRIB) [ten Dijke *et al.*, 1994a; Carcamo *et al.*, 1994; Takumi *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996]. Ce récepteur ActRIB peut également se retrouver dans la littérature sous divers termes, tels R2, SKR2 et ALK4.

La structure générale des deux récepteurs de type I est similaire à celle des récepteurs de type II. Ils sont formés d'un domaine extracellulaire riche en cystéines, d'un unique domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire contenant le domaine d'une kinase spécifique aux résidus sérines et thréonines. Par contre, les récepteurs de type I sont de moindre taille que les récepteurs de type II et, en outre, ils ne possèdent pas le prolongement en C-terminal riche en résidus sérines et thréonines, caractéristique des récepteurs de type II. Contrairement aux récepteurs de type II, les récepteurs de type I possèdent une séquence d'environ 30 acides aminés fortement conservée, se retrouvant entre le domaine transmembranaire et celui de la kinase. Son nom, domaine GS, vient du fait que cette région contient une séquence riche en glycines et sérines (SGSGSG).

1.9.2 EXPRESSION DES RÉCEPTEURS AUX ACTIVINES

En analysant la distribution tissulaire de [¹²⁵I]-activine-A administrée à des rates immatures et à des rats adultes, le groupe de Woodruff *et al.* [1993b] identifia ainsi certains tissus-cibles des activines. Ils remarquèrent que l' [¹²⁵I]-

activine-A s'accumulait principalement dans l'ovaire et l'hypophyse. L' [¹²⁵I]-activine-A s'accumulait également dans les testicules et la moelle osseuse, mais en des proportions plus faibles. Le même groupe approfondit son étude des sites de liaison sur les cellules ovariennes de rates par liaison *in situ* d' [¹²⁵I]-activine-A [Woodruff *et al.*, 1993c]. Les auteurs de ces études conclurent que l'activine-A se lie aux cellules de la granulosa durant tout le cycle oestral, aux cellules de la thèque des follicules en développement, de même qu'aux cellules du *corpus luteum* durant les stades metestrus et diestrus.

En accord avec l'identification de ces sites de liaison de l'activine-A, les ARNm codant pour les récepteurs aux activines ont été détectés dans ces organes, ainsi que dans une foule d'autres tissus et de types cellulaires. Ceci n'est que plus cohérent lorsque l'on se rappelle que les activines agissent sur une multitude de types cellulaires. En général, d'après les données bibliographiques disponibles, tous les types de récepteurs semblent être exprimés dans un même tissu donné. L'expression des gènes d'ActRII et d'ActRIIB a été observée chez le rat dans: l'ovaire, les ovocytes, les testicules, le placenta, le cerveau et l'hypophyse [Feng *et al.*, 1993; Cameron *et al.*, 1994]. L'ARNm de ActRI a été retrouvé dans presque tous les tissus analysés dont le cerveau, l'hypophyse, les poumons, les reins, le foie, les testicules, le coeur, la rate, l'utérus et le pancréas [Attisano *et al.*, 1993; Ebner *et al.*, 1993a; Matsuzaki *et al.*, 1993; Tsuchida *et al.*, 1993]. Le spectre de distribution de l'ARNm de ActRIB est également très large et semble être relativement similaire à ce qui a été décrit pour les autres types de récepteurs aux activines [Xu *et al.*, 1994; Takumi *et al.*, 1995].

1.9.3 MÉCANISMES D'ACTION

Le progrès enregistré dans la caractérisation des mécanismes d'action des récepteurs aux activines est en grande partie dû aux études effectuées sur les récepteurs aux TGF- β qui servent de prototypes pour les autres membres de la famille de récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase [Revu par Kolodziejczyk et Hall, 1996; ten Dijke *et al.*, 1996]. Puisque les membres de la mégafamille du TGF- β , ainsi que leurs récepteurs, possèdent une très forte homologie de séquence et de structure, il est possible de croire que plusieurs de leurs interactions ligand-récepteur et de leurs mécanismes de signalisation peuvent être communs ou du moins semblables.

1.9.3.1 Hétéromérisation des récepteurs

Il a déjà été décrit précédemment que ActRII et ActRIIB peuvent lier l'activine lorsqu'ils sont exprimés seuls dans un système de cellules COS en culture. Il a par ailleurs été démontré *in vitro*, en n'utilisant que le domaine extracellulaire cloné du récepteur de type II du TGF- β (T β RII), que la portion soluble du récepteur ainsi générée était en mesure de s'associer au TGF- β [Lin *et al.*, 1995; Letourneur *et al.*, 1996]. Ceci apporte donc indirectement des preuves supplémentaires de l'affinité des activines envers les récepteurs ActRII et ActRIIB et que cette association ne nécessite pas l'intervention de molécules membranaires auxiliaires. Par contre, bien que ActRII et ActRIIB puissent lier les activines, il semble que ces récepteurs ne sont pas suffisants pour transmettre un signal intracellulaire.

D'autre part, lorsque les récepteurs de type I, ActRI ou ActRIB, sont exprimés seuls dans des cellules COS, ils ne peuvent lier l'activine. Un des deux récepteurs aux activines de type II doit absolument être co-exprimé, afin que les récepteurs de type I/II puissent lier l'activine [Attisano *et al.*, 1993; Ebner *et al.*, 1993b; Tsuchida *et al.*, 1993; Mathews et Vale., 1993; ten Dijke *et al.*, 1994a]. Ces études révélèrent également que la formation de ces complexes hétéromériques n'impliquait que des liens de types non-covalents entre les récepteurs.

Grâce à de récents travaux, il est maintenant possible de se représenter un peu plus en détail la composition du complexe transmembranaire de transduction du signal des activines. Il semble que la formation du complexe de signalisation des activines s'effectue en utilisant des mécanismes similaires à ceux décrits dans le système TGF- β . D'après les études sur les récepteurs du TGF- β , T β RII pourrait se présenter sous forme d'homodimères à la surface cellulaire sans requérir la présence de TGF- β [Chen et Derynck, 1994]. De la même façon, deux molécules d'ActRII ou plus peuvent interagir entre elles pour former des homodimères en absence d'activines [de Winter *et al.*, 1996b].

Il a été démontré par co-immunoprécipitation, grâce à un récepteur ActRII dont le domaine de la kinase était éliminé, que le domaine intracellulaire n'intervenait pas dans cette interaction homodimérique [de Winter *et al.*, 1996b]. Dans la même veine, un autre groupe, celui de Willis *et al.* [1996], a également analysé les interactions entre les différents récepteurs aux activines, mais cette fois-ci à l'aide du système double-hybride qui permet de déceler des interactions *in vivo* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les protéines de fusion utilisées dans le système double-hybride n'étaient composées que du domaine intracellulaire de ActRII. Il s'est avéré que les domaines

intracellulaires de ActRII ne montraient aucune interaction homomérique dans ce système [Willis *et al.*, 1996]. Ces résultats viennent donc appuyer l'hypothèse voulant que les domaines extracellulaire ou transmembranaire soient les régions impliquées dans la formation de ces homomères, tandis que le domaine intracellulaire de ActRII ne serait pas essentiel au processus d'homomérisation du récepteur.

D'autre part, lors d'expériences de co-précipitation, il a été étonnant de constater que ActRII ne montrait aucune interaction avec les isoformes ActRIIB₂ et ActRIIB₄ du second récepteur de type II [de Winter *et al.*, 1996b]. De plus, la présence d'activines ne stimulait pas la formation de complexes entre ces deux types de récepteurs. D'autres résultats, obtenus à l'aide du système double-hybride, ont fourni des preuves supplémentaires sur l'absence d'interaction entre ActRII et ActRIIB [Willis *et al.*, 1996].

Il a été démontré à l'aide d'études *in vitro* que T β RI a une affinité naturelle pour T β RII lorsque la concentration des récepteurs atteint des niveaux supraphysiologiques [Ventura *et al.*, 1994]. Cependant, en conditions physiologiques, la présence de TGF- β serait nécessaire pour former un complexe stable entre T β RI et T β RII. Il a également été proposé que le TGF- β stimule la formation d'un complexe formé de trois types de récepteurs, soit les récepteurs de type I, de type II, ainsi que de type III (bêtaglycan) [Moustakas *et al.*, 1993]. La véritable stoechiométrie des complexes de signalisation des récepteurs à activité de serine et thréonine kinase demeure cependant encore incertaine. Il a été suggéré, du moins pour le système TGF- β , que ces complexes pourraient être en fait des hétérotétramères se composant de deux molécules de chacun des récepteurs T β RI et T β RII [Yamashita *et al.* 1994].

Un modèle semblable d'interactions pourrait s'appliquer pour expliquer la formation des complexes de signalisation des activines. En effet, ActRII et ActRIIB auraient également une affinité naturelle envers leurs récepteurs de type I. En absence d'activines, ActRI peut être co-précipité à l'aide des anticorps spécifiques à ActRII ou à ActRIIB lorsque ces récepteurs sont surexprimés dans des cellules COS ou dans des cellules épithéliales pulmonaires de vison (cellules L17) [Attisano *et al.*, 1996; de Winter *et al.*, 1996b; Willis *et al.*, 1996]. De plus, les interactions entre les récepteurs de type I et de type II ont été analysées à l'aide du système double-hybride. Il a été démontré que le domaine intracellulaire d'ActRII interagissait avec ceux d'ActRI et d'ActRIB [Willis *et al.*, 1996]. Toutefois, il convient de mentionner que le domaine kinase des récepteurs de type I ne serait pas essentiel à la formation de complexes hétéromériques puisqu'un récepteur ActRI, dont le domaine intracellulaire a été tronqué, parvient toujours à s'associer à ActRII [Ebner *et al.*, 1993b]. Globalement, ces résultats suggèrent que l'association des deux types de récepteurs s'effectue sur plusieurs points de contact.

Il faut toutefois prendre garde à l'interprétation des résultats démontrant des associations de récepteurs aux activines de type I et de type II en absence d'activines. Tout comme dans le système TGF- β , ces interactions constitutives ne surviendraient probablement que suite à la surexpression des récepteurs et ne refléteraient pas la situation qui prévaut normalement dans des conditions physiologiques. En outre, les complexes formés en absence d'activines seraient composés principalement de précurseurs immatures des récepteurs n'ayant pas encore traversé l'appareil de Golgi, tandis qu'en présence

d'activines, les complexes seraient plutôt formés de récepteurs matures [Attisano *et al.*, 1996].

Finalement, il a été suggéré que, à l'intérieur du complexe de signalisation, les récepteurs de type II aient une association transitoire avec les récepteurs de type I [Attisano *et al.*, 1996], qui s'apparenterait au genre d'interactions retrouvées entre un enzyme et son substrat [Willis *et al.*, 1996].

1.9.3.2 Spécificité des complexes de récepteurs

Bien que la découverte des récepteurs de la mégafamille du TGF- β ait permis de mieux comprendre les mécanismes de signalisation en jeu, force est d'avouer que cette signalisation semble beaucoup plus complexe que ce que l'on croyait à l'époque. Cette complexification vient du fait qu'il semble exister une promiscuité générale parmi les récepteurs de type I envers leurs partenaires de liaison. Les études de liaison effectuées sur ActRI [Ebner *et al.*, 1993b; ten Dijke *et al.*, 1994a] et ActRIB [Carcamo *et al.*, 1994; Takumi *et al.*, 1995; ten Dijke *et al.*, 1994a], révélèrent que ces récepteurs peuvent également lier le TGF- β en présence de son récepteur T β RII. En outre, il a été démontré que ActRI peut également lier BMP-7 en présence du récepteur aux BMP de type II cloné chez *C.elegans* (DAF-4) [ten Dijke *et al.*, 1994b]. De plus, le TGF- β et l'activine peuvent lier, bien qu'avec une affinité réduite, presque tous les autres récepteurs de type I à activité de serine/thréonine kinase en présence de leur récepteur de type II respectif. Il faut par contre interpréter ces derniers résultats avec modération, car il est possible que ces complexes de faibles affinités ne soient que des artefacts causés par la surexpression des récepteurs dans le système d'analyse employé, soit celui des

cellules en culture. Donc il n'est pas improbable que certains des complexes formés ne soient tout simplement pas fonctionnels.

D'autre part, il est suggéré que ActRII et ActRIIB puissent être des récepteurs de type II, non seulement pour les activines, mais aussi pour d'autres membres de la mégafamille du TGF- β . ActRIIB forme des complexes fonctionnels, avec les récepteurs aux BMP de type I (BMPR-I ou ALK-3) et de type IB (BMPR-IB ou ALK-6), capables de transmettre le signal du facteur BMP-2 à l'intérieur de la cellule [Hoodless *et al.*, 1996]. BMP-7 peut utiliser les complexes formés de ActRII/ActRI ou de ActRIIB/ActRI afin de transmettre un signal intracellulaire semblable à celui des activines [Yamashita *et al.*, 1995]. BMP-7 est cependant incapable d'utiliser les complexes intégrant ActRIIB. D'autre part, les récepteurs de type I et de type II de GDF-5 ont récemment été identifiés. Il ressort de ces études que GDF-5 serait capable de transmettre un signal d'activation transcriptionnelle par l'entremise d'un complexe formé de BMPR-IB et ActRII [Nishitoh *et al.*, 1996].

1.9.3.3 Mécanisme d'activation

Il est suggéré que l'activine se lie à un complexe de récepteurs de type I et de type II qui doit, dès lors, être activé en vue de transmettre le signal de l'autre côté de la membrane cellulaire. C'est par homologie de séquences que les récepteurs aux activines ont été identifiés comme étant des kinases ayant une spécificité de phosphorylation envers les résidus sérines et thréonines. Ceci indique que le mécanisme d'activation est probablement différent de celui, maintenant bien caractérisé, des récepteurs à activité de tyrosine kinase

[Heldin, 1995]. En fait, l'analyse d'ActRII et d'ActRIIB surexprimés dans des cellules COS [Ichijo *et al.*, 1993; Mathews et Vale, 1993], a démontré que ces récepteurs étaient des phosphoprotéines principalement phosphorylées sur les résidus sérines. ActRII et ActRIIB contenaient également une faible quantité de phosphothréonines, mais aucune trace de phosphotyrosines. Contrairement à ce que l'on retrouve chez les récepteurs à activité de tyrosine kinase, la liaison du ligand, i.e. l'activine, ne semblait pas affecter dramatiquement le degré de phosphorylation d'ActRII et d'ActRIIB. Les études utilisant des mutants d'ActRII et d'ActRIIB, dont les kinases ont été rendues inactives par mutations ponctuelles, ont révélé que certains sites de phosphorylation étaient générés par autophosphorylation. ActRII et ActRIIB sont donc des kinases constitutives, mais qui ne peuvent transmettre un signal à elles seules.

Quant aux récepteurs de type I, contrairement à ActRII et ActRIIB, ils ne sont que faiblement phosphorylés lorsque exprimés seuls dans des cellules COS [Tsuchida *et al.*, 1995]. Par contre, ActRI et ActRIB deviennent hautement phosphorylés lorsqu'ils sont co-exprimés en présence d'ActRII ou d'ActRIIB. Toujours en accord avec la spécificité du domaine kinase des récepteurs de type II, la phosphorylation des ActRI et ActRIB s'effectue principalement sur les résidus sérines et, à un degré moindre, sur les résidus thréonines [Tsuchida *et al.*, 1995]. Par analyses de mutagenèse, il a été suggéré que le domaine GS des récepteurs de type I, qui arbore plusieurs sérines et thréonines, serait la cible des kinases des récepteurs de type II [Attisano *et al.*, 1996; Willis *et al.*, 1996]. La phosphorylation de ces résidus est importante, car la mutation de certaines combinaisons de sérines et de thréonines dans le domaine GS d'ActRIB entraînait une perte de signalisation [Willis *et al.*, 1996].

La création de mutants ActRII, dont la kinase a été inactivée par mutation ponctuelle ou par délétion complète du domaine de la kinase, a permis de démontrer que l'activité de phosphorylation des récepteurs de type II est essentielle à la transmission du signal des activines. Ces mutations entraînaient une perte complète du pouvoir de signalisation. De plus, ces mutants ActRIIB agissaient en dominants négatifs, puisqu'ils empêchaient les récepteurs aux activines natifs de transmettre le signal des activines à l'intérieur de la cellule. Les mutants ActRIIB pouvaient se lier à ActRI et à ActRIB, mais ils étaient incapables de les phosphoryler. Donc, la phosphorylation des récepteurs de type I, ainsi que la signalisation, sont dépendantes d'un domaine de la kinase fonctionnel des récepteurs de type II.

Une percée importante dans la compréhension du mécanisme d'activation des récepteurs aux activines est survenue avec la création de mutants ActRIB activés de façon constitutive. La substitution de la dernière thréonine du domaine GS (T206) d'ActRIB par l'acide aspartique (ActRIB-T206D) [Attisano *et al.*, 1996] ou par l'acide glutamique (ActRIB-T206E) [Willis *et al.*, 1996] permet à ces récepteurs mutés de déclencher une réponse élevée en absence d'activines. De plus, la présence d'activines stimule davantage l'activité de ActRIB-T206E [Willis *et al.*, 1996]. Or, fait intéressant, le mutant ActRIIB à dominance négative, contrairement à son action sur ActRIB natif, n'était pas en mesure de freiner l'activité de signalisation basale du mutant ActRIB constitutif [Attisano *et al.*, 1996], mais seulement l'activité induite en présence d'activine [Willis *et al.*, 1996].

Donc, en résumé, ces études suggèrent que les récepteurs de type I soient situés en aval des récepteurs de type II dans la cascade de signalisation des activines et agiraient comme substrat pour les récepteurs de type II. La liaison de l'activine au complexe de récepteurs induirait une phosphorylation du domaine GS des récepteurs de type I par la kinase des récepteurs de type II.

Une fois activés par phosphorylation, les récepteurs de type I phosphoryleraient à leur tour un substrat intracytoplasmique afin de propager le signal des activines.

1.9.3.4 Transduction du signal

Jusqu'à récemment, il était difficile de décrire les mécanismes pouvant expliquer la pluralité de réponses provoquées par les activines. Or, certains indices provenant d'études indépendantes permettent maintenant de construire une hypothèse intéressante à ce sujet. Vu la diversité de récepteurs aux activines pouvant être exprimés à la surface cellulaire, les activines disposeraient d'un impressionnant éventail de combinaisons de récepteurs pouvant transmettre leurs différents signaux. Le groupe de Tsuchida *et al.* [1995] a suggéré que ActRI et ActRIB seraient en fait deux récepteurs fonctionnellement distincts. Les travaux de Carcamo *et al.* [1994] viennent appuyer cette hypothèse en démontrant que la réponse engendrée par l'activine-A peut être différente dans la mesure où le complexe de signalisation intègre ActRI ou bien ActRIB. Ce groupe a effectué ses expériences à l'aide de la lignée cellulaire R-1B qui est dérivée par mutagenèse de la lignée cellulaire d'épithélium pulmonaire de vison, Mv1Lu. Ces cellules R-1B sont résistantes à l'action inhibitrice du TGF- β et des activines sur leur croissance. Cependant, l'activine peut bloquer la prolifération des cellules R-1B lorsque

transfectées avec l'ADNc de ActRIB. De même, il a été intéressant de constater que TGF- β était également en mesure d'inhiber la croissance des cellules R-B transfectées avec T β RI. Par contre, l'activine et le TGF- β ne pouvaient bloquer la croissance des cellules R-IB transfectées avec ActRI ou TSRI respectivement. Ainsi, contrairement à ActRIB et T β RI, ActRI et TSRI ne peuvent transmettre le signal d'inhibition de croissance des activines et du TGF- β . Donc, les récepteurs de type I seraient en mesure de transmettre des signaux différents. En outre, ActRIB et T β RI possèdent des domaines kinases fortement homologues (90%), expliquant peut-être pourquoi ces deux récepteurs génèrent une réponse similaire. À l'inverse, les domaines kinases d'ActRI et de TSRI ne sont que très peu homologues avec ceux d'ActRIB et de T β RI. Il est donc suggéré que les réponses soient dépendantes des domaines kinase portés par les différents récepteurs de type I.

1.9.4 ACTION ANTAGONISTE DES INHIBINES

Comme mentionné précédemment, les inhibines sont des antagonistes de plusieurs réponses des activines. Outre les activines, les récepteurs ActRII et ActRIIB peuvent également lier l'inhibine A, avec cependant une affinité 10 fois plus faible que celle envers les activines [Nakamura *et al.*, 1992b; Mathews et Vale, 1991; Mathews *et al.*, 1992]. Le mode d'action des inhibines n'est pas encore très bien connu, mais il est proposé qu'elles soient des antagonistes de la formation du complexe actif de signalisation des activines [Xu *et al.*, 1995]. Il est suggéré que l'activine, étant un dimère de sous-unité β , s'associe à un récepteur de type II par l'entremise d'une de ses sous-unités β et ensuite, la sous-unité β libre recruterait un récepteur de type I. Ce recrutement formerait le complexe actif de signalisation. Quant à

l'inhibine, elle se lierait également à un récepteur de type II via son unique sous-unité β , mais la sous-unité α serait incapable de recruter le récepteur de type I. Ainsi, l'inhibine agirait comme un antagoniste à dominance négative sur la transmission du signal intracellulaire des activines, en empêchant la formation d'un complexe de signalisation fonctionnel.

1.10 MÉDIATEURS INTRACELLULAIRES DU SIGNAL DES ACTIVINES

Les événements intracellulaires déclenchés par les activines et conduisant éventuellement à une réponse transcriptionnelle, commencent à être partiellement élucidés. Quelques facteurs cytoplasmiques ont été identifiés comme étant capables de s'associer avec les domaines intracellulaires d'ActRI et d'ActRIB, tandis que d'autres facteurs, agissant probablement plus en aval dans la cascade de signalisation, semblent répondre directement à une stimulation par les activines.

1.10.1 FKBP12

L'immunophiline FKBP12 a été le premier facteur cytoplasmique à être rapporté comme pouvant interagir spécifiquement avec les récepteurs aux activines [Wang *et al.*, 1994]. FKBP12 a été fortement conservé au cours de l'évolution et sa distribution est ubiquiste dans presque tous les types cellulaires de mammifères. Bien que FKBP12 soit reconnu pour être une protéine-cible des macrolides FK506 et rapamycine, le rôle physiologique de FKBP12 n'est malheureusement pas encore très bien défini. À l'aide du

système double-hybride, il a été démontré que FKBP12 est capable d'interagir avec les domaines intracellulaires de tous les récepteurs de type I de la mégafamille du TGF- β [Wang *et al.*, 1996a]. À l'inverse, les récepteurs de type II, dont ActRII, n'interagissent pas avec FKBP12. FKBP12 est donc une protéine de liaison commune pour tous les récepteurs de type I à activité de sérine/thréonine kinase. Il a du même coup été démontré que la liaison d'un ligand au complexe de récepteurs, en l'occurrence TGF- β , induisait la relâche de FKBP12 grâce à la phosphorylation de T β RI par l'intermédiaire de l'activité enzymatique de T β RII. Les sites de phosphorylation des récepteurs de type I, essentiels à cette relâche, n'ont pu être identifiés avec précision, mais il semble que le domaine GS ne soit pas impliqué.

Les études de Wang *et al.* [1996a] ont en outre fourni de précieux indices sur le rôle négatif que jouerait FKBP12 dans la signalisation des membres de la mégafamille du TGF- β . Un dérivatif non-fonctionnel de FK506 était en mesure de fixer FKBP12 et sa présence en milieu de culture empêchait FKBP12 de se lier au T β RI. Cette relâche induite de FKBP12 n'avait aucun effet en absence de ligands extracellulaires, mais potentialisait significativement l'activité de TGF- β , lorsque ce dernier était ajouté en faibles doses. Ces résultats suggèrent donc que FKBP12 est un inhibiteur commun des récepteurs de type I et non un second messager de la voie de signalisation des activines. Sachant que FKBP12 est capable de lier la calcineurine, qui est une phosphatase de sérine/thréonine cytoplasmique, le groupe de Wang *et al.* [1996a] a proposé le mécanisme d'inhibition hypothétique suivant: FKBP12 servirait de protéine d'ancrage à un inhibiteur cytoplasmique, en l'occurrence une phosphatase de sérine/thréonine, pour permettre sa juxtaposition aux

domaines intracellulaires des récepteurs de type I et ainsi, garder les récepteurs de type I ou leurs substrats dans un état hypophosphorylé inactif.

1.10.2 P21^{RAS}FARNESYLTRANSFÉRASE α

Il a été récemment proposé que la sous-unité α de la farnesyltransférase (FT α) puisse avoir des interactions physiques directes avec le domaine intracellulaire de T β RI et d'ActRIB dans le système double-hybride de levures ainsi que dans les cellules COS et Mv1Lu de mammifères [Kawabata *et al.*, 1995; Ventura *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996b]. Cette sous-unité α , de concert avec les sous-unités farnésyltransférase β ou géranylgéranyltransférase β , entre dans la composition d'enzymes hétérodimériques impliqués dans le transfert d'un groupement farnésyl ou géranylgéranyl sur plusieurs protéines, dont la plus connue est probablement RAS. FT α semble s'associer spécifiquement à T β RI et à ActRIB puisque, dans le système double-hybride, les récepteurs de type II, ainsi que ActRI et TSRI ne montraient aucun signe d'interaction. Tout comme FKBP12, FT α ne semble pas lier directement les domaines GS de T β RI et de ActRIB [Ventura *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996b]. Il est par contre encore trop tôt pour décrire avec certitude le mécanisme d'interaction utilisé par T β RI ou ActRIB pour s'associer à FT α , car les données bibliographiques à ce sujet sont plutôt contradictoires. En analysant les interactions protéine-protéine à l'aide du système double-hybride ou tout simplement dans des expériences *in vitro*, il a été rapporté que l'introduction de mutations affectant l'activité de la kinase de T β RI, ou son degré de phosphorylation, pouvait moduler l'interaction FT α /T β RI [Kawabata *et al.*, 1995; Ventura *et al.*, 1996], tandis que dans les cellules COS, ces

mutations n'avaient aucun effet sur cette interaction [Ventura *et al.*, 1996]. De plus, d'après les études de Ventura *et al.* [1996], dans des cellules COS, FT α serait une phosphoprotéine même en absence de TGF- β et de récepteurs du TGF- β transfectés. Toujours selon Ventura *et al.* [1996], le degré de phosphorylation de FT α n'augmentait pas suite à l'addition de TGF- β dans le milieu de culture de cellules COS surexprimant les deux types de récepteurs du TGF- β [Ventura *et al.*, 1996]. Pourtant, en utilisant le même modèle d'études, ainsi que dans les cellules Mv1Lu non-transfectées, le groupe de Wang *et al.*, [1996b] a constaté une augmentation significative du degré de phosphorylation de FT α en présence de TGF- β .

Faisant suite à cette hausse de phosphorylation de FT α en présence de TGF- β , il a été démontré que la liaison du TGF- β au complexe de récepteurs T β RI/T β RII empêchait le complexe d'être co-précipité avec FT α [Wang *et al.*, 1996b]. Il est donc suggéré que la liaison du ligand induise la relâche de FT α . Par contre, la liaison du TGF- β à un complexe de récepteurs incorporant un récepteur T β RII ayant une kinase inactive, permettait au complexe d'être co-précipité avec FT α , suggérant ainsi qu'un T β RII inactif ne permette pas la relâche de FT α en présence du ligand. À l'inverse, un complexe de récepteurs, intégrant cette fois-ci un récepteur T β RI dont la kinase était inactivée, était capable de relâcher FT α , et en outre, FT α était phosphorylé malgré l'absence d'une activité kinase de T β RI. Il est donc suggéré que le largage de FT α soit dépendant de l'activité de phosphorylation des kinases des récepteurs de type II ou de kinases inconnues, associées aux récepteurs. Alors, bien que Kawabata *et al.* [1995] aient rapporté que T β RI peut phosphoryler FT α en

solution, il semble que l'activité de la kinase de T β RI n'est pas essentielle à la relâche de FT α .

Il est maintenant bien connu que la farnésylation de RAS augmente l'activité de ce médiateur de signalisation en permettant sa localisation membranaire. D'autre part, certains indices suggèrent que RAS soit impliqué dans la voie de signalisation du TGF- β et des activines [Mulder et Morris, 1992; Whitman et Melton, 1992]. Ainsi, une hypothèse séduisante s'offrait aux groupes de Kawabata *et al.* [1995] et de Wang *et al.* [1996b]; selon eux, TGF- β et les activines pourraient transmettre certains de leurs signaux grâce au contrôle de la farnésylation de RAS via la régulation de la sous-unité FT α . En ce sens, il a été démontré que T β RI reconnaissait la sous-unité FT α libre, mais qu'il était incapable de la séquestrer en tant que partie intégrante des enzymes farnésyltransférase ou géranylgeranyltransférase [Ventura *et al.*, 1996]. Donc, il est possible de penser que T β RI, de même que ActRII par analogie, sont des régulateurs négatifs de l'isoprénnylation en empêchant FT α de former les enzymes farnésyltransférase et géranylgeranyltransférase. Malheureusement, la signification fonctionnelle exacte de l'interaction de FT α aux récepteurs T β RI et ActRI est pour le moment encore nébuleuse. Par exemple, le groupe de Ventura *et al.* [1996] a mis en évidence que la signalisation du TGF- β par T β RI n'impliquerait pas l'activité de la farnésyltransférase, car la présence d'un inhibiteur de cet enzyme n'empêchait pas la propagation du signal des TGF- β à l'intérieur de la cellule. D'autre part, TGF- β ne semble pas modifier l'activité d'isoprénnylation cellulaire [Ventura *et al.*, 1996], ce qui implique que la relâche de FT α , par liaison du ligand au complexe de récepteurs, n'entraînerait pas une hausse d'isoprénnylation. Ainsi,

aucun résultat clair n'a encore réussi à démontrer une interaction quelconque du système de signalisation du TGF- β sur l'activité de FT α et vice-versa. Il reste donc encore à établir s'il existe réellement un lien entre la régulation de l'activité de RAS et la signalisation des TGF- β /activines.

1.10.3 MAD

Comme on peut le constater, l'incertitude persiste toujours quant aux substrats réels des récepteurs aux activines. On estime actuellement que la voie de signalisation des activines, de la membrane cellulaire au noyau, comporte plusieurs médiateurs intracellulaires. Bien que la plupart de ces joueurs restent encore à être découverts, une série de gènes, codant pour un nouveau type de facteurs de transcription, ont été identifiés comme pouvant répondre spécifiquement au signal de plusieurs des membres de la mégafamille du TGF- β , dont les activines. Initialement, c'est chez la drosophile que le gène *Mothers against decapentaplegic* (Mad) fut identifié [Sekelsky *et al.*, 1995]. Par après, plusieurs gènes ou ADNc homologues furent isolés chez *C.elegans* (Sma2-4) [Savage *et al.*, 1996], *Xenopus* (Xmad1-2) [Graff *et al.*, 1996], la souris (Madr2) [Baker et Harland, 1996], le rat (Mad3) [Chen *et al.*, 1996a] et l'humain [(Madr1) Hoodless *et al.*, 1996; (Smad1) Liu *et al.*, 1996; (hMad1-4) Zhang *et al.*, 1996]. Les gènes de cette nouvelle famille codent pour des protéines d'environ 50 kDa, qui ne possèdent aucune homologie notable avec les motifs protéiques connus. Parmi les membres de cette nouvelle famille, certains de ces homologues de MAD ont été identifiés dans la voie de signalisation des activines. C'est le cas entre autres de Madr2, cloné à partir d'une librairie d'ADNc de cellules souches embryonnaires de souris [Baker et Harland, 1996]. Ce facteur a été identifié à

l'aide d'un système de trappe moléculaire utilisant l'ectoderme d'embryons de *Xenopus*. Dans ce système, Madr2 avait une activité d'inducteur du mésoderme dorsal similaire à celle de l'activine. De plus, il a été démontré que la localisation de Madr2 est normalement cytoplasmique, mais que la présence d'activine-B stimulait son transfert dans le noyau. Donc Madr2 semble bel et bien répondre au signal des activines et transmettre son message.

Lors du clonage de ce facteur, un clone codant pour un facteur Madr2 ne possédant pas la région N-terminale fut isolé. Il s'est avéré que cette forme tronquée de Madr2 se retrouvait exclusivement dans le noyau, sans même un traitement aux activines, et pouvait induire le mésoderme dorsal plus efficacement que la forme entière de Madr2. Ce résultat suggère donc que Madr2 possède deux domaines fonctionnels, soit un domaine activateur du signal (en C-terminal) et un domaine régulateur (en N-terminal). Le domaine activateur agirait comme facteur de transcription ou comme co-activateur, tandis que le domaine régulateur permettrait la rétention de Madr2 dans le cytoplasme, jusqu'au moment où il devient activé par le signal des activines.

Peu de temps après la découverte de Madr2, une autre protéine Mad fut rapportée pouvant être impliquée dans la voie de signalisation des activines et du TGF- β [Chen *et al.*, 1996a]. Il s'agissait cette fois-ci de Mad3, isolé d'une librairie d'ADNc de cerveau de rat, grâce à des sondes générées à partir des ADNc de Mad de drosophile et de Mad1 humain. Bien que la localisation sous-cellulaire de Mad3 endogène ne fut pas déterminée, tout indique que Mad3 est également une protéine nucléaire, puisqu'elle était retrouvée presque exclusivement dans le noyau de cellules R-1B et CHO transfectées de façon transitoire. Certains indices sur l'implication de Mad3 dans la voie de

signalisation des activines ont été obtenus grâce à la construction p3TP-Lux. Ce vecteur-rapporteur p3TP-Lux comporte le gène rapporteur de la luciférase, sous la direction d'un promoteur pouvant être stimulé par TGF- β et les activines. La surexpression de Mad3 par des cellules R-1B transfectées avec p3TP-Lux, augmentait la transcription basale de p3TP-Lux. Mad3 stimulait également l'induction de la transcription de p3TP-Lux par TGF- β ou l'activine.

Comme mentionné précédemment, il s'avère que les récepteurs aux activines sont impliqués dans plusieurs voies de signalisation, outre celle des activines. En ce sens, le groupe de Hoodless *et al.* [1996] a étudié la protéine MADR1, dont l'ADNc a été cloné chez l'humain. Il semble que BMP-2 peut transmettre un signal par l'intermédiaire d'un complexe de récepteurs formé d'ActRIIB et de BMPRI ou BMPRII, conduisant à la phosphorylation de MADR1. L'activine-A, au contraire, ne pouvait induire pareille phosphorylation.

1.10.4 FAST-1

Une découverte très récente permettra sûrement de comprendre un peu mieux le mécanisme d'activation de la transcription des gènes stimulés par les activines. C'est grâce aux travaux du groupe de Chen *et al.* [1996b] sur l'embryogenèse de *Xenopus*, qu'un premier partenaire potentiel des protéines MAD fut identifié. Le criblage d'une librairie d'ADNc d'ovocytes de *Xenopus*, à l'aide du système à hybride unique de levures, a permis aux membres de cette équipe d'identifier ce partenaire de transcription, qu'ils ont nommé "Forkhead activin signal transducer-1" (FAST-1). Ce facteur possède une activité de liaison spécifique à un élément de réponse aux activines (ARE;

pour "Activin-response element"), identifié sur le promoteur du gène *Mix.2*. Ce gène est inductible par les activines lors de l'embryogenèse de *Xenopus*. La localisation sous-cellulaire de FAST-1 semble être constamment nucléaire, même en absence d'activines. De plus, en réponse à un traitement aux activines, FAST-1 forme un complexe avec l'homologue de Mad2 chez *Xenopus*, XMAD2, pouvant se fixer au ARE. Les données disponibles semblent indiquer que FAST-1 serait la composante de liaison à l'ADN et que XMAD2 comporterait le domaine d'activation de la transcription. Cependant, il reste à déterminer si FAST-1, ou ses homologues potentiels non-identifiés, sont une caractéristique commune de toutes les réponses aux activines. Certaines évidences laissent supposer le contraire, puisque certains ARE supplémentaires ont été identifiés chez *Xenopus laevis* [Watabe *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1996] et semblent différents de celui utilisé pour isoler FAST-1. Donc, il est possible qu'il existe plusieurs types de complexes d'activation de la transcription inductibles par les activines, chacun possédant son propre domaine de liaison à l'ADN.

CHAPITRE 2

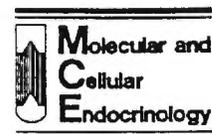
2.1 ARTICLE 1: BOVINE ACTIVIN RECEPTOR TYPE II CDNA: CLONING AND TISSUE EXPRESSION

Publié dans la revue "Molecular and Cellular Endocrinology 106:1-8 (1994)"



ELSEVIER

Molecular and Cellular Endocrinology 106 (1994) 1-8



Bovine activin receptor type II cDNA: cloning and tissue expression

J.-F. Ethier, A. Houde, J.G. Lussier, D.W. Silversides*

Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRRA), Department of Anatomy and Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Received 26 February 1994; accepted 25 August 1994

Abstract

The cDNA encoding the bovine activin type II receptor has been cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of a bovine testicular RNA preparation. Sequence comparisons of the bovine activin type II receptor with its human, mouse and rat homologues show strong evolutionary conservation at the nucleotide level of 94.9%, 93.5%, 92.9% and at the amino acid level of 98.6%, 99.0%, 98.8%, respectively. Bovine activin type II receptor mRNA is widely but not strongly expressed in reproductive tissues, with a major RNA band at 6 kb and minor bands at 5 kb and 3 kb. The differential levels of expression observed in these tissues suggest that levels of bActRII gene expression are regulated. Furthermore, we have observed decreasing levels of the bovine activin type II receptor mRNA with testes maturation.

Keywords: Activin; Receptor; Type II; Bovine; Serine/threonine kinase

1. Introduction

In recent years, a series of gonadal protein factors have been isolated, cloned and characterized primarily due to their ability to modulate pituitary follicle stimulating hormone (FSH) secretion (Ling et al., 1990; Vale et al., 1990). These include the inhibins and activins, which belong to the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily of ligands, and follistatin. The inhibins are heterodimer proteins which were initially isolated for their capacity to inhibit pituitary FSH release while the activins are homodimers, structurally related to the inhibins, which enhance FSH release. Follistatin is a structurally unrelated monomeric protein which decreases FSH release. Activins have a wide tissue distribution of expression (Vale et al., 1990) and are implicated in diverse biological activities including cell differentiation, proliferation and antiproliferation (DePaolo et al., 1991). Activins are present and functional in reproductive systems. In male tissues, androgen production by Leydig cells is decreased by activins (Lin et al., 1989; Mauduit et al., 1991), whereas spermatogenesis is increased (Mather et al., 1990). In female tissues, activins stimulate inhibin secretion (LaPolt et al., 1989; Sugino et al., 1988), induction of FSH receptors (Hasegawa et al., 1988) and aromatase activity (Hutchinson et al., 1987) in granulosa cells. In addition, placental secretion of hCG, GnRH and progesterone is stimulated by activins (Petraglia et al., 1989).

Signal transduction mechanisms for activins, inhibins and follistatin are poorly characterized. Membrane receptors for follistatin and inhibin are not described, although follistatin is a known binding protein for activin (Nakamura et al., 1990; Shimonaka et al., 1991). Recently, an activin receptor cDNA (type II) was cloned via expression screening of a mouse cDNA library and was reported to code for a new kind of membrane bound receptor with a predicted serine/threonine kinase domain (Mathews and Vale, 1991) showing sequence homology to the *Caenorhabditis elegans* Daf-1 gene product (Georgi et al., 1990). Human and rat activin type II receptor sequences were generated based on heterologous sequence information (Donaldson et al., 1992; Feng et al., 1993). A second type of activin receptor (type IIB) related to the type II receptor has been reported and characterized for the mouse and rat species (Attisano et al., 1992; Legerski et al., 1992). In addition, the cDNA coding for the TGF- β type II receptor has

Signal transduction mechanisms for activins, inhibins and follistatin are poorly characterized. Membrane receptors for follistatin and inhibin are not described, although follistatin is a known binding protein for activin (Nakamura et al., 1990; Shimonaka et al., 1991). Recently, an activin receptor cDNA (type II) was cloned via expression screening of a mouse cDNA library and was reported to code for a new kind of membrane bound receptor with a predicted serine/threonine kinase domain (Mathews and Vale, 1991) showing sequence homology to the *Caenorhabditis elegans* Daf-1 gene product (Georgi et al., 1990). Human and rat activin type II receptor sequences were generated based on heterologous sequence information (Donaldson et al., 1992; Feng et al., 1993). A second type of activin receptor (type IIB) related to the type II receptor has been reported and characterized for the mouse and rat species (Attisano et al., 1992; Legerski et al., 1992). In addition, the cDNA coding for the TGF- β type II receptor has

* Corresponding author. Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRRA), Dept. of Anatomy and Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Tel. (514) 773 8521 (ext. 464). Fax (514) 773 5073.

Table 1

Oligonucleotide primer sequences used for amplification of three overlapping bActRII cDNA clones and for the generation of probes

Primers	Sequences
A	5'-TCGGAAAATGGGAGCTGCT
C	5'-GAAACCATGGCTAGAGG
E	5'-TCCGAGGAAGACCCAGGGAAC
0.5	5'-TCCTTGATTGGAGAGGGC
1	5'-TCATAGACTAGATTCTTTGGG
3.5	5'-GGGAGGCTTAGGAGTTACTG
4	5'-TTCATACAATCAGTCCTGTC

been cloned (Lin et al., 1992) and shown to belong to the same serine/threonine kinase receptor family as the activin receptors. Furthermore, several groups have recently cloned additional transmembrane serine/threonine kinase receptors including the activin type I receptor for the human, mouse and rat species (Attisano et al., 1993; ten Dijke et al., 1993; Ebner et al., 1993; He et al., 1993; Tsuchida et al., 1993), suggesting that activin signal transduction may involve a heterodimeric receptor complex between type I and II receptors. Thus activins appear to use a novel and biologically sophisticated pathway for signal transduction.

In order to better understand the mechanisms of action of activin in the bovine species, the cDNA coding for the bovine activin receptor type II (bActRII) has been cloned and sequenced. This has provided homologous molecular probes for Northern transcriptional analysis of a panel of bovine reproductive tissues.

2. Materials and methods

2.1. cDNA synthesis

Total cellular RNA from bovine prepubertal and mature bull testes was collected via the acid-phenol method (Chomczynski and Sacchi, 1987). Total RNA (5 µg) was reversed transcribed using a poly-(dT) primer (Frohman, 1990) and Moloney Leukemia virus reverse transcriptase (Pharmacia), according to the manufacturer's instructions.

2.2. Cloning of bActR type II cDNAs

Oligonucleotide primers for amplifications were designed based on sequence homologies between mouse and human activin type II receptors (Mathews and Vale, 1991; Donaldson et al., 1992) and synthesized on a Pharmacia Gene-assembler apparatus. They included the forward primers A, C and E and the reverse primers 0.5, 1 and 4 (Table 1). EcoRI restriction sites were designed at the 5' end of primers to aid in subsequent cloning steps. Polymerase chain reaction amplifications were performed on cDNA first strand using one of the forward primers in combination with one of the reverse primers in the presence of TAQ polymerase (Perkin Elmer-Cetus). The amplification strategy is presented in Fig. 1. Polymerization reactions were performed in an Ericomp thermal cycler as follows: 1 cycle of 7 min at 95°C, 5 min at 72°C, 5 min at 54°C, and 40 min at 72°C; 40 cycles of 40 s at 95°C, 1 min at 54°C and 2 min 30 s at 72°C; 1 cycle of 15 min at 72°C. Amplified bands were size fractionated on a 1% agarose gel via electrophoresis. Bands of predicted size were purified (Sephaglass Bandprep, Pharmacia), ligated into pGEM-T plasmid vector (Promega) and transformed into *E. coli* XLI-

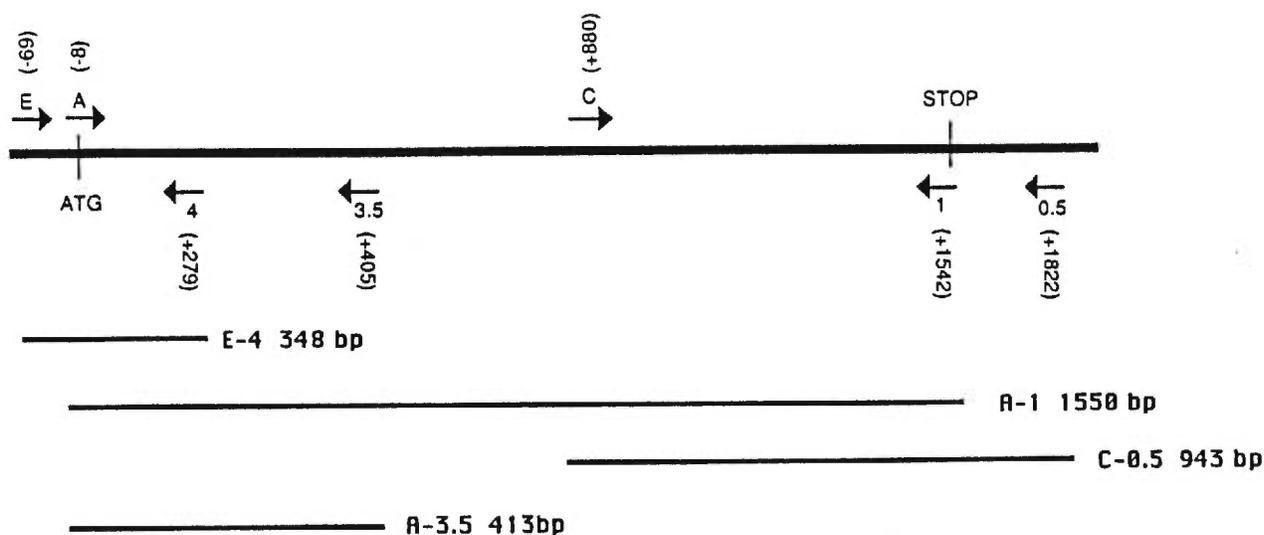


Fig. 1. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) cloning strategy for bovine activin receptor type II cDNA. Shown are the positions of the forward primers A, C and E as well as the reverse primers 0.5; 1; 3.5 and 4 relative to start codon. The numbers in parentheses indicate the 5' position of the primers relative to the ATG translational start codon. The lengths in base pairs of the three fragments obtained are indicated. Also indicated is PCR fragment A-3.5 which was used to generate a probe for Northern analysis.

Blue (Stratagene). Positive clones were identified by insert bands of predicted size on a 1% agarose gel after EcoRI digestion of mini-prep plasmid DNA (Sambrook et al., 1989).

2.3. DNA sequencing and sequence analysis

Single or double stranded DNA were used for sequencing by the di-deoxy chain termination method (Sanger et al., 1977). Both strands were sequenced using Sp6 and T7 primers as well as specific internal primers. To overcome the inherent lack of fidelity found in TAQ polymerase, three independent clones were sequenced for each amplification. Sequence comparisons were performed using MacDNASIS software (Hitachi). Hydrophobicity analysis of the deduced amino acid sequence was done according to the method of Kyte and Doolittle (1982).

2.4. Northern blot analysis

Northern transcriptional analysis was performed on multiple bovine reproductive tissues including: fetal testes (whole testes without epididymis taken from 5-month-old fetus); adolescent testes (whole testes without epididymis taken from 6-month-old bull calf); adult testes (tubule fraction); corpus luteum; gonadotropin stimulated ovaries with corpus luteum removed (mature cow treated with a single injection of 1500 U of equine chorionic gonadotropin (Equinex, Ayerst), and ovaries collected 96 h later); anterior pituitary (taken from a 6-month-old prepubertal animal); uterus (myometrium and endometrium taken from horn of uterus at 5 months of gestation); and cotyledons (fetal and maternal components taken at 5 months of gestation). Tissues were obtained from local abattoirs and represented animals of cross-bred Holstein breeds. Total RNA was recovered using the acid-phenol method (Chomczynski and Sacchi, 1987), and then further purified to poly(A)⁺ RNA using oligo(dT) attached to magnetized polystyrene beads according to the manufacturer's instructions (Dynabeads^R Oligo(dT)₂₅, Dynal Inc.). Poly(A)⁺ RNA from 300 µg of total RNA was extracted per tissue sample and size fractionated on a 0.66 M formaldehyde, 1.0% agarose gel (Sambrook et al., 1989), transferred to a nylon membrane (Hybond-N, Amersham) via capillary action using 10× SSC, and UV irradiated at 150 kJ (GS GeneLinker, BioRad). The PCR fragment A-3.5 of bActRII (see Fig. 1), representing sequences of the extracellular domain of the receptor molecule, was used to generate a radioactive probe using [α^{32} -P]-dCTP (Amersham) via the random primer method (T7 Quickprime kit, Pharmacia). The membrane was prehybridized for 4 h at 65°C in a rotating hybridization oven in prehybridizing solution consisting of 4× SET, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.2% SDS, 500 µg/ml heparin, and then hybridized overnight in fresh prehybridizing solution to which the radioactive probe and 10% dextran sulfate were added (Singh and Jones, 1984). The membrane was washed under final stringency conditions of 0.1× SSC, 0.1% SDS at 65°C before exposure for

24 h at -70°C to photographic film (XAR2, Kodak) with an intensifying screen. To standardize the amount of poly(A)⁺ RNA loaded between wells, the membrane was stripped in 0.1% SDS at 100°C for 10 min and re-hybridized with a rat GAPDH probe. Three independent Northern analysis were performed. Quantitation of the hybridization signals was performed using Collage^R software (Photodyne) on a Foto/EclipseTM image digitizing machine (Photodyne).

3. Results

3.1. Cloning of bActRII type II cDNAs

Three overlapping bActRII cDNA clones (E-4, A-1 and C-0.5) were obtained from bovine testicular RNA (Fig. 1). Clone A-1 encompasses the coding region, clone E-4 includes a part of the 5' non-coding region and the ATG initiation codon and clone C-0.5 includes the stop codon and a part of the 3' non-coding region. The nucleotide sequence presented in Fig. 2 is derived from consensus sequences of these three clones. A hydropathy profile of the deduced amino acid sequence is presented in Fig. 3. Percent homologies of nucleotide and deduced amino acid sequences between bovine and human, mouse and rat activin receptors type II are presented in Table 2 while amino acid comparisons between species are presented in Fig. 4.

3.2. Expression of activin receptor type II mRNA in bovine reproductive tissues

Northern analysis of bActRII gene transcription was performed on a panel of bovine reproductive tissues. A representative Northern blot, chosen from three independent analysis, is presented (Fig. 5A). Membranes were stripped and re-probed for GAPDH mRNA as an internal loading control (Fig. 5B). A quantitation of the three independent Northern analysis is represented in Fig. 5C. Hybridizing bands at 6 kb, 5 kb and 3 kb were observed in all male and female tissues. The major mRNA transcript in most of the tissues analysed is the 6 kb species except for the 6-month-old testes, adult testes and cotyledons where the 3 kb species is the most abundant transcript. The overall mRNA level in the fetal testicles is higher than in the immature and mature testicles.

4. Discussion

The cDNA coding for the bovine activin receptor type II has been cloned from bovine testicular RNA and consists of an open reading frame of 1539 nucleotides corresponding to a protein of 513 amino acids. Structural features are consistent with other members of the burgeoning TGF- β like receptor family (Massagué, 1992). No evidence for differential splicing was demonstrated for the bovine activin receptor type II by our PCR cloning approach, in agreement with the sequences reported for mouse, human and rat activin receptor type II (Mathews and Vale, 1991;

-18	TCCCTGCGTCTCGGGAAAATGGGAGCCGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGCTTTCTTATCTCTGTGTTCTTCAGGT	56
1	MetGlyAlaAlaAlaLysLeuAlaPheAlaValPheLeuIleSerCysSerSerGly	19
57	GCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTATTTCTATAATGCTAATTGGGAAAGAGATAGAACGAATCGC	131
19	AlaIleLeuGlyArgSerGluThrGlnGluCysIlePheTyrAsnAlaAsnTrpGluArgAspArgThrAsnArg	44
132	ACTGGTGTGAATCCTGTTACGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACATGGAAGAATATTTCTGGT	206
44	ThrGlyValGluSerCysTyrGlyAspLysAspLysArgArgHisCysPheAlaThrTrpLysAsnIleSerGly	69
207	TCCATTGAAATAGTGAAGCAAGGTGTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTATAGAAAA	281
69	SerIleGluIleValLysGlnGlyCysTrpLeuAspAspIleAsnCysTyrAspArgThrAspCysIleGluLys	94
282	AAAGATAGCCCTGAAGTATATTTTTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAACGAAAGGTTTTCTTATTTCCGGAG	356
94	LysAspSerProGluValTyrPheCysCysCysGluGlyAsnMetCysAsnGluArgPheSerTyrPheProGlu	119
357	ATGGAGGTCACACAGCCTACGTCGAATCCAGTAACCTCAAGCCTCCCTATTACAAACATCTTGCTCTATTCTTTG	431
119	MetGluValThrGlnProThrSerAsnProValThrProLysProProTyrTyrAsnIleLeuLeuTyrSerLeu	144
432	GTGCCACTTATGTTAATGGCGGGATTGTCATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGACATCATAAGATGGCTTACCCCT	506
144	ValProLeuMetLeuIleAlaGlyIleValIleCysAlaPheTrpValTyrArgHisHisLysMetAlaTyrPro	169
507	CCTGTGCTCGTTCCAACCTCAAGACCCAGGACCACCCACCTTCTCCATTACTAGGTTTGAAGCCATTACAGTTA	581
169	ProValLeuValProThrGlnAspProGlyProProProSerProLeuLeuGlyLeuLysProLeuGlnLeu	194
582	CTAGAAGTGAAAGCAAGAGGAAGATTTGGTTGTGTGTGAAAGCCCAGTTACTCAATGAATATGTGGCTGTGAAA	656
194	LeuGluValLysAlaArgGlyArgPheGlyCysValTrpLysAlaGlnLeuLeuAsnGluTyrValAlaValLys	219
657	ATATTTCCAATACAGGATAAACAGTCATGGCAGAATGAATATGAAGTCTATAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAG	731
219	IlePheProIleGlnAspLysGlnSerTrpGlnAsnGluTyrGluValTyrSerLeuProGlyMetLysHisGlu	244
732	AACATACTGCAGTTTCATTGGTGCAGAGAAACGAGGCACCAGTGTGTGATGTGGATCTMTGGCTAATCACAGCATT	806
244	AsnIleLeuGlnPheIleGlyAlaGluLysArgGlyThrSerValAspValAspLeuTrpLeuIleThrAlaPhe	269
807	CATGAAAAGGGTTCACTATCAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAATTGTGTATATTGCAGAA	881
269	HisGluLysGlySerLeuSerAspPheLeuLysAlaAsnValValSerTrpAsnGluLeuCysHisIleAlaGlu	294
882	ACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAAACCCGCCATATCT	956
294	ThrMetAlaArgGlyLeuAlaTyrLeuHisGluAspIleProGlyLeuLysAspGlyHisLysProAlaIleSer	319
957	CACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAATCTGACAGCCTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCG	1031
319	HisArgAspIleLysSerLysAsnValLeuLeuLysAsnAsnLeuThrAlaCysIleAlaAspPheGlyLeuAla	344
1032	TTGAAGTTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGTGATACTCATGGACAGGTGGGTACCCGAAGGTATATGGCTCCAGAG	1106
344	LeuLysPheGluAlaGlyLysSerAlaGlyAspThrHisGlyGlnValGlyThrArgArgTyrMetAlaProGlu	369
1107	GTGTTAGAGGGTCTATCAACTTCCAAAGGGATGCATTTTGTGAGGATAGATATGTACGCCATGGGATTAGTCTCTG	1181
369	ValLeuGluGlyAlaIleAsnPheGlnArgAspAlaPheLeuArgIleAspMetTyrAlaMetGlyLeuValLeu	394
1182	TGGGAAGTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGCTGCCATTTGAGGAAGAAATT	1256
394	TrpGluLeuAlaSerArgCysThrAlaAlaAspGlyProValAspGluTyrMetLeuProPheGluGluGluIle	419
1257	GGCCAGCATCCCTCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTAT	1331
419	GlyGlnHisProSerLeuGluAspMetGlnGluValValValHisLysLysLysArgProValLeuArgAspTyr	444
1332	TGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACGATAGAAGAATGTTGGGATCACGATGCAGAAGCCAGG	1406
444	TrpGlnLysHisAlaGlyMetAlaMetLeuCysGluThrIleGluGluCysTrpAspHisAspAlaGluAlaArg	469
1407	TTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACTCAGATGCAAAGACTAACAAATATCATTACCACAGAGGACATT	1481
469	LeuSerAlaGlyCysValGlyGluArgIleThrGlnMetGlnArgLeuThrAsnIleIleThrThrGluAspIle	494
1482	GTAACAGTGGTACGATGGTGACAAATGTTGACTTTCCCTCCCAAAGAATCTAGTCTATGATGGTTGCACCATGTG	1556
494	ValThrValValThrMetValThrAsnValAspPheProProLysGluSerSerLeu***	514
1557	TACACACTGAGAAACAGGACTCTCAACTGGAGCTGCTAATGAAACTGCTTGCAGTTTATTTTCTGTGTGAAATGA	1632
1633	GATAGGATGTGTCCTAGACGCTCAGAAAGAAGACTCTCATTTCAAATGGTGGTCTCGGAGACTT	1698

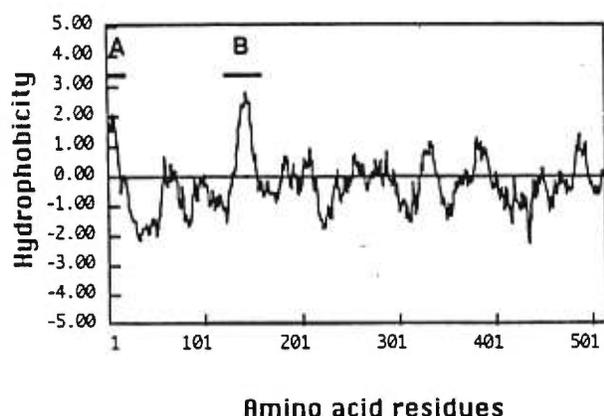


Fig. 3. Hydrophobicity analysis of the deduced amino acid sequence of bovine activin receptor type II. This Kyte-Doolittle plot was produced using a 15 residue window. The hydrophobic signal peptide is designated by the bar 'A', while the putative transmembrane domain is designated by the bar 'B'.

Donaldson et al., 1992; Feng et al., 1993). This is in contrast to activin receptor type IIB in the bovine (unpublished data) and mouse species where differential splicing of mRNA is a dominant feature (Attisano et al., 1992).

Bovine ActRII sequences, both at the nucleotide and deduced amino acid level, are highly homologous with the published human, mouse and rat activin receptor type II sequences. Interestingly, almost all the differences in amino acid residues between species occur in the putative extracellular ligand-binding domain (Fig. 4). Six changes were conservative and only one was non-conservative, the latter being Arg-44 in the bovine versus Gln-44 in the other species. No difference in the amino acid sequence within the cytoplasmic kinase domain was observed among all species examined except for the rat (Ile-218 in the rat versus Val-218 in the other species; Fig. 4). Thus, the sequences of the 12 subdomains defining a protein kinase (Hanks et al., 1988) were highly conserved between species including the consensus sequences in subdomains VIB and VIII used to predict serine/threonine substrate specificity (Asp-322 to Asn-327 for subdomain VIB and Gly-360 to Glu-369 for subdomain VIII; Mathews and Vale, 1991; Hanks et al., 1988).

The hydrophathy analysis of the deduced amino acid sequence of bovine activin receptor type II (Fig. 3) reveals a hydrophobic signal peptide of 19 amino acid residues, a hydrophilic extracellular domain of 116 amino acid residues, a hydrophobic membrane spanning region of 26 amino acid residues, and a hydrophilic intracellular domain of 352 amino acid residues. This profile is highly similar to

Table 2

Homology comparison between bActR type II and activin type II receptors of other species

Bovine activin receptor II	Nucleic acid (%)	Amino acid (%)
Human	94.9	98.6
Mouse	93.5	99.0
Rat	92.9	98.8

that reported for the mouse (Mathews and Vale, 1991), as would be predicted by the sequence conservation between these species. All 19 cysteine residues as well as all potential sites of N-linked glycosylation are conserved among the reported species (Fig. 4).

Numerous studies have indicated that activin receptors, follistatin and inhibin subunit α and β genes are co-expressed in the rat ovary (Woodruff et al., 1988; Shimasaki et al., 1989; Feng et al., 1993) suggesting that activins may play a paracrine and/or autocrine role in the female and male gonads (Findlay, 1993; Camaron et al., 1994). Northern transcriptional analysis of bovine ActRII gene on a panel of reproductive tissues revealed expression in testicles, ovaries, corpus luteum, cotyledons, uterus and pituitary. The differential mRNA steady state levels seen among tissues suggest that levels of bActRII gene expression are regulated. As reported in the mouse and rat species (Mathews and Vale, 1991; Feng et al., 1993), RNA bands of approximately 6 and 3 kb were observed; in addition, a novel 5 kb band was seen that has not been reported in other species. The biological significance of these different mRNA species is not understood although in theory they could each code for full length protein. At present, multiple transcriptional starts or polyadenylation sites have not been described for the ActRII transcripts of other species. In addition, differential splicing of mRNA species, a feature of the ActRIIB mRNA, has not been seen for the ActRII mRNA. A reasonable explanation for the different RNA transcripts seen on Northern analysis is that they represent different stages of RNA processing and maturation.

Interestingly, a higher bActRII transcriptional signal was observed in fetal testicles than in 6-month-old testicles and adult testicles, supporting the idea that the steady state level of bActRII gene expression is developmentally regulated in these tissues. This is consistent with reports in the rat (DeWinter et al., 1992; Feng et al., 1993) where the expression of the ActRII gene in testes is developmentally regulated. This could be indicative of a lower response to activins in the mature testes or a shift in the receptor types with testicular maturity.

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the bovine activin receptor type II cDNA. For numbering the nucleotide sequence, the A of the ATG translational start codon is designated +1; for numbering the amino acid sequence, the Met corresponding to the translational start codon is designated +1. The translational stop codon is marked by the symbol ***. The nucleotide sequences corresponding to the putative leader peptide sequence as well as the transmembrane domain are underlined.

	10	20	30	40	50
bActRII aa	<u>MGAAAKLAPA</u>	<u>VLISSCSGA</u>	ILGRSETQEC	IFYNANWERD	RTNRTGVESC
mActRII aa			L F		Q P
rActRII aa			L F		Q P
hActRII aa			L F	K	Q P
	60	70	80	90	100
bActRII aa	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CIEKKDSPEV
mActRII aa					
rActRII aa					
hActRII aa				V	
	110	120	130	140	150
bActRII aa	YFCCCEGNMC	NERFSYFP	EVTQPTS	TPKPPY	<u>NIL LYS</u>
mActRII aa		K			
rActRII aa		K			
hActRII aa		K			
	160	170	180	190	200
bActRII aa	<u>AGIVICAFWV</u>	YRHHKMAYPP	VLVPTQDPGP	PPPSPLLGLK	PLQLLEVkar
mActRII aa					
rActRII aa					
hActRII aa					
	210	220	230	240	250
bActRII aa	GRFGCVWKAQ	LLNEYVAVKI	FPIQDKQSWQ	NEYEVYSLPG	MKHENILQFI
mActRII aa					
rActRII aa		I			
hActRII aa					
	260	270	280	290	300
bActRII aa	GAEKRGTSVD	VDLWLITAFH	EKGSLSDFLK	ANVVSWNELC	HIAETMARGL
mActRII aa					
rActRII aa					
hActRII aa					
	310	320	330	340	350
bActRII aa	AYLHEDIPGL	KDGHKPAISH	RDIKSKNVLL	<u>KNNLTACIAD</u>	FGLALKFEAG
mActRII aa					
rActRII aa					
hActRII aa					
	360	370	380	390	400
bActRII aa	KSAGDTHGQV	GTRRYMAPEV	LEGAINFQRD	AFLRIDMYAM	GLVLWELASR
mActRII aa					
rActRII aa					
hActRII aa					
	410	420	430	440	450
bActRII aa	CTAADGPVDE	YMLPFEEEIG	QHPSLEDMQE	VVHKKRKPV	LRDYWQKHAG
mActRII aa					
rActRII aa					
hActRII aa					
	460	470	480	490	500
bActRII aa	MAMLCETIEE	CWDHDAEARL	SAGCVGERIT	QMQRLTNIIT	TEDIVTVVTM
mActRII aa					
rActRII aa					
hActRII aa					
	510	513			
bActRII aa	VTNVD	FPPKE	SSL*		
mActRII aa					
rActRII aa					
hActRII aa					

Fig. 4. Comparison of activin receptor type II amino acid sequences between species (bovine, mouse, rat and human). The differences in the mouse and human sequences are indicated under the bovine sequence. Coding sequences for the putative signal peptide and transmembrane region are underlined. The potential N-linked glycosylation sites are overlined. The kinase domain is delimited by arrows.

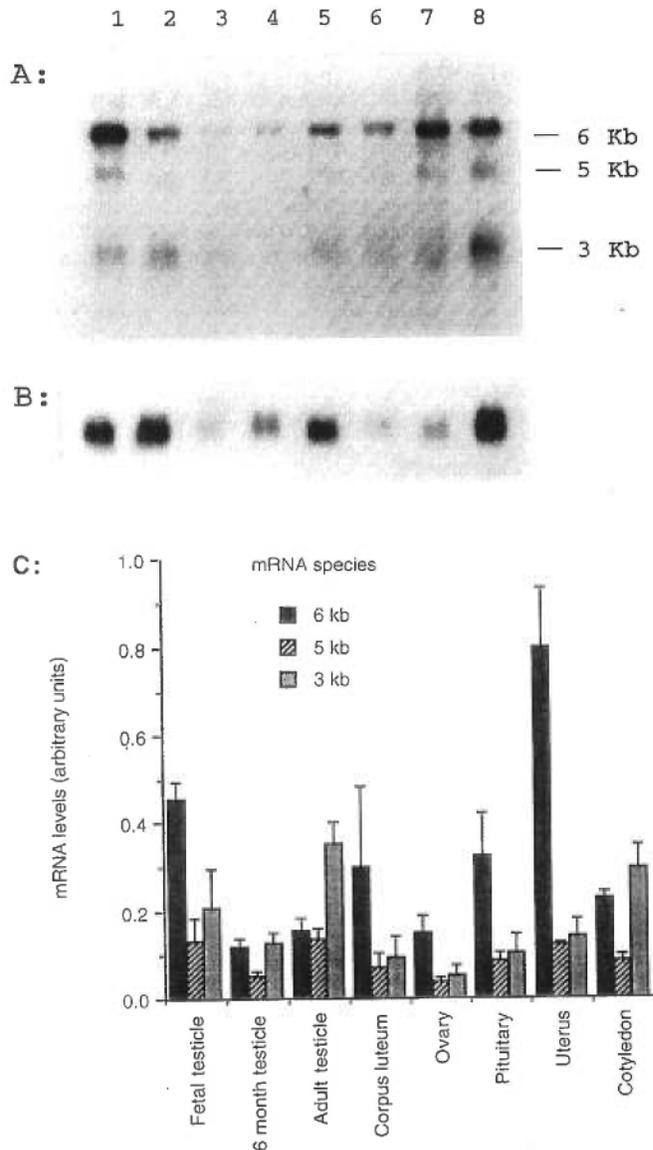


Fig. 5. (A) Northern blot analysis of bovine activin receptor type II mRNA expression. Bovine tissue samples include: fetal testicles (lane 1); immature testicles (6 months old, lane 2); mature testicles (lane 3); corpus luteum (lane 4); gonadotropin stimulated ovary (lane 5); anterior pituitary (lane 6); uterus (lane 7); and cotyledons (lane 8). Transcript sizes of 6 kb, 5 kb and 3 kb are indicated. This autoradiograph is representative of three independent experiments. (B) Levels of GAPDH mRNA expression, as an internal sample loading control. (C) Quantitation of bActRII mRNA levels in different reproductive tissues. The tissue samples are the same as in (A). The legend for the different mRNA species is shown at the right. Data were normalized for GAPDH mRNA level. The results represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

Bovine ovaries express all three sizes of bActRII mRNA species seen in the testes. Comments on possible regulation of bActRII gene expression during folliculogenesis must await more detailed analysis. Recently, Feng et al. (1993) have demonstrated that rat ActR type II (as well as type IIB) gene expression did not change during ovarian maturation. This lack of modulation of ActRII gene expression

during folliculogenesis is in marked contrast with transcripts such as follistatin and the inhibin α and β subunits, which display differential levels of ovarian expression dependent on the stage of the estrous cycle (Woodruff et al., 1988; Shimasaki et al., 1989; Houde et al., 1994). Thus, the functional control of activin activity during folliculogenesis may not reside at the level of transcription of the activin receptor type II gene but rather at the post-translational level in the form of activin-binding proteins such as follistatin (Nakamura et al., 1990; Shimonaka et al., 1991) whose gene expression is both tissue defined and hormonally responsive (Findlay, 1993; Houde et al., 1994). In addition, it is now apparent that activin activity may be modulated at the membrane receptor level via an interaction between activin receptors type I and type II in heteromeric receptor complexes (Attisano et al., 1993; Tsuchida et al., 1993). Interpretation of physiological data in this field will now have to consider these possibilities. The bovine activin receptor type II cDNA sequence will be useful for future transcriptional studies of activin related gene expression in this species.

References

- Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F.M.B., Massagué, J. and Wrana, J.L. (1993) *Cell* 75, 671–680.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Cheifetz, S. and Massagué, J. (1992) *Cell* 68, 97–108.
- Camaron, V.A., Nishimura, E., Mathews, L.S., Lewis, A., Sawchenko, P.E. and Vale, W.W. (1994) *Endocrinology* 134, 799–808.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- DePaolo, L.V., Bicsak, T.A., Erickson, G.F., Shimasaki, S. and Ling, N. (1991) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198, 500–512.
- DeWinter, J.P., Themmen, A.P.N., Hoogerbrugge, J.W., Klaij, I.A., Grootegoed, J.A. and DeJong, F.H. (1992) *Mol. Cell. Endocrinol.* 83, R1–R8.
- Donaldson, C.J., Mathews, L.S. and Vale, W.W. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 310–316.
- Ebner, R., Chen, R.-H., Shum, L., Lawler, S., Zioncheck, T.F., Lee, A., Lopez, A.R. and Derynck, R. (1993) *Science* 260, 1344–1348.
- Feng, Z.-M., Madigan, M.B. and Chen, C.-L.C. (1993) *Endocrinology* 132, 2593–2600.
- Findlay, J.K. (1993) *Biol. Reprod.* 48, 15–23.
- Frohman, M.A. (1990) in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sinsky, J.J. and White, J.J., eds.), pp. 28–38, Academic Press, San Diego, CA.
- Georgi, L.L., Albert, P.S. and Riddle, D.L. (1990) *Cell* 61, 635–645.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988) *Science* 241, 42–52.
- Hasegawa, Y., Miyamoto, K., Abe, Y., Nakamura, T., Sugino, H., Eto, Y., Shibai, H. and Igarashi, M. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 668–674.
- He, W.W., Gustafson, M.L., Hirobe, S. and Donahoe, P.K. (1993) *Dev. Dyn.* 196, 133–142.
- Houde, A., Ethier, J.-F., Gagnon, C., Lussier, J.G. and Silversides, D.W. (1994) *Mol. Reprod. Dev.* 37, 391–397.
- Hutchinson, L.A., Findlay, J.K., de Vos, F.L. and Robertson, D.M. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146, 1405–1412.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- LaPolt, P.S., Soto, D., Su, J.-G., Campen, C.A., Vaughan, J., Vale, W.W. and Hsueh, A.J.W. (1989) *Mol. Endocrinol.* 3, 1666–1673.
- Legerski, R., Zhou, X., Dresback, J., Eberspaecher, H., McKinney, S., Segarini, P. and Crombrugge, B. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 672–679.

- Ling, N., DePaolo, L.V., Bicsak, T.A. and Shimasaki, S. (1990) *Clin. Obstet. Gynecol.* 33, 690-702.
- Lin, H.Y., Wang, X-F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A. and Lodish, H.F. (1992) *Cell* 68, 775-785.
- Lin, T., Calkins, J.H., Morris, P.L., Vale, W. and Bardin, C.W. (1989) *Endocrinology* 125, 2134-2140.
- Massagué, J. (1992) *Cell* 69, 1067-1070.
- Mather, J.P., Attie, K.M., Woodruff, T.K., Rice, G.C. and Phillips, D.M. (1990) *Endocrinology* 127, 3206-3214.
- Mathews, L.S. and Vale, W.W. (1991) *Cell* 65, 973-982.
- Mauduit, C., Chauvin, M.A., de Peretti, E., Morera, A.M. and Benahmed, M. (1991) *Biol. Reprod.* 45, 101-109.
- Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K. and Sugino, H. (1990) *Science* 247, 836-838.
- Petraglia, F., Vaughan, J. and Vale, W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5114-5117.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Shimasaki, S., Koga, M., Buscaglia, M.L., Simmons, D.M., Bicsak, T.A. and Ling, N. (1989) *Mol. Endocrinol.* 3, 651-659.
- Shimonaka, M., Inouye, S., Shimasaki, S. and Ling, N. (1991) *Endocrinology* 128, 3313-3315.
- Singh, L. and Jones, K.W. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 5627-5638.
- Sugino, H., Nakamura, T., Hasegawa, Y., Miyamoto, K., Abe, Y., Igarashi, M., Eto, Y., Shibai, H. and Titani, K. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 281-288.
- ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzen, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C.-H. and Miyazono, K. (1993) *Oncogene* 8, 2879-2887.
- Tsuchida, K., Mathews, L.S. and Vale, W.W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11242-11246.
- Vale, W., Hsueh, A., Rivier, C. and Yu, J. (1990) in *Peptide Growth Factors and their Receptors: A Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 95 (M.A. Sporn and A.B. Roberts, eds.), pp. 211-248, Springer-Verlag, Berlin.
- Woodruff, T.K., D'Agostino, J., Schwartz, N.B. and Mayo, K.E. (1988) *Science* 239, 1296-1299.

CHAPITRE 3

3.1 ARTICLE 2: BOVINE ACTIVIN RECEPTOR TYPE IIB MRNA DISPLAYS ALTERNATIVE SPLICING INVOLVING A SEQUENCE HOMOLOGOUS TO SH3 BINDING SITES

Accepté pour publication dans la revue "Endocrinology"

Bovine activin receptor type IIB mRNA displays alternative splicing
involving a sequence homologous to SH3 binding sites

Jean-François Ethier, Jacques G. Lussier, and David W. Silversides

Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRA),
Department of Veterinary Biomedicine, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Montreal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Corresponding address: Dr. David W. Silversides, Centre de Recherche en
Reproduction Animale (CRRA), Department of Veterinary Biomedicine,
Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, P.O. Box 5000, St-
Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Tel.(514) 773-8521 (ext.8464). Fax (514) 773-8103.

e-mail: silverdw@ere.umontreal.ca

Running title: Identification of a novel ActRIIB splicing variant.

Genbank accession numbers. for the nucleotide sequences reported in this
article: U57707; U57706; U57705

ABSTRACT

Activins are implicated in a variety of biological effects, particularly in reproductive processes such as embryonic development and folliculogenesis. Breakthroughs in the elucidation of the activin signal transduction mechanism were achieved with the characterization of the activin receptors and the recent identification of cytoplasmic factors apparently involved in the signaling process. The present studies were undertaken to further analyze the activin signaling pathway. The cDNA coding for the bovine activin receptor type IIB (bActRIIB) was amplified by RT-PCR from corpus luteum and pituitary RNA, and cloned so as to characterize its role in activin signal transduction. Two cDNA isoforms (bActRIIB₂ and bActRIIB₅) were detected, coding respectively for 512 amino acids and 498 amino acids. The shortest isoform lacked a sequence encoding a 14 amino acid stretch very rich in proline residues, located between the transmembrane region and the intracellular kinase domain. Intron sequencing and ribonuclease protection assay have demonstrated that alternative splicing is responsible for the generation of these bActRIIB isoforms. This alternative splicing event is unique in that it has not been observed in other species including the mouse, where extensive alternative splicing of the ActRIIB mRNA is described. Comparison of this alternative sequence with other known proline-rich sequences showed that it has characteristics of a SH3 binding site. Coprecipitation experiments have identified two proteins of 69 kDa and 71 kDa from an uterine endometrial cell line, specifically interacting with the short bActRIIB alternative proline-rich sequence. These results suggest that bActRIIB could have a protein-protein interaction, through its putative SH3 binding site, with at least two intracellular SH3-containing proteins.

INTRODUCTION

Activins are dimeric proteins of disulfide-linked inhibin β subunits and belong, by their similarity in structure, to the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily [1]. Activins were initially thought to fulfill their functions exclusively in the ovarian-pituitary axis, but subsequently they have been shown to have a variety of biological activities in many cell types such as mesoderm induction, hormonogenesis, apoptosis, cellular differentiation, proliferation and antiproliferation [2, 3, 4]. In regard to this, Woodruff and Mather [4] proposed to classify the activins as "multicrine" agents since they were reported as paracrine/autocrine hormones as well as growth and differentiation factors and cytokines.

Appreciable progress has recently been made in the elucidation of the activin signaling mechanism by functional characterization of activin cell surface receptors. To date, four types of activin receptors have been identified by virtue of their capacity to bind activins and be chemically cross-linked to ^{125}I -activin. They were named activin receptor type I (ActRI) [5, 6, 7], activin receptor type IB (ActRIB) [8], activin receptor type II (ActRII) [9, 10, 11, 12] and activin receptor type IIB (ActRIIB) [13, 14, 15, 16], and their corresponding cDNA have been cloned from several species. In addition, several other type I receptors (ALK-1 or TSR1, ALK-5 and ALK-6) have been cloned that could bind either activin or TGF- β in presence of the respective type II receptor [5, 17].

Analysis of the amino acid sequences showed that all four types of activin receptors cloned to date belong to the new family of serine/threonine kinase membrane bound receptor, which also includes receptors for other TGF- β related factors such as bone morphogenetic proteins (BMP), Müllerian inhibiting substance (MIS) and TGF- β [18].

Several studies suggest that activin signal transduction requires the formation of a heteromeric complex between type I and type II receptors [reviewed in 19] and possibly a type III receptor [20]. Similar to what it was shown in the TGF- β receptor system [18], type II activin receptors bind activin with high affinity when expressed alone in COS cells but type I activin receptors bind activin only when one of the activin type II receptors is coexpressed [5, 7, 21]. Furthermore, studies on the ActRIB/ActRIIB complex suggest that activin type II receptor kinase activity is necessary to phosphorylate type I receptors upon activin binding. It was further shown that an ActRIB mutant with a constitutively active kinase expressed alone is sufficient to generate intracellular signaling in absence of activin, suggesting that ActRIB acts downstream of type II receptors in the activin signal transduction [22, 23].

It has been shown by several reports that some serine/threonine kinase receptors are somewhat promiscuous with respect to their ligand partner. Until recently, it was thought that the specificity of ligand binding was dependent on the type II receptor present in the heteromeric receptor complex since type I receptors could be shared by different type II serine/threonine kinase receptors. For example, ActRI can bind activin, TGF- β or BMP-7 in presence of the respective type II receptor [17, 21, 24]. However, it now

appears that ligand binding to type II receptors is not stringently specific since it has been demonstrated that ActRIIB is also a functional BMP-2 [25] and BMP-7 [26] type II receptor while ActRII can be a BMP-7 type II receptor as well as a growth/differentiation factor-5 type II receptor [27].

A breakthrough in the characterization of the signaling pathway of the TGF- β related proteins have been made by the identification of cytoplasmic proteins potentially involved in signaling. Some reports suggest that p21^{ras} could be involved in the activin and TGF- β signaling pathways [28, 29]. In correlation with this, the α subunit of p21^{ras}farnesyltransferase (FNTA) was shown to interact directly with ligand free ActRIIB as well as with the TGF- β type I receptor (T β RI) [30, 31]. FNTA is released upon ligand-induced phosphorylation of the type I receptor by the type II receptor [30]. However, its function in the signal transduction is still unknown. Another intracellular factor, the immunophilin FKBP-12, is a common binding protein of type I receptors and seems to function in the inhibition of the signaling pathways of the TGF- β family ligands [32]. Although no direct evidence was provided, it was further suggested that calcineurin, which is a serine/threonine phosphatase known to bind FKBP12, could be the direct cytoplasmic inhibitor of type I receptors by keeping them or their bound substrates hypophosphorylated [32].

Until now, the only cytoplasmic factor known to interact with a type II serine/threonine kinase receptor is a WD-domain protein, named TGF- β -receptor interacting protein-1 (TRIP1), which associates with the TGF- β type II receptor (T β RII) [33]. Finally, several MAD (Mothers against decapentaplegic)-related proteins have been identified as a new class of

signaling molecules with nuclear functions that mediate responses to members of the TGF- β family [25, 34, 35, 36, 37].

The present study was carried out in order to better understand the role of ActRIIB in the activin signal transduction mechanism in the reproductive axis. It has been demonstrated that activins are involved in many aspects of reproduction [4, 38]. Until now, it has been shown that ActRIIB mRNA can be alternatively spliced to give four different isoforms in the mouse [13] but not in other species, such as rat and human [14, 16]. Here we report that the bovine ActRIIB mRNA can be processed differently from its mouse homologue and that an intracellular sequence coding for a 14 amino acid stretch very rich in proline residues can be alternatively spliced. We demonstrate that this proline-rich sequence, which resembles that of Src-homology 3 domain (SH3) binding sites, interacts specifically with two proteins of 69 kDa and 71 kDa from an uterine endometrial cell line. This suggests a potential role in activin signal transduction for these proteins and a protein-protein interaction with bActRIIB via an SH3 domain interaction. It also suggests that this interaction could be regulated by alternative splicing of bActRIIB mRNA.

MATERIALS AND METHODS

RNA isolation

Bovine corpus lutea and pituitaries were obtained from a local slaughterhouse. Total RNA was prepared as already described [12] by the acid-phenol method. Isolation of poly(A)⁺ was performed with oligo(dT)₂₅ coupled to magnetic beads (Dynabeads Oligo(dT)₂₅, Dynal).

First strand cDNA synthesis

All cDNAs used were made from corpus lutea RNA except for the amplified fragment F-dT which was from pituitary RNA. First strand cDNA was primed with an oligo-(dT)₁₇ or a specific primer based on mouse and rat ActRIIB sequences, and synthesized using Superscript II (Life technologies) according to the manufacturer's instructions.

RT-PCR amplification of bActRIIB cDNAs

The cloning strategy used four PCR amplifications of different overlapping products and one 5'RACE described below. The following sense primers: bActRIIB.A (5'-GGGAATTCTTTGTGGCTGTGAAGATCTT), bActRIIB.E (5'-GAATTCTACTACAACGCCAACTGG) and antisense primers: bActRIIB.1 (5'-GGGAATTCATTCTTGCTTTTGAAGTCCCT), bActRIIB.3 (5'-GAATTCAGATCCACTGAGTCTGG) were designed based on sequence homologies between mouse and rat ActRIIB sequences. The sense primers bActRIIB.B (5'-GAATTCACGTGGCAGAGACGATGTCTA)

and bActRIIB.F (5'-TCCAGAGAGACGCCTTTCTG), and the antisense primer bActRIIB.2 (5'-GAATTCTGGAGCCTCGCTTCTCAGCG) were bovine specific. As indicated in the primer sequences, EcoRI restriction sites were added at the 5'end of primers to aid in subsequent cloning steps. Polymerization reactions were performed in an Ericomp thermal cycler in the presence of 2.5 U of Taq polymerase (Perkin Elmer). The amplification conditions with primers pairs bActRIIB.A and bActRIIB.1; bActRIIB.E and bActRIIB.2; bActRIIB.B and bActRIIB.3 were 1 cycle of: 95°C for 3 min, 58°C for 2 min, 72°C for 3 min; and 45 cycles of: 95°C for 55 sec, 58°C for 55 sec, 72°C for 1 min. The amplification of bActRIIB cDNA 3'end was done in a 3 step procedure. First of all, amplification with bActRIIB.A and poly(dT)₁₇ was performed (1 cycle of: 94°C for 45 sec, 40°C for 45 sec, 72°C for 90 sec; and 35 cycles of 94°C for 45 sec, 52°C for 45 sec, 72°C for 90 sec) followed by two nested PCR amplifications (40 cycles of 94°C for 45 sec, 56°C for 45 sec, 72°C for 90 sec), using primers bActRIIB.B and bActRIIB.F successively in conjunction with poly(dT)₁₇, in order to amplify the specific 3'end.

5'-RACE

Amplification of the 5'-end was done using the SLIC strategy [39] in conjunction with the use of the nucleotide analogue 7-deaza-2'deoxyguanosine (c⁷dGTP; Pharmacia) in the PCR reaction [40]. Briefly, first strand cDNA primed with a bActRIIB specific biotinylated primer (bActRIIB.5(Bt): 5'-TTCTTGACGAGCTCGATGGTG) was synthesized. RNA was then hydrolyzed with 0.4 N NaOH at 65°C for 30 min. After neutralization with 0.4 N HCl, the first strand cDNA was purified using Geno-bind resin

(Clontech) in order to eliminate non-incorporated biotinylated primers. The biotinylated cDNA was further purified by capturing it on magnetic beads coupled with streptavidin (Dynabeads M-280, Dynal). Eight pmol of a modified oligonucleotide (Anchor seq.V3; 5'-GCAGGATCCTGAAGCTTGAATTC, with a phosphate group added to the 5'-end, as well as a 3'-end blocked with an amino group) was incubated 20 hours at room temperature with 2.5 μ l of single-stranded cDNA and 10 U of T4 RNA ligase (New England Biolabs) in the hexamine cobalt chloride buffer as previously described [39]. PCR amplification (1 cycle of 95°C for 5 min, 56°C for 2 min and 72°C for 3 min; followed by 45 cycles of 95°C for 55 sec, 56°C for 55 sec and 72°C for 1 min) was performed using a bActRIIB specific nested primer (bActRIIB.5,5; 5'-GAATCCGATGGTGCCCGAGCTGTT) and a primer complementary to the ligated oligonucleotide (Anchor Primer V3; 5'-GAATTCAAGCTTCAGGATCCTGC) in the presence of 2.5 U of Taq polymerase and 2 μ l of a 3:1 c^7 dGTP:dGTP mixture (50 μ M each dATP, dCTP, dTTP; 12.5 μ M dGTP and 37.5 μ M c^7 dGTP). To reduce the probability of non-specific amplifications, a nested-PCR was performed with bActRIIB.6 (5'-GAATTCTAGCAGTGCAGCCGCTTGT) as follows: 35 cycles of 95°C for 55 sec, 57°C for 55 sec and 72°C for 1 min.

Cloning and sequencing

PCR cDNA products were cloned into pGEM-T vector (Promega). Double stranded DNA were sequenced by the di-deoxy chain termination method using the T7 sequencing kit (Pharmacia). The G+C rich clone bActRIIB.6-V3 was sequenced by cycle sequencing for G+C rich template (UCDNA sequencing services, University of Calgary) in order to resolve band

compression. Three independent clones were sequenced for each amplification to overcome the lack of fidelity inherent to Taq polymerase.

PCR amplification of genomic bActRIIB sequence

Bovine genomic DNA was isolated from bull white blood cells by standard methods [41]. PCR amplification of the genomic sequence corresponding to the intracellular spliced region was performed using sense primer H (5'-GGATCCCGACATCGCAAGCCCCCTAC; with a 5' BamHI restriction site) and antisense primer 4 (5'-GAATTCTCGTGCTTCATGCCA GGC; with a 5' EcoRI restriction site). Primer H was located just 3' to the transmembrane region while primer 4 was located in the first part of the kinase domain (Fig.5 A). H-4 PCR amplification was carried out on 100 ng of genomic DNA with 2.5 U of PFU polymerase (Stratagene) and the resulting fragment was cloned into pCR-Script SK (Stratagene) and sequenced.

Northern analysis

Northern analysis on poly(A)⁺ RNA extracted from 300 µg of total RNA of different tissues of reproductive interest were performed as described previously [12]. The hybridizing probe used represented the entire extracellular domain of the bActRIIB receptor which is the less conserved domain between the different activin receptor types. The membrane was exposed to X-ray film for 1 week at -70°C. The membrane was stripped and reprobed with a rat glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) probe.

Synthesis of complementary RNA probes

Fragment K-11, containing both the proline-rich sequence and the following exon was amplified by PCR from the genomic clone H-4 (Fig.5 A) and cloned into pCR-Script. After linearization of the DNA template, antisense riboprobe was transcribed from the flanking T7 promoter in the presence of 0.5 mM each of ATP, CTP and GTP; 5 μ M UTP; 50 μ Ci [α -³²P]UTP; 20 U T7 RNA polymerase; 16.5 U RNase inhibitor; 10 mM dithiothreitol; and 1X transcription buffer (Promega) in a total volume of 20 μ l. After 1h at 37°C, 20 U of Rnase-free DNaseI were added. The resulting riboprobe was not gel-purified and was diluted in 0.5 M ammonium acetate; 1 mM EDTA; 0.2% SDS prior to hybridization.

The resulting 232 nucleotide (nt) antisense riboprobe was complementary to the alternative proline-rich coding sequence (42 nt) and to the next exon (102 nt). Therefore, the predicted size of the riboprobe protected by bActRIIB mRNA containing the alternative sequence would be of 144 nt, while a bActRIIB mRNA without this alternative sequence should give a 102 nt protected fragment.

Ribonuclease protection assay

RNase protection assay was carried out using the RPA II kit (Ambion) with slight modifications to the manufacturer's protocol. Antisense riboprobe at 1×10^5 cpm and 10 μ g of poly (A)⁺ RNA were ethanol coprecipitated and dissolved in 20 μ l of hybridization buffer (80% formamide; 100 mM sodium citrate pH 6.4; 300 mM sodium acetate pH 6.4; 1 mM EDTA). The samples

were heated at 95°C for 5 min and incubated at 43°C overnight. Digestion of unhybridized RNA was performed with 2.5 U of RNase A and 100 U of RNase T1 for 30 min at 37°C. RNA-RNA hybrids were precipitated with 200 µl ethanol and 300 µl of RNase inactivation/precipitation mixture supplied by the manufacturer and dissolved in 8 µl of non-denaturing gel loading buffer (8% sucrose; 0.025% bromophenol Blue; 0.025% Xylene cyanol). Protected fragments were directly loaded, without previous heating, on a non-denaturing 5% polyacrylamide gel and separated for 3h at 100 V. The gel was dried and exposed to X-ray film for 2 weeks.

Expression and purification of fusion proteins

The fusion protein pGEX-IIBSH3b.s. was constructed by using two complementary oligonucleotides representing the short alternative bActRIIB sequence of 42 bp, with BamHI and EcoRI cohesive ends at the 5'ends of the sense and antisense strands respectively. Complementary oligonucleotides (5 ng) were mixed and boiled for 2 min and then cooled slowly at room temperature for allowing them to anneal. The DNA fragments were ligated directly into pGEX-4T-1 digested with EcoRI and BamHI, which allows the expression of fusion proteins with the glutathione S-transferase (GST). The recombinant plasmid was sequenced to verify sequence integrity.

The GST and GST-IIBSH3b.s. fusion protein were expressed in 200-ml cultures of *E.coli* BL-21 induced with 0.1 mM isopropyl-1-thio-β-galactopyranoside (IPTG) when the culture had reached an A_{600nm} of 1. After a 4 h incubation at 37°C, the cells were centrifuged and dispersed in 10 ml of PBS 1X (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄,

pH 7.3). The cells were sonicated and Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. The solution was then agitated gently for 30 min. The GST and the fusion protein were purified on glutathione-sepharose 4B and eluted in elution buffer (10 mM reduced glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0).

Preparation of metabolically radiolabeled proteins.

Endo 8.3 cells, which is a bovine uterine endometrial cell line immortalized with SV40 large T antigen sequences [42], were incubated in a 75 cm² tissue culture dishes to 90% confluency in DMEM + 10% fetal calf serum. Cells were washed twice with 10 ml of long-term labeling medium (9 vol. methionine and cysteine free DMEM; 1 vol. complete DMEM; 10% fetal calf serum). The cells were then incubated overnight in presence of 100 µCi ³⁵S-methionine and ³⁵S-cysteine (Expre³⁵S³⁵S, Dupont)/ml of long-term labeling medium. One ml of RIPA buffer (58 mM NaCl; 5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 7.2; 0.1% SDS; 1% sodium deoxycholate; 1% Triton X-100) was used to lyse the cells at 4°C for 30 min. After pelleting the cells at 28 000 X g, the protein concentration of the lysate was estimated by a Bradford test (Bio-Rad).

Coprecipitation

Preclearing of 0.5 mg of radiolabeled proteins was done for each reaction by incubation with 50 µg of GST and 50 µl of a 50% slurry of glutathione sepharose 4B at 4°C for 2 h. After centrifugation at 500 X g for 5 min, the supernatant was mixed with 30 µg of GST or GST-IIBSH3b.s. and

50% slurry of glutathione sepharose 4B at 4°C for 4 h. The sepharose bound proteins were washed four times with 500 µl of RIPA buffer and the coprecipitated proteins were eluted by an overnight thrombin cleavage of the GST moiety at room temperature. The samples were fractionated on 10% SDS-PAGE and the gel was dried and exposed overnight to autoradiographic film.

RESULTS

Cloning of bActRIIB cDNA

The cloning strategy for bovine ActRIIB cDNA is represented in Figure 1. Clones bActRIIB.E-2, bActRIIB.A-1, and bActRIIB.B-3 represent the majority of the coding region and part of the 3'untranslated region (3'UTR). The complete 3'UTR is represented by clone bActRIIB.F-dT. The bActRIIB cDNA consensus sequence and its predicted amino acid sequence (Fig.2) were determined from these overlapping clones. The region around the ATG initiation codon was found to be rich in guanosine and cytosine bases and this reduced the efficiency of amplification of the Taq polymerase in a standard PCR reaction. 5'-RACE amplification incorporating the structure-destabilizing base analog c^7dGTP proved useful during the PCR step in resolving this sequence.

The longest open reading frame coding for the bovine activin type IIB receptor consists of 1536 nucleotides, corresponding to a protein of 512 amino acids. This sequence is highly homologous to other ActRIIB protein sequences reported in the rat and human species as well as with the murine ActRIIB₂ isoform.

Expression of activin type IIB receptor mRNA in bovine reproductive tissues

Northern analysis of bActRIIB gene expression showed two major transcripts of 2 kb and 2.3 kb in all reproductive tissues analyzed (Fig.3). A

very weak 10 kb hybridization signal is also observed. A differential ratio of expression of the 2 kb and 2.3 kb species can be seen within these tissues. The 2 kb species is the most abundant in the majority of the tissues except for the prepubertal testicles where both species are present in equal intensity and for the cotyledons where the 2.3 kb is the most abundant bActRIIB mRNA species. The 2 kb transcript correlates well with the 1833 bp of cloned cDNA, suggesting that the sequence shown in Figure 2 represents a nearly full length cDNA. The biological significance of the 2.3 kb transcript is not understood but it may simply represent an intermediate stage of RNA processing or a more distal 3' site of polyadenylation.

Alternative splicing events

Sequencing of different clones corresponding to the bActRIIB.E-2 amplification underscored a cDNA heterogeneity in the region located between the transmembrane region and the putative serine/threonine kinase domain. Most of the clones lacked a 42 bp segment between nucleotides 522 and 565 of the bActRIIB sequence (Fig.2). However, the corresponding region is always present in the ActRIIB cDNA cloned from other species [14, 15, 16] and even in the mouse where the ActRIIB gene can generate four different activin receptor isoforms through mRNA alternative splicing [13]. The deleted segment was contiguous to the alternatively spliced segment located in the cytoplasmic juxtamembrane domain reported in the mouse, but ended before the kinase domain. This deletion caused the loss of a 14 amino acid stretch very rich in proline without altering the reading frame coding for the bActRIIB deduced amino acid sequence. Analysis of the deleted sequence indicated that this event could have been the result of splicing since the

characteristic AG dinucleotide of a 3' acceptor splice site was present. The 5'donor splice site was not observed in the sequence examined since it was probably in a upstream segment not observed in the bovine bActRIIB cDNA sequence, but observed in the mouse isoforms ActRIIB₁ and ActRIIB₃. Therefore, it is conceivable that this segment could be present in the bovine molecule and splicing in this region could occur by using one or the other of the putative alternative 3' acceptor splice sites. To test this hypothesis, a PCR was carried out on bovine genomic DNA using a sense primer complementary to the beginning of the intracellular region (bActRIIB.H) and an antisense primer (bActRIIB.4) located in the kinase domain. A fragment of 842 bp was amplified, i.e. 593 bp longer than the expected 249 bp fragment that should amplify from RNA. Sequencing of the genomic fragment revealed that it contained two introns; one of 78 bp, located after nucleotide 522 of the coding sequence, and a second one of 515 bp located after nucleotide 666 of the coding sequence. The first intron was the bovine counterpart of the murine intracellular alternative splicing region as observed in murine isoforms ActRIIB₁ and ActRIIB₃ [13]. However, the bovine sequence did not retain high homology with the murine sequence (data not shown). Furthermore, the bovine sequence was 6 bp longer (78 vs 72 bp) and the last nucleotide triplet was a stop codon in frame with the bActRIIB cDNA open reading frame. For this reason, this bovine region cannot be considered an alternative exon as reported in the mouse. Of note are the putative 5'-donor splice site and the 3' acceptor splice site typical of introns. Thus, the contiguous proline-rich sequence could be alternatively spliced by using one of the two alternative 3'-acceptor splice site (Fig.4).

To further study the splicing event of this region, a RNase protection assay was performed. A radioactive antisense riboprobe, specific to the proline-rich sequence and to the next exon, was used (Fig. 5A). As shown in Figure 5B, a fragment of 144 nt can be protected in the presence of bovine cotyledon and uterus RNA. This fragment was comparable in size to the proline-rich coding sequence attached to the next exon. Furthermore, the splicing event described above predict the protection of a 102 nt fragment in this assay corresponding to the last exon without the proline-rich coding sequence. Although a fragment of this length can be seen with the RPA analysis, it is difficult to ensure that it is a genuine bActRIIB protected fragment since the signal intensity is near the background level. Nevertheless, these results clearly indicate that the majority of the bActRIIB mRNA conserve the proline-rich coding sequence of 42 bp.

Comparison of the alternatively spliced segment with SH3 binding site sequences

Comparison of the amino acid stretch encoded by the alternatively spliced segment with other known proline-rich sequences revealed homologies with SH3 binding motifs [43, 44]. The minimal SH3 binding motif, PXXP, common to all SH3 binding sites known to date, is found 3 times in the bActRIIB alternatively spliced segment (Fig.6). Diverse studies [43, 45] suggest that SH3 binding sites can be divided in two classes according to the position of an arginine or lysine residue at the N- or C-terminus, which determines the N-terminal to C-terminal ligand binding orientation. Class I sites usually have an arginine at the N-terminus, while in class II sites the arginine residue is located at the C-terminus and can be

substituted by a lysine. Following this classification, the putative bActRIIB SH3 binding site would belong to class II ligands, as a lysine residue is present at the C-terminus after the three PXXP motifs. Although the lysine residue is not juxtaposed to the PXXP motif, flexibility in the distance between them may exist in members of the class II ligands [43].

Comparison of the bActRIIB SH3 binding site with other activin receptors

Comparison of this amino acid stretch between activin type IIB receptors from different species shows a 100 % conservation between bovine, murine and rat sequences (Fig.7). *Xenopus* sequences diverge by only one amino acid, but still retain homologies with SH3 binding site sequences. All of the activin receptors described to date, including type I, type IB, type II and type IIB are considered serine/threonine kinases showing relative homologies between each other, with the highest homology being between receptors type II and type IIB. Comparison between all the different activin receptor types in the bovine species shows that the putative SH3 binding site can be found in the activin type II receptor at the same relative location as in the type IIB receptor, i.e. in the cytoplasmic juxtamembrane region just before the kinase domain (Fig.7). The nucleotide sequences are 70% homologous, but the amino acid sequences are identical except for one amino acid residue. In contrast, the bovine activin type I receptor has no SH3 binding site-like sequence in the cytoplasmic juxtamembrane region (unpublished result, Genbank accession no. U58095). Moreover, we failed to find a SH3 binding site-like within other type II serine/threonine kinase receptor sequences.

Identification of 69 kDa and 71 kDa proteins interacting with the short alternative sequence of bActRIIB.

To test whether the short alternative sequence of bActRIIB can interact with intracellular proteins, a GST fusion protein was made with the 14 amino acids of the putative SH3 binding site, which was called GST-IIBSH3b.s. The GST moiety was useful for the purification of the fusion protein as well as for coprecipitation experiments. An uterine endometrial cell line, Endo 8.3 [42] was used for the search of bActRIIB interacting proteins since bActRIIB is expressed in the uterus as shown in Figure 3 suggesting a complete signaling pathway in these cells. Two proteins of 69 kDa and 71 kDa from the Endo 8.3 cell line coprecipitate specifically with the GST-IIBSH3b.s. fusion protein (Fig.8). The 69 kDa protein is coprecipitated more abundantly than the 71 kDa. Attempts to verify the specificity of interaction by expressing two other GST fusion proteins consisting of the entire bActRIIB intracellular domain, with or without the putative SH3 binding sites, have been hampered by inclusion body formation within *E.coli* cells. Nevertheless, these results suggest that the short alternative sequence of bActRIIB encoding a proline-rich sequence can be involved in protein-protein interactions with intracellular proteins.

DISCUSSION

The bovine ActRIIB cDNA was cloned and it was found that the bActRIIB mRNA is expressed in every bovine reproductive tissues analyzed in this report, in accord with the plurality of activin's biological actions. Consistent with these results, Woodruff et al. [46] showed activin-binding sites within the rat ovary, uterus and oviduct while Cameron et al. [47] localized, by in situ hybridization, the expression of ActRII and ActRIIB mRNAs in rat brain, pituitary, ovary and testis.

The two bActRIIB mRNA species of 2 kb and 2.3 kb expressed in bovine tissues correlate well with the length of ActRIIB mRNA species found in the rat reproductive tissues which were of 1.7 kb and 2.25 kb [11]. In human fetal non-reproductive tissues, two major hActRIIB mRNA species of 2.5 kb and 10 kb are found while an additional minor 2.1 kb transcript is observed in K562 erythroleukemia cells [16]. This is consistent with the results reported here since a 10 kb transcript is also observed in bovine tissues although it is a minor mRNA species. Based on a previous study [12], it can be deduced that the bActRIIB mRNA has a lower relative steady state level in these tissues than the bActRII mRNA, since it took 7 days of exposure for the bActRIIB hybridized Northern blot to reach a comparable intensity of a 1 day exposure of bActRII hybridized Northern blot. This is consistent with previous reports in which it is demonstrated by in situ hybridization and northern analysis that, in rat brain and reproductive tissues [47, 11], the steady state level of ActRIIB mRNA is lower than that of ActRII mRNA. Furthermore, we have found in the same array of tissues that the bovine

activin type I receptor mRNA has a higher steady state level than the bActRII and bActRIIB mRNAs (data not shown).

In parallel to activin receptor expressions, several reports have demonstrated the expression of the inhibin α -, β_A - and β_B -subunits in bovine reproductive tissues [48, 49, 50]. The activin receptor complex in the bovine could thus in theory respond to three types of activin and possibly to other undiscovered inhibin β homodimers, since a putative human inhibin β_C subunit cDNA was recently cloned [51] augmenting the theoretical number of activin forms. Moreover, it is also possible that bovine activin receptor complexes serve in the signal transduction of other ligands of the TGF- β family as for example BMP2 or BMP7 since it has been shown in other species that the activin receptors show laxity in their ligand specificity.

The recent structural descriptions and functional characterizations of the activin receptors have opened the door to a better comprehension of the activin signal transduction but the mechanism is not completely understood. As previously noted, the activin receptors might signal through their serine/threonine kinase activity. The bovine activin type IIB receptor, described in this study, should act the same way since it is highly homologous with activin type IIB receptor from other species. However, the finding of a novel mRNA isoform for the bovine activin type IIB receptor allows speculations on the biochemical pathway that might be used for activin signal transduction.

Before this report, ActRIIB mRNA alternative splicing was observed only in the mouse [13] since RT-PCR examination on human mRNA failed to

detect any evidences of alternative splicing in the juxtamembrane region of the ActRIIB mRNA in the pituitary [52] and fetal brain [16]. Our results suggest that the bovine ActRIIB alternative splicing events seem to diverge from the ones described in the mouse. The bActRIIB isoforms were designated bActRIIB₂ and bActRIIB₅ so as to keep the mouse nomenclature (Fig.9). The ActRIIB₂ isoform, as already described, is the predominant mRNA isoform in the mouse [13, 53] and the only one reported in other species until now [14, 16, 52]. It possess the extracellular alternatively spliced segment but not the cytoplasmic alternatively spliced segment found in mouse. The alternate extracellular sequence seems to affect ligand-binding affinity, but no function has been assigned to the alternate intracellular sequence. The genomic clone generated for the RPA analysis encompassed the bovine homologue of the murine intracellular alternative exon and analysis of the bovine genomic sequence showed that it was not highly homologous to the murine sequence. The bovine sequence was longer and finished with a stop codon in frame with the rest of the bActRIIB sequence. This sequence is then considered as an intron for the bovine species and not as an alternative exon as in the mouse. The bActRIIB isoforms 1 and 3 are thus improbable in the bovine species.

The bActRIIB₅ isoform has not been observed in any other species studied to date. It is similar to the bActRIIB₂ isoform but lacks a longer cytoplasmic juxtamembrane domain. The bActRIIB₅ isoform highlights a proline-rich sequence that can be deleted as a module by alternative splicing. Sequence comparison of cDNA and genomic clones as well as RPA analysis have shown that alternative use of a 3' acceptor splice site could thus result in insertion or deletion of a small alternative segment. In fact, the amino acid stretch encoded by this alternative segment displays structural characteristics

of SH3 binding sites which can allow protein-protein interactions with SH3 domain-containing proteins.

The SH3 domain is present in a large variety of proteins including various signaling proteins and consists of a small protein domain of approximately 60 amino acids. In recent years, binding sites that associate with SH3 domains were identified in SH3 binding proteins [44] and in peptide fragments [43] as proline-rich sequences.

We hypothesize that the function of the bActRIIB proline-rich sequence could be the binding of cytoplasmic SH3-containing proteins, which could be implicated in propagation of the intracellular activin signal. Coprecipitation experiments have supported this hypothesis by the identification of 69 kDa and 71 kDa proteins having a direct interaction with the bActRIIB putative SH3 binding site. Whether these interacting proteins are negative or positive regulators of the activin signaling is unknown at this point of time.

Some intracellular proteins having direct interactions with receptors of the TGF- β family has already been identified. However, it is unlikely that the 69 kDa and 71 kDa proteins represent the FKBP-12 or FNTA since these proteins failed to interact with the cytoplasmic domain of ActRII in a yeast two-hybrid system [30, 32]. Since ActRII has a nearly similar putative SH3 binding site as ActRIIB (Fig. 7) we can extrapolate that ActRIIB does not have a direct interaction with FKBP-12 or FNTA through this putative SH3 binding site. Until now, only one cytoplasmic protein that associates with a type II serine/threonine kinase receptor has been identified. This protein, TRIP-1, is a WD-domain protein which associates with T β RII in a kinase

dependent way [33]. However, neither can this protein be the 69 kDa or 71 kDa coprecipitated proteins because TRIP-1 is a 37 kDa protein, and it has been shown that TRIP-1 does not interact with ActRII [33].

Since putative SH3 binding sites are not detected in any other serine/threonine kinase receptors, it is suggested that the 69 kDa and 71 kDa proteins interact specifically with ActRII and ActRIIB. Although there is a generally accepted mechanism of action which seems to be common for all serine/threonine kinase receptors, there might be some subtle mechanisms specific to each receptor in order to transduce the diverse response generated by members of the TGF- β superfamily. This could take the form of specifically interacting proteins, such as the 69 kDa and 71 kDa proteins identified in this study. In respect to that, it is not the first time that a cytoplasmic factor has been isolated having a specific interaction restricted to some of the serine/threonine kinase receptors. FNTA was shown to associate with T β RI and ActRIIB but not with other tested type I receptors, such as TSRI and ActRI [30]. Interestingly, some signals generated by TGF- β and activin seem to be specifically transduced by T β RI and ActRIIB but not by TSRI and ActRI [8]. Taking together, these observations suggest that FNTA could be involved in some specific TGF- β and activin responses. In the same vein, TRIP-1 shows specific interactions with T β RII but not with ActRII [33]. Without excluding that TRIP-1-related proteins could exist for ActRII and ActRIIB, the specific interaction of TRIP-1 with T β RII could also suggest that some cytoplasmic interacting proteins could be different from one receptor type to another.

Finally, it is generally accepted that alternative splicing can serve to introduce functional diversity, such as modification of protein activity. Thus, the alternative splicing event shown here, giving rise to different activin type IIB receptor isoforms, may allow for the fine modulation of the receptor activity. It is well known that activins can induce diverse responses depending of the targeted cells. It will thus be interesting to look at the implication of the alternative SH3 binding site in the generation of multiple activin biological effects.

We are presently focusing on the cloning of the cDNAs encoding the 69 kDa and 71 kDa proteins interacting with the bActRIIB putative SH3 binding site. A better understanding of the molecular mechanisms regulating the activin signal transduction should be achieved through isolation of such SH3-containing proteins.

REFERENCES

1. **Vale W, Hsueh A, Rivier C, Yu J** 1990 The inhibin/activin family of hormones and growth factors. In: Sporn MA, Roberts AB (eds) Peptide growth factors and their receptors. Springer-Verlag, Berlin, vol 95:211-248
2. **Bilezikjian LM, Vale WW** 1992 Local extragonadal roles of activins. *Trends Endocrinol Metab* 3:218-223
3. **DePaolo LV, Bicsak TA, Erickson GF, Shimasaki S, Ling N** 1991 Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:500-512
4. **Woodruff TK, Mather JP** 1995 Inhibin, activin and the female reproductive axis. *Annu Rev Physiol* 57:219-244
5. **Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FMB, Massagué J, Wrana JL** 1993 Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75:671-680
6. **Ebner R, Chen R-H, Chum L, Lawler S, Zioncheck TF, Lee A, Lopez AR, Derynck R** 1993 Cloning of a type I TGF- β receptor and its effect on TGF- β to the type II receptor. *Science* 260:1344-1348
7. **Tsuchida K, Mathews LS, Vale WW** 1993 Cloning and characterization of a transmembrane serine kinase that acts as an activin type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11242-11246
8. **Carcamo J, Weis FMB, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massagué J** 1994 Type I receptors specify growth-inhibitory and

- transcriptional responses to transforming growth factor β and activin.
Mol Cell Biol 14:3810-3821
9. **Mathews LS, Vale WW** 1991 Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. Cell 65:973-982
 10. **Donaldson CJ, Mathews LS, Vale WW** 1992 Molecular cloning and binding properties of the human type II activin receptor. Biochem Biophys Res Commun 184:310-316
 11. **Feng Z-M, Madigan MB, Chen C-LC** 1993 Expression of type II activin receptor genes in the male and female reproductive tissues of the rat. Endocrinology 132:2593-2600
 12. **Ethier J-F, Houde JG, Lussier JG, Silversides DW** 1994 Bovine activin receptor type II cDNA: cloning and tissue expression. Mol Cell Endocrinol 106:1-8
 13. **Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massagué J** 1992 Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. Cell 68:97-108
 14. **Legerski R, Zhou X, Dresback J, Eberspaecher H, McKinney S, Segarini P, de Crombrughe B** 1992 Molecular cloning and characterization of a novel rat activin receptor. Biochem Biophys Res Commun 183:672-679
 15. **Mathews LS, Vale WW, Kintner CR** 1992 Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in *Xenopus* embryos. Science 255:1702-1705
 16. **Hildén K, Tuuri T, Erâmaa M, Ritvos O** 1994 Expression of type II activin receptor genes during differentiation of human K562 cells and cDNA cloning of the human type IIB activin receptor. Blood 83:2163-2170

17. **ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, Heldin C-H** 1994 Characterization of type I receptors for transforming growth factor- β and activin. *Science* 264:101-104
18. **ten Dijke P, Miyazono K, Heldin C-H** 1996 Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* 8:139-145
19. **Mathews LS** 1994 Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocr Rev* 15:310-325
20. **McCarthy SA, Bicknell R** 1994 Activin-A binds to a heteromeric receptor complex on the vascular endothelial cell surface. *J Biol Chem* 269:3909-3912
21. **Ebner R, Chen R-H, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R** 1993 Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 262:900-902
22. **Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massagué J** 1996 Activation of signaling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 16:1066-1073
23. **Willis SA, Zimmerman CM, Li L, Mathews LS** 1996 Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Mol Endocrinol* 10:367-379
24. **ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin C-H, Miyazono K** 1994 Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269:16985-16988
25. **Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, Wrana JL** 1996 MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85:489-500

26. **Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath K, Andries M, Smith JC, Heldin C-H, Miyazono K** 1995 Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130:217-226
27. **Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, Yamashita H, Enomoto S, Miyazono K** 1996 Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* 271:21345-21352
28. **Whitman M, Melton DA** 1992 Involvement of p21^{ras} in *Xenopus* mesoderm induction. *Nature* 357:252-254
29. **Mulder KM, Morris SL** 1992 Activation of p21^{ras} by transforming growth factor β in epithelial cells. *J Biol Chem* 267:5029-5031
30. **Wang T, Danielson PD, Li B, Shah PC, Kim SD, Donahoe PK** 1996a The p21^{ras} farnesyltransferase α subunit in TGF- β and activin signaling. *Science* 271:1120-1122
31. **Kawabata M, Imamura T, Miyazono K, Engel ME, Moses HL** 1995 Interaction of the transforming growth factor- β type I receptor with farnesyl-protein transferase- α . *J Biol Chem* 270:29628-29631
32. **Wang T, Li B-Y, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK** 1996b The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF β family type I receptors. *Cell* 86:435-444
33. **Chen R-H, Miettinen PJ, Maruoka EM, Choy L, Derynck R** 1995 A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF- β receptor. *Nature* 377:548-552

34. **Baker JC, Harland RM** 1996 A novel mesoderm inducer, Madr2, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev* 10:1880-1889
35. **Graff JM, Bansal A, Melton DA** 1996 *Xenopus* Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF β superfamily. *Cell* 85:479-487
36. **Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, Massagué J** 1996 A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381:620-623
37. **Zhang Y, X-H F, Wu R-Y, Derynck R** 1996 Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature* 383:168-172
38. **Li R, Phillips DM, Mather JP** 1995 Activin promotes ovarian follicle development *in vitro*. *Endocrinology* 135:849-856
39. **Dumas JB, Edwards DM, Delort J, Mallet J** 1991 Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by *in vitro* amplification. *Nucleic Acids Res* 19:5227-5232
40. **Innis MA** 1990 PCR with 7-deaza-2'-deoxyguanosine triphosphate. In: MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White (eds) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, 54-59
41. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** 1989 *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY
42. **Brisson C, Ethier J-F, Lussier JG, Goff AK, Silversides DW**, Bovine leukemia inhibitory factor (bLIF) is expressed in reproductive tissues including endometrial cell lines. Program of the 29th annual

- meeting of the Society for the Study of Reproduction, 1996, Biol Reprod 54(suppl 1):Abstract 297
43. **Alexandropoulos K, Cheng G, Baltimore D** 1995 Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. Proc Natl Acad Sci USA 92:3110-3114.
 44. **Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D** 1993 Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. Science 259:1157-1161
 45. **Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL** 1994 Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. Science 266:1241-1247
 46. **Woodruff TK, Krummen L, McCray G, Mather J** 1993 In situ ligand binding of recombinant human [¹²⁵I]activin-A and recombinant human [¹²⁵I]inhibin-A to the adult rat ovary. Endocrinology 133:2998-3006
 47. **Cameron VA, Nishimura E, Mathews LS, Lewis KA, Sawchenko PE, Vale WW** 1994 Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. Endocrinology 134:799-808
 48. **Gandolfi F, Modina S, Brevini TAL, Passoni L, Artini P, Petraglia F, Lauria A** 1995 Activin β_A subunit expressed in bovine oviduct. Mol Reprod Dev 40:286-291
 49. **Rodgers R, Stuchbery SJ, Findlay JK** 1989 Inhibin mRNAs in ovine and bovine ovarian follicles and corpora lutea throughout the estrous cycle and gestation. Mol Cell Endocrinol 62:95-101
 50. **Ireland JLH, Ireland JJ** 1994 Changes in expression of inhibin/activin α , β_A and β_B subunit messenger ribonucleic acids

- following increases in size and during different stages of differentiation or atresia of non-ovulatory follicles in cows. *Biol Reprod* 50:492-501
51. **Hötten G, Neidhardt H, Schneider C, Pohl J** 1995 Cloning of a new member of the TGF- β family: a putative new activin β_C chain. *Biochem Biophys Res Commun* 206:608-613
 52. **Alexander JM, Bikkal HA, Zervas NT, Laws ER, Klibanski A** 1996 Tumor-specific expression and alternate splicing of messenger ribonucleic acid encoding activin/transforming growth factor- β receptors in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 81:783-790
 53. **Wu T-CJ, Jih MH, Wang L, Wan Y-JY** 1994 Expression of activin receptor II and IIB mRNA isoforms in mouse reproductive organs and oocytes. *Mol Reprod Dev* 33:9-15

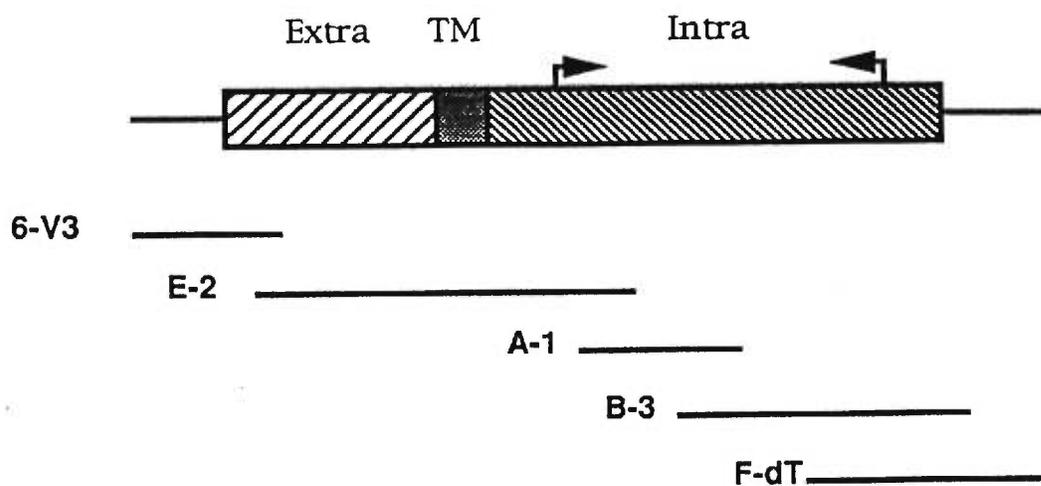


Fig.1 Schematic representation of the bovine activin type IIB receptor cDNA along with the cloning strategy used in this work. The open reading frame is boxed and the corresponding extracellular domain (Extra), the transmembrane domain (TM) and intracytoplasmic domain (Intra) are represented. The relative position of the kinase domain coding sequence are delimited by broken arrows while untranslated sequences are represented by straight lines. Shown underneath are the overlapping PCR products used for sequencing the bActRIIB cDNA.

58 ACGCTGCCGGGGACGAAGGCGCAGAAACGCGGGGAACGAGCCGAAGGAAGGAGCGGGAAGG
 93 AAAGCGCAGCCGCCCGGGCCTTGCGCGTCCCGGGAGCGCCGCGGGCCCTGCCCGCGGGCTCCGGGTGTCCGCGGGGGCCACCGCGGAAC
 1 ATGACGGCGCCCTGGGCGGCCCTCGCCCTCCTTTGGGGATCGCTGTGCGCCGGTTCGGGGCGCGGGGAGGCCGAGACACGGGAGTGCATCTAC
 1 MetThrAlaProTrpAlaAlaLeuAlaLeuLeuTrpGlySerLeuCysAlaGlySerGlyArgGlyGluAlaGluThrArgGluCysIleTyr
 34 TACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAGGGCGAGCGGACAAGCGGCTGCCTACTGCTACGCCTCC
 32 TyrAsnAlaAsnTrpGluLeuGluArgThrAsnGlnSerGlyLeuGluArgCysGluGlyGluArgAspLysArgLeuHisCysTyrAlaSer
 37 TGGCGCAACAGCTCGGGCACCATCGAGCTCGTCAAGAAAGGCTGTGGCTGGACGACTTCAACTGCTACGACAGGCAGGAGTGGCTGGCCACC
 53 TrpArgAsnSerSerGlyThrIleGluLeuValLysLysGlyCysTrpLeuAspAspPheAsnCysTyrAspArgGlnGluCysValAlaThr
 30 GAGGAGAACCCCGAGGTACTTCTGCTGCTGCGAAGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTACCCACCTGCCCGAGGCGGGCGGCCAGAAAGTC
 94 GluGluAsnProGlnValTyrPheCysCysCysGluGlyAsnPheCysAsnGluArgPheThrHisLeuProGluAlaGlyGlyProGluVal
 73 ACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCACCCTGCTCACTGTGCTGGCCTACTCGCTGCTGCCCGTCCGGGGCCTCTCCCTCATCGCCCTGCTG
 25 ThrTyrGluProProProThrAlaProThrLeuLeuThrValLeuAlaTyrSerLeuLeuProValGlyGlyLeuSerLeuIleAlaLeuLeu
 66 GCCTTCTGGATGTACCGACATCGCAAGCCCCCTACGGCCACGCGACATCCACGAGGACCCCTGGACCTCCACCCCGTCCCTCTGGTGGGC
 56 AlaPheTrpMetTyrArgHisArgLysProProTyrGlyHisAlaAspIleHisGlu AspProGlyProProProSerProLeuValGly
 59 CTGAAGCCTCTGCAACTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCGCTTTGGTTGTGTCTGGAAGGCGCAGCTCATGAACGACTTCGTGGCTGTCAAG
 87 LeuLysProLeuGlnLeuLeuGluIleLysAlaArgGlyArgPheGlyCysValTrpLysAlaGlnLeuMetAsnAspPheValAlaValLys
 52 ATCTTCCCCTCCAGGACAAAGCAGTCGTGGCAGAGTGAGCGGAGATCTTCAGCAGCCTGGCATGAAGCAGGAACTGCTGCAGTTCATT
 18 IlePheProLeuGlnAspLysGlnSerTrpGlnSerGluArgGluIlePheSerThrProGlyMetLysHisGluAsnLeuLeuGlnPheIle
 45 GCCGCTGAGAAGCGAGGCTCCAGCCTGGAGGCAGAGCTGTGGCTCATCAGGCCTTCCACGACAAGGCTCCCTCACGGATTACCTCAAGGGG
 49 AlaAlaGluLysArgGlySerSerLeuGluAlaGluLeuTrpLeuIleThrAlaPheHisAspLysGlySerLeuThrAspTyrLeuLysGly
 38 AACATCATCACATGGAACGAACTGTGTCACGTGGCAGAGACGATGTCTAGAGGCCTCTCATACCTACACGAGGATGTGCCCTGGTCCGGGGC
 80 AsnIleIleThrTrpAsnGluLeuCysHisValAlaGluThrMetSerArgGlyLeuSerTyrLeuHisGluAspValProTrpCysArgGly
 31 GAGGGCCACAAGCCATCTATTGCCACAGGGACTTTAAGAGCAAGAATGTATTGCTGAAGAGTGACCTCACTGCTGTGCTGGCTGACTTTGGC
 11 GluGlyHisLysProSerIleAlaHisArgAspPheLysSerLysAsnValLeuLeuLysSerAspLeuThrAlaValLeuAlaAspPheGly
 24 CTGGCTGTTCCGTTTGGAGCAGGAAACCTCCGGGGACACTCACGGGCAGGTGGGCACGCGGGTACATGGCCCCGAGGTGCTCGAGGGA
 42 LeuAlaValArgPheGluProGlyLysProProGlyAspThrHisGlyGlnValGlyThrArgArgTyrMetAlaProGluValLeuGluGly
 17 GCCATCAACTCCAGAGACGCCTTTCTGCGCATCGACATGTACGCCATGGGGCTGGTGTGTGGGAGCTCGTGTCCCGCTGCAAAGCTGCC
 73 AlaIleAsnPheGlnArgAspAlaPheLeuArgIleAspMetTyrAlaMetGlyLeuValLeuTrpGluLeuValSerArgCysLysAlaAla
 10 GATGGACCTGTGGATGAGTACATGCTGCCTTTTGGAGGAGAGATCGGCCAGCACCCGTCCTGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAG
 04 AspGlyProValAspGluTyrMetLeuProPheGluGluGluIleGlyGlnHisProSerLeuGluGluLeuGlnGluValValValHisLys
 03 AAGATGCGGCCCGCATCAAGGATCACTGGCTGAAACACCCGGGCCCTGGCCAGCTCTGCGTGACCATCGAGGAGTGTGGGACCACGATGCA
 35 LysMetArgProAlaIleLysAspHisTrpLeuLysHisProGlyLeuAlaGlnLeuCysValThrIleGluGluCysTrpAspHisAspAla
 96 GAGGCTCGCCTGTCTCGGGCTGTGTGGAGGAGCGAGTGTCCCTGATCCGGAGTGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTTGTCTCCCTG
 66 GluAlaArgLeuSerAlaGlyCysValGluGluArgValSerLeuIleArgArgSerValAsnGlyThrThrSerAspCysLeuValSerLeu
 89 GTGACCTCCGTCACCAATGTGGACCTGCCCCGAGGAGTCGAGCATCTAAGCCCAGGACAGGAGTGGATCTCCAGACTCAGTAGATCTGAAG
 97 ValThrSerValThrAsnValAspLeuProProLysGluSerSerIle***
 82 AGGAAAGGAAAAAACAACAAAAAAGTTGTGTTTTGTTTGGAAATCCCATATAACCAACAAACACATAAAATGCAGCTGCTATTTTACCTT
 75 G

Fig. 2 Consensus bActRIIB cDNA sequence and its derived amino acid sequence. The putative signal peptide as well as the transmembrane region are underlined. The alternative splicing region is boxed. Location of introns found in this study are indicated by a vertical bar. The kinase domain is delimited by broken arrows. The translational stop codon is marked by the symbol ***.

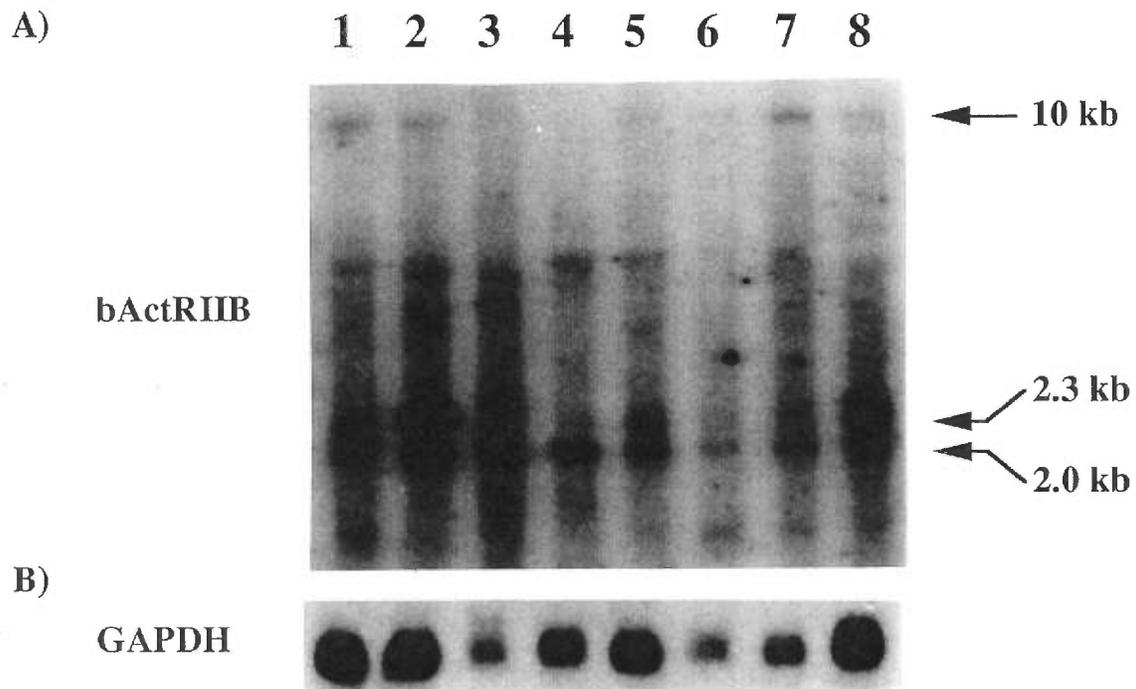


Fig.3 A) Northern analysis of bActRIIB mRNA expression. Bovine tissue samples include: 1) fetal testicles (7 months of gestation); 2) prepubertal 6 months old testicles; 3) adult testicles; 4) corpus luteum; 5) gonadotropin stimulated follicles; 6) anterior pituitary; 7) uterus; 8) cotyledons (8 months of gestation). Transcript sizes of 2 kb and 2.3 kb are indicated. B) GAPDH mRNA expression is shown as an internal sample loading control.

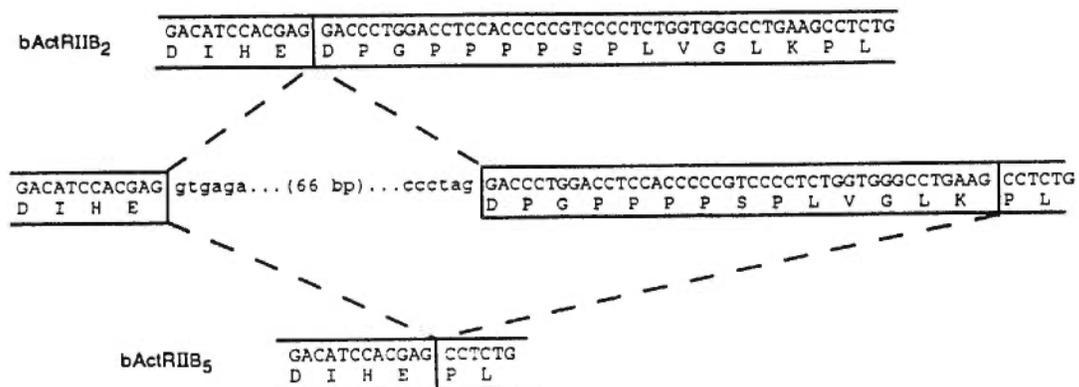


Fig.4 Details of the alternative splicing event generating bActRIIB isoforms with or without a juxtamembrane proline rich sequence. Exons are boxed and the nucleotide and deduced amino acid sequences of the intron/exon boundaries are presented.

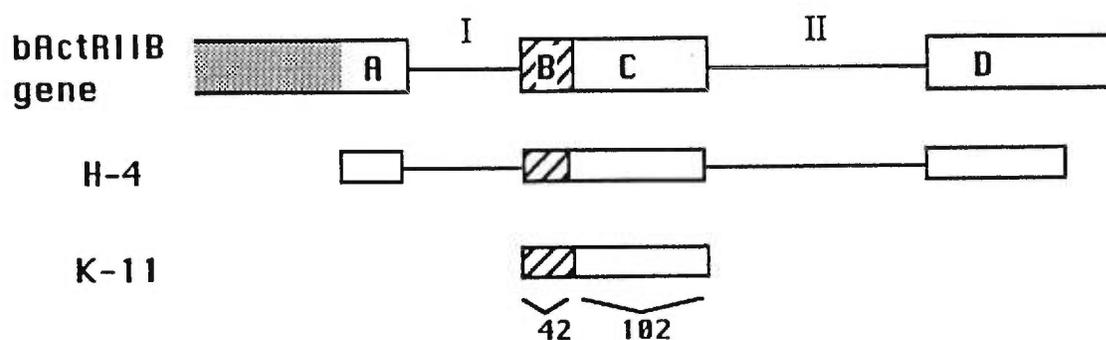


Fig.5 A) Structural relationship between the first intracytoplasmic region of the *bActRIIB* gene, *bActRIIB* genomic clone H-4 and riboprobes used in the RNase protection assay. The transmembrane domain coding sequence is shaded. Exons are represented by letters while introns are numbered. The proline-rich coding sequence is hatched. The lengths of the exons analysed are indicated below the riboprobe K-11.

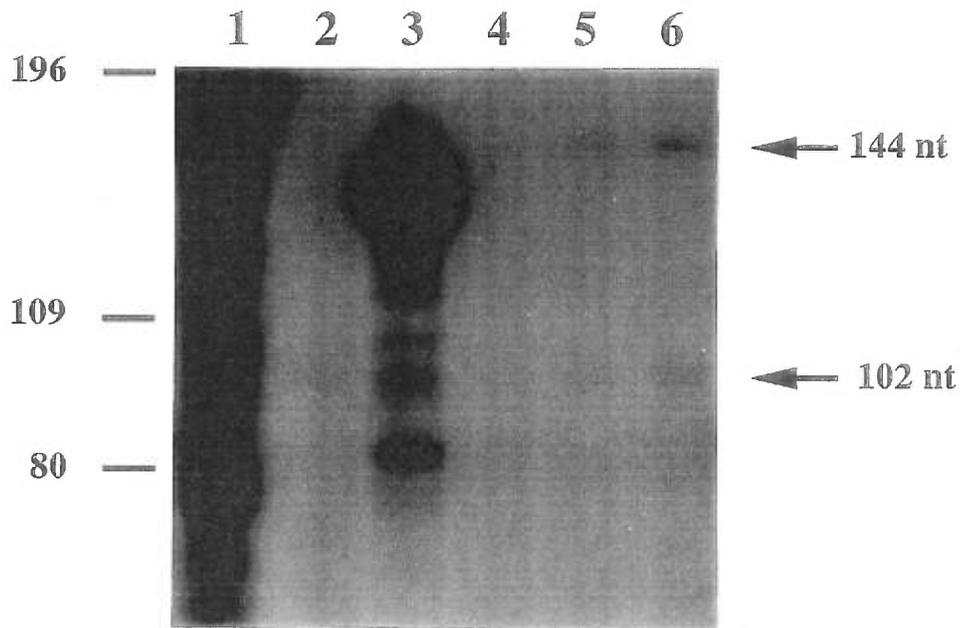


Figure 5B) RNase protection mapping of bActRIIB mRNA showing splicing of the intracellular proline-rich coding sequence. An antisense [^{32}P]-riboprobe was transcribed from the genomic clone K-11 encompassing the proline-rich coding sequence and the next exon. Lane 1: Riboprobe protected by 10 μg of yeast tRNA without RNase digestion. Lane 2: Riboprobe protected by 10 μg of yeast tRNA subjected to RNase digestion. Lane 3: Fragments protected by a sense probe transcribed from the genomic clone J-10. Lane 4: Fragments protected by 10 μg of corpus luteum poly(A) $^+$ RNA. Lane 5: Fragments protected by 10 μg of cotyledon poly(A) $^+$ RNA. Lane 6: Fragments protected by 50 μg of uterus total RNA. Sizes of the end-labeled fragments of pBlueScript KS digested by Sau3A are indicated in nucleotides at the left.

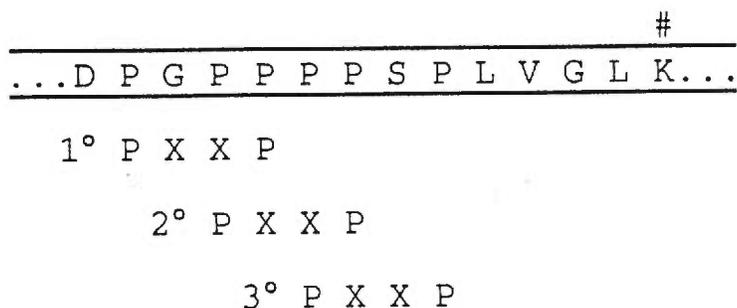


Fig.6 Positioning of three minimal SH3 binding site consensus sequence in the putative bActRIIB SH3 binding site. Amino acid residues are represented by single letters and amino acid residues not conserved in the consensus SH3 binding site are represented with X. The 3' conserved lysine residue is indicated by the symbol #.

```

Bovine: GACCCTGGACCTCCACCCCGTCCCCTCTGGTGGGCCTGAAG
        D P G P P P P S P L V G L K

Human:  GACCCTGGGCCTCCACCACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAG
        * * * * * * * * * * * * * * *

Mouse:  GACCCGGGGCCTCCGCCCCCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAG
        * * * * * * * * * * * * * * *

Rat:    GACCCTGGGCCTCCTCCCCCATCGCCTCTGGTGGGCCTGAAG
        * * * * * * * * * * * * * * *

Xenopus: GACCCCGGTCTGCCCCCTCCATCTCCTCTGGTCGGGCTGAAG
         * * * L * * * * * * * * * * *

bActRII: GACCCAGGACCACCCACCTTCTCCATTACTAGGTTTGAAG
         * * * * * * * * * * * L * * *

```

Fig.7 Alignment of the bActRIIB putative SH3 binding site with the corresponding regions of activin type IIB receptors from different species. Comparison with the bovine activin type II receptor is also shown.

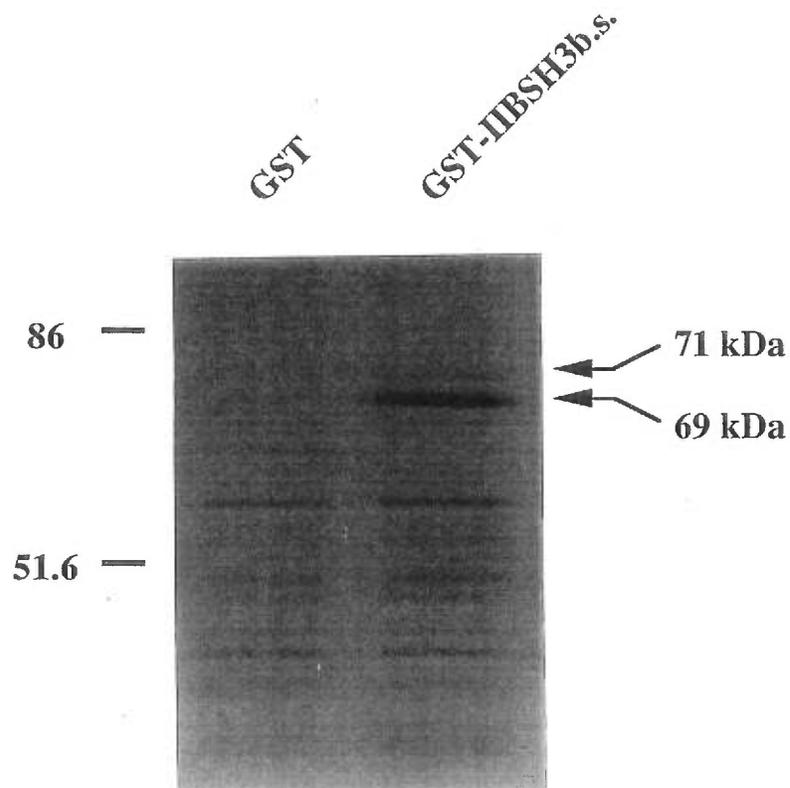


Fig.8 Binding of intracellular proteins to the small alternative proline-rich region of bActRIIB. [³⁵S]Methionine-labeled proteins of Endo 8.3 cells were precleared by incubation with GST and glutathione sepharose 4B and incubated with glutathione sepharose 4B plus GST (lane 1) or GST-IIBSH3b.s. (lane 2). Bound proteins were eluted by thrombin cleavage and loaded on a 10% SDS-PAGE. Molecular weights of proteins specifically interacting with GST-IIBSH3b.s. are indicated on right. Molecular weight standards are indicated on left.

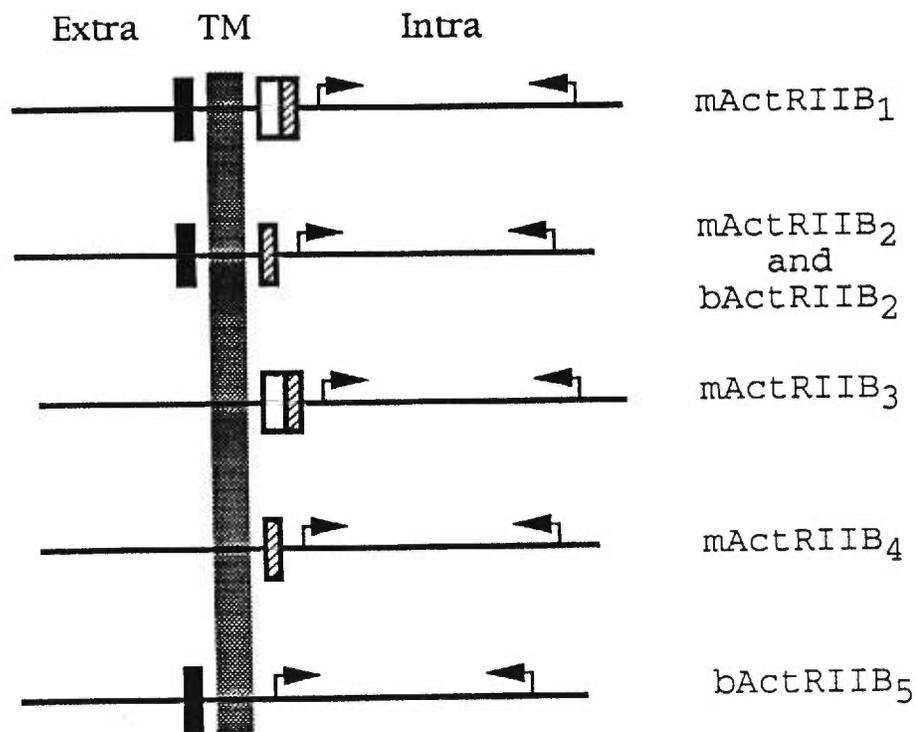


Fig.9 Schematic representation of possible alternatively spliced ActRIIB isoforms. In addition to the bovine isoforms bActRIIB₂ and bActRIIB₅ identified in the present study, the murine isoforms are presented so as to show all possible combinations generated by alternative splicing. The following regions are represented: extracellular domain (Extra), transmembrane domain (TM), intracytoplasmic domain (Intra), kinase domain (delimited by broken arrows), extracellular alternatively spliced regions (black box), murine intracytoplasmic alternatively spliced region (white box), proline-rich regions (hatched box).

CHAPITRE 4

4.1 ARTICLE 3: IDENTIFICATION OF A NOVEL MRNA VARIANT FOR THE BOVINE ACTIVIN TYPE I RECEPTOR

Soumis pour publication dans la revue "Biochimica et Biophysica Acta"

(Short Sequence Paper)

IDENTIFICATION OF A NOVEL mRNA VARIANT FOR THE
BOVINE ACTIVIN TYPE I RECEPTOR

Jean-François Ethier, Jacques G. Lussier, and David W. Silversides

Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRA),
Department of Veterinary Biomedicine, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Montreal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Key words: bActRI; Serine/threonine kinase receptor; TGF- β superfamily;
complementary DNA; mRNA expression.

Corresponding address: Dr. David W. Silversides, Centre de Recherche en
Reproduction Animale (CRRA), Department of Veterinary Biomedicine,
Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, P.O. Box 5000, St-
Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Tel.(514) 773-8521 (ext.8464). Fax (514) 773-8103.

e-mail: silverdw@ere.umontreal.ca

Genbank accession number. for the nucleotide sequence reported in this
article: U5895

SUMMARY

Activins, which are members of the TGF- β family, bind to complexes of serine/threonine kinase receptors in order to transduce their signal in target cells. We have cloned the complementary DNA encoding the bovine activin type I receptor. Two cDNA isoforms were found: the first one, bActRI₁, coded for the complete activin type I receptor while the second isoform, bActRI₂, had a modified and truncated 5'end sequence. The bActRI₂ 5'end variant sequence is present in the 5'untranslated region of the bActRI₁ isoform just upstream from the initiation codon for translation but in a complementary and inverted orientation. Northern blot analysis shows that activin type I receptor mRNA is expressed in the bovine tissues involved in reproduction. A major mRNA species of 4 kb is found in testis, corpus luteum, ovary, pituitary, uterus and cotyledons. Two other mRNA species of 2.7 kb and 1.8 kb respectively are seen in mature testis but not in fetal and immature testis, suggesting developmental regulation.

Activins are growth and differentiation factors that belong to the TGF- β superfamily of ligands [1]. These dimeric proteins, composed of inhibin β -subunits, are involved in the control of numerous biological effects including embryonic development, hormonogenesis, cellular differentiation and proliferation [2-4]. However, the exact biological roles played by activins as well as their mode of action are not completely understood. It is now well accepted that activins act on their target cells via a complex of transmembrane receptors displaying serine/threonine kinase activity, indicating a distinct signaling mechanism compared to tyrosine kinase membrane receptors. Two main types of activin receptors each having two subtypes of receptors are identified: the first includes activin type I receptor (ActRI) [5-7], and activin type IB receptor (ActRIB) [8], while the second type includes activin type II receptor (ActRII) [9-12] and activin type IIB receptor (ActRIIB) [13-17]. It is proposed that an activin receptor complex is formed of both type I and type II receptors [18]. There appears to be a degree of promiscuity between serine/threonine kinase receptors, since ActRI can also bind TGF- β and bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in presence of their respective type II receptors [19, 20]. On the other hand, it has been suggested that ActRII can also serve as a BMP-7 type II receptor [21] and as a growth/differentiation factor-5 type II receptor [22] while ActRIIB can be a type II receptor for BMP-2 [23] and BMP-7 [21]. The cascade of events of activin signal transduction from the cellular membrane to the nucleus were largely undefined until several factors, including FKBP-12 [24], p21^{ras}-farnesyltransferase α subunit [25, 26], MAD [27, 28] and RAS [29, 30], were identified which may be involved in this signaling pathway.

The present studies were undertaken to further our understanding of the activin receptor complex structure and function. We have cloned the bovine activin type I receptor (bActRI) complementary DNA and report its tissue expression and differential splicing events. The bActRI cDNA was amplified by RT-PCR from pituitary and cotyledon mRNA using oligonucleotides based on rat, mouse and human sequences. The 5'end region was amplified from a bovine corpus luteum cDNA library in lambda phage using a bActRI specific antisense primer and a lambda specific primer. The consensus cDNA sequence is shown in figure 1. The deduced amino acid sequence of bActRI is 509 amino acid in length. Comparison of the bovine activin type I receptor cDNA sequence shows high conservation with the rat (88%), mouse (89%) and human (93%) homologues. Features of serine/threonine kinase type I receptors such as the pattern of extracellular cysteine residues and the kinase domain preceded by the GS domain (repeated glycine and serine residues) are conserved in bActRI.

The expression pattern of bActRI gene in bovine female reproductive tissues was determined by Northern blot analysis. The expression of bActRI was found to be ubiquitous in the tissues analyzed (Fig.2). Thus, these tissues co-express bActRI mRNA with the other two related type II receptors mRNAs, bActRII [12] and bActRIIB [17]. Comparison of signal intensity on Northern blots hybridized with probes specific for bActRI, bActRII, or bActRIIB demonstrated that the relative steady state level of mRNA is highest for bActRI in the tissues analyzed in this report.

The bActRI mRNA was detected as a major species of 4 kb. This correlates well with the size of the ActRI mRNA detected in non-reproductive

tissues from human [5, 31, 32], mouse [6] and rat species [7, 32, 33]. Two additional minor mRNA species of 2.7 kb and 1.8 kb were identified exclusively in bovine mature testis, which have not been reported in other species (Fig.3). Since these minor species are not expressed in fetal and immature bovine testis, this suggests that expression of bActRI mRNA transcripts may be under developmental control, at least in the testis. Furthermore, it is interesting to compare these results with the mRNA expression of inhibin α , β A and β B subunits in the rat testis. It was demonstrated that their expression are developmentally controlled since their mRNA steady state level decreased with testicular sexual maturation [34]. Subsequently, the β -subunits were detected by immunostaining in immature and adult rat testis with higher signal intensity in the immature tissue [35]. Taken all together, these results suggest that activin activity may play an important role during testis development.

Until now, a single ActRI cDNA isoform is reported for the different species analyzed. Depending of the authors, this ActRI cDNA was named ALK2 [31], SKR1 [32], Tsk7L [6], ActX1R [7] or R1 [33], and has been cloned from diverse tissues including the placenta, hepatoma cells, epithelial cells, whole brain and the urogenital ridge. Here we report a second bActRI cDNA isoform, bActRI₂, showing a change in the 5'end of the coding sequence. Nucleotides 1 to 31 of the bActRI₁ isoform (Fig.1) are absent in the bActRI₂ isoform and are replaced by an unrelated stretch of 25 nucleotides. Surprisingly, this stretch is the inverted complementary sequence of 25 nucleotides normally found upstream of the translation initiation codon of the longest isoform (Fig.4). Since this 5'end variant sequence was isolated from a cDNA lambda library, one possibility was that we were observing a cloning

artifact. However, using the RT-PCR method, we have further confirmed that this variant is expressed (Fig.5). Corpus luteum mRNA, independent from that used in the original cloning, was used as template for this analysis. The PCR amplifications used an antisense primer common to both isoforms, in conjunction with one of the two sense primers respectively specific for the bActRI₁ 5' sequence and for the 5' inverted sequence of bActRI₂. Based on the PCR amplification intensity, it can be inferred that the relative abundance of the 5'end variant bActRI₂ mRNA sequence is far less than the bActRI₁ mRNA isoform (Fig.5, compare lane 4 to lane 6). Although the genomic sequence of bovine bActRI is not yet available, we can tentatively localize this change in the middle of exon 2, based on the genomic organization of the mouse activin type I receptor [36]. The mechanism by which this inversion occurs is unknown but we can speculate that the variant sequence is unlikely to be a retained intron from an intermediate splicing form. Nevertheless, this event leads to the expression of an mRNA that would code for an alternative form of bActRI with a variant N-terminal sequence. The consequence of this sequence inversion is the loss of the original translation initiation codon as well as the first 12 residues of the signal peptide, with translation proceeding via an in frame ATG codon located downstream of the inverted sequence. This in frame ATG codon is located within the context of a Kosak's consensus sequence for initiation of translation [37]. Furthermore, the hydrophobic region of the signal peptide is shortened from 21 amino acid residues to only 9 residues. According to von Heijne [38], a signal peptide with 9 apolar residues can still be functional, suggesting that the expressed bActRI₂ isoform could be targeted to the cellular membrane.

Our results demonstrate that bActRI is highly expressed in bovine pituitary (Fig.2, lane 3), which correlates well with the high expression found in the rat pituitary [7]. However, in contrast with these results, Alexander et al. [39] reported that ActRI expression cannot be found in normal human pituitary. On the other hand, they report that ActRI was exclusively expressed in certain human tumor pituitary cells. While this discrepancy of expression could be due to species differences, it may also be explained by the methods used to detect ActRI expression. In the present study, the bActRI expression was verified by Northern analysis while in the study on the human pituitary, an RT-PCR approach was used. Interestingly, in the study performed by Alexander et al., the sense primer used to amplify the ActRI PCR product corresponded exactly to the last part of the sequence that can be deleted by the sequence inversion event described in this paper (nucleotide 11 to nucleotide 31 of the bActRI₁ isoform). Thus, we can hypothesize that the normal human pituitary does not express the ActRI₁ isoform, explaining why no ActRI PCR product was amplified and why ActRI expression could nonetheless be demonstrated in normal bovine and rat pituitaries by Northern hybridization, using a probe complementary to both isoforms.

A further interesting point about the 5'end untranslated region of ActRI mRNA comes from the study of Schmitt et al. [36] who determined a strong transcription start site at only 68 nucleotides upstream of the translation initiation codon from the mouse ActRI gene. As these authors reported, this is in contrast with reported ActRI cDNA which possess longer 5'UTR sequences of 147 bp for rat, 340 bp for human and 495 bp for mouse. We can speculate that the currently accepted ActRI 5'UTR may not be the unique 5'end sequence of ActRI mRNA and that use of alternative transcription start sites or

of other controlling mechanisms could yield diverse 5'end sequences including the one described in this report.

REFERENCES

1. **Vale W, Hsueh A, Rivier C, Yu J** 1990 The inhibin/activin family of hormones and growth factors. In: Sporn MA, Roberts AB (eds) Peptide growth factors and their receptors. Springer-Verlag, Berlin, vol 95:211-248
2. **Bilezikjian LM, Vale WW** 1992 Local extragonadal roles of activins. *Trends Endocrinol Metab* 3:218-223
3. **DePaolo LV, Bicsak TA, Erickson GF, Shimasaki S, Ling N** 1991 Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:500-512
4. **Woodruff TK, Mather JP** 1995 Inhibin, activin and the female reproductive axis. *Annu Rev Physiol* 57:219-244
5. **Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FMB, Massagué J, Wrana JL** 1993 Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75:671-680
6. **Ebner R, Chen R-H, Chum L, Lawler S, Zioncheck TF, Lee A, Lopez AR, Derynck R** 1993 Cloning of a type I TGF- β receptor and its effect on TGF- β to the type II receptor. *Science* 260:1344-1348
7. **Tsuchida K, Mathews LS, Vale WW** 1993 Cloning and characterization of a transmembrane serine kinase that acts as an activin type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11242-11246
8. **Carcamo J, Weis FMB, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massagué J** 1994 Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor β and activin. *Mol Cell Biol* 14:3810-3821

9. **Mathews LS, Vale WW** 1991 Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65:973-982
10. **Donaldson CJ, Mathews LS, Vale WW** 1992 Molecular cloning and binding properties of the human type II activin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184:310-316
11. **Feng Z-M, Madigan MB, Chen C-LC** 1993 Expression of type II activin receptor genes in the male and female reproductive tissues of the rat. *Endocrinology* 132:2593-2600
12. **Ethier J-F, Houde JG, Lussier JG, Silversides DW** 1994 Bovine activin receptor type II cDNA: cloning and tissue expression. *Mol Cell Endocrinol* 106:1-8
13. **Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massagué J** 1992 Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* 68:97-108
14. **Legerski R, Zhou X, Dresback J, Eberspaecher H, McKinney S, Segarini P, de Crombrughe B** 1992 Molecular cloning and characterization of a novel rat activin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 183:672-679
15. **Mathews LS, Vale WW, Kintner CR** 1992 Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in xenopus embryos. *Science* 255:1702-1705
16. **Hildén K, Tuuri T, Erâmaa M, Ritvos O** 1994 Expression of type II activin receptor genes during differentiation of human K562 cells and cDNA cloning of the human type IIB activin receptor. *Blood* 83:2163-2170

17. **Ethier J-F, Lussier JG, Silversides DW** 1997 Bovine activin receptor type IIB mRNA displays alternative splicing involving a sequence homologous to SH3 binding sites. *Endocrinology* (submitted)
18. **Mathews LS** 1994 Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocrine Rev* 15:310-325
19. **ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, Heldin C-H** 1994 Characterization of type I receptors for transforming growth factor- β and activin. *Science* 264:101-104
20. **ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin C-H, Miyazono K** 1994 Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269:16985-16988
21. **Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath K, Andries M, Smith JC, Heldin C-H, Miyazono K** 1995 Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130:217-226
22. **Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, Yamashita H, Enomoto S, Miyazono K** 1996 Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* 271:21345-21352
23. **Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, Wrana JL** 1996 MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85:489-500
24. **Wang T, Li B-Y, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK** 1996 The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF β family type I receptors. *Cell* 86:435-444

25. **Wang T, Danielson PD, Li B, Shah PC, Kim SD, Donahoe PK** 1996 The p21^{ras} farnesyltransferase α subunit in TGF- β and activin signaling. *Science* 271:1120-1122
26. **Kawabata M, Imamura T, Miyazono K, Engel ME, Moses HL** 1995 Interaction of the transforming growth factor- β type I receptor with farnesyl-protein transferase- α . *J Biol Chem* 270:29628-29631
27. **Baker JC, Harland RM** 1996 A novel mesoderm inducer, Madr2, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev* 10:1880-1889
28. **Graff JM, Bansal A, Melton DA** 1996 Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF β superfamily. *Cell* 85:479-487
29. **Whitman M, Melton DA** 1992 Involvement of p21^{ras} in Xenopus mesoderm induction. *Nature* 357:252-254
30. **Mulder KM, Morris SL** 1992 Activation of p21^{ras} by transforming growth factor β in epithelial cells. *J Biol Chem* 267:5029-5031
31. **ten Dijke P, Ichijo H, Franzén P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin C-H, Miyazono K** 1993 Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8:2879-2887
32. **Matsuzaki K, Xu J, Wang F, McKeehan WL, Krummen L, Kan M** 1993 A widely expressed transmembrane serine/threonine kinase that does not bind activin, inhibin, transforming growth factor β , or bone morphogenic factor. *J Biol Chem* 268:12719-12723
33. **He WW, Gustafson ML, Hirobe S, Donahoe PK** 1993 Developmental expression of four novel serine/threonine kinase

- receptors homologous to the activin/transforming growth factor- β type II receptor family. *Dev Dyn* 196:133-142
34. **Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W** 1988 Gonadal and extragonadal expression of inhibin α , β A and β B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:247-251
 35. **Roberts V, Meunier H, Sawchenko PE, Vale W** 1989 Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinology* 125:2350-2359
 36. **Schmitt J, Mielke R, Schrewe H** 1995 Genomic organization of a mouse type I activin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 213:211-217
 37. **Kosak M** 1987 An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl Acids Res* 15:8125-8132
 38. **Von Heijne G** 1988 Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochim Biophys Acta* 947:307-333
 39. **Alexander JM, Bikkal HA, Zervas NT, Laws ER, Klibanski A** 1996 Tumor-specific expression and alternate splicing of messenger ribonucleic acid encoding activin/transforming growth factor- β receptors in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 81:783-790

5'CTTTATTCCT GGAGACTCCA GGAGTGCCTC TCCCACCGCT AGAGTGAGTG AACGGAGCCT TGG -65
 GGAAGAG CCCACTGCTG GAAGGACCGT GGGAGGAGAT GCCTGG GAGC CAGCTCTAAG TTTACA -1

ATG GTG GAT GGA GTG ATG ATT CTT CCT GTG CTC GTG ATG ATT GCT TTC CCT TTC 54
 Met Val Asp Gly Val Met Ile Leu Pro Val Leu Val Met Ile Ala Phe Pro Phe

CCT AGT ATG GAA GAT GAG AAG CCC AAG GTA AAC CCC AAG CTT TAC ATG TGT GTG 108
 Pro Ser Met Glu Asp Glu Lys Pro Lys Val Asn Pro Lys Leu Tyr Met Cys Val

TGT GAA GGC CTC TCC TGT GGG GAT GAG GCC CAC TGT GAA GGC CAG CAG TGC TTT 162
 Cys Glu Gly Leu Ser Cys Gly Asp Glu Ala His Cys Glu Gly Gln Gln Cys Phe

TCC TCG CTG AGC ATA AAT GAT GGC TTC CAC GTC TAC CAG AAA GGC TGC TTC CAG 216
 Ser Ser Leu Ser Ile Asn Asp Gly Phe His Val Tyr Gln Lys Gly Cys Phe Gln

GTC TAC GAG CAG GGG AAG ATG ACC TGT AAG ACC CCG CCG TCA CCT GGC CAG GCT 270
 Val Tyr Glu Gln Gly Lys Met Thr Cys Lys Thr Pro Pro Ser Pro Gly Gln Ala

GTG GAG TGC TGC CAA GGG GAC TGG TGT AAC AGG AAC ATC ACG GCC CAG CTG CCT 324
 Val Glu Cys Cys Gln Gly Asp Trp Cys Asn Arg Asn Ile Thr Ala Gln Leu Pro

ACT AAA GGG AAA TCT TTT CCT GGA ACA CAG AAT TTC CAC TTG GAG GTT GGC CTC 378
 Thr Lys Gly Lys Ser Phe Pro Gly Thr Gln Asn Phe His Leu Glu Val Gly Leu

ATC ATT TTG TCT GTA GTG TTC GCA GTA TGC CTT CTA GCC TGC CTA TTG GGA GTT 432
 Ile Ile Leu Ser Val Val Phe Ala Val Cys Leu Leu Ala Cys Leu Leu Gly Val

GCT CTC CGA AAA TTT AAA AGG CGC AAT CAA GAA CGC CTC AAC CCC AGA GAT GTG 486
 Ala Leu Arg Lys Phe Lys Arg Arg Asn Gln Glu Arg Leu Asn Pro Arg Asp Val

GAA TAT GGC ACC ATT GAA GGA CTC ATC ACC ACC AAC GTT GGA GAC AGC ACT TTA 540
 Glu Tyr Gly Thr Ile Glu Gly Leu Ile Thr Thr Asn Val Gly Asp Ser Thr Leu

GCA GAT TTA TTG GAT CAT TCA TGT ACA TCG GGA AGC GGC TCT GGC CTT CCT TTT 594
 Ala Asp Leu Leu Asp His Ser Cys Thr Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe

CTG GTA CAG AGA ACA GTG GCC CGT CAG ATC ACA CTG CTG GAG TGT GTT GGG AAG 648
 Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Ile Thr Leu Leu Glu Cys Val Gly Lys

GGC AGG TAT GGC GAG GTG TGG AGG GGC AGC TGG CAA GGG GAG AAC GTC GCT GTG 702
 Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Ser Trp Gln Gly Glu Asn Val Ala Val

AAG ATC TTT TCC TCC CGG GAT GAG AAG TCG TGG TTT AGG GAA ACA GAA TTG TAC 756
 Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Lys Ser Trp Phe Arg Glu Thr Glu Leu Tyr

AAC ACT GTG ATG CTG AGG CAT GAA AAT ATC TTA GGT TTC ATT GCT TCA GAC ATG 810
 Asn Thr Val Met Leu Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met

ACA TCA AGA CAC TCC AGT ACA CAG TTG TGG TTG ATC ACA CAT TAT CAT GAA ATG 864
 Thr Ser Arg His Ser Ser Thr Gln Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu Met

GGA TCG CTG TAC GAC TAC CTT CAG CTT ACT ACT CTG GAT ACA GTG AGC TGC CTG 918
 Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Gln Leu Thr Thr Leu Asp Thr Val Ser Cys Leu

AGA ATA GTG CTG TCC ATA GCG AGC GGT CTC GCA CAT TTG CAC ATA GAG ATC TTT 972
 Arg Ile Val Leu Ser Ile Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His Ile Glu Ile Phe

GGG ACC CAA GGG AAA CCG GCC ATT GCT CAC CGA GAT CTA AAA AGC AAA AAC ATC 1026
 Gly Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile

CTG GTT AAG AAG AAT GGA CAG TGT TGC ATA GCA GAT TTG GGC CTG GCA GTC ATG 1080
 Leu Val Lys Lys Asn Gly Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Met

CAT TCC CAG AGC ACC AAT CAG CTC GAT GTG GGG AAC AAC CCC CGT GTG GGC ACC	1134
His Ser Gln Ser Thr Asn Gln Leu Asp Val Gly Asn Asn Pro Arg Val Gly Thr	
AAA CGC TAC ATG GCC CCC GAA GTT CTT GAT GAA ACT ATC CAG GTG GAT TGT TTT	1188
Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Thr Ile Gln Val Asp Cys Phe	
GAT TCT TAC AAG AGA GTC GAT ATT TGG GCC TTT GGA CTT GTC TTG TGG GAG GTG	1242
Asp Ser Tyr Lys Arg Val Asp Ile Trp Ala Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Val	
GCC AGG CGG ATG GTG AGC AAT GGT ATT GTG GAG GAT TAC AAG CCA CCA TTC TAT	1296
Ala Arg Arg Met Val Ser Asn Gly Ile Val Glu Asp Tyr Lys Pro Pro Phe Tyr	
GAT GTG GTT CCC AAT GAC CCA AGT TTT GAA GAT ATG AGG AAG GTA GTC TGT GTG	1350
Asp Val Val Pro Asn Asp Pro Ser Phe Glu Asp Met Arg Lys Val Val Cys Val	
GAT CAA CAG AGG CCT AAC ATA CCC AAC AGA TGG TTC TCA GAC CCG ACA TTA ACC	1404
Asp Gln Gln Arg Pro Asn Ile Pro Asn Arg Trp Phe Ser Asp Pro Thr Leu Thr	
TCC CTG GCC AAG CTG ATG AAA GAA TGC TGG TAT CAG AAT CCA TCT GCC AGA CTC	1458
Ser Leu Ala Lys Leu Met Lys Glu Cys Trp Tyr Gln Asn Pro Ser Ala Arg Leu	
ACA GCC CTG CGT ATC AAA AAG ACT TTG ACC AAA ATT GAT AAT TCC CTA GAC AAA	1512
Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Thr Lys Ile Asp Asn Ser Leu Asp Lys	
TTG AAA ACT GAC TGT TGA CATTTCATG GTTGTCAAGA AGGAATATTC TGACATTATT 3'	1571
Leu Lys Thr Asp Cys ***	

Consensus bActRI₁ cDNA sequence and its deduced amino acid sequence. The putative signal peptide and the transmembrane region are underlined. The kinase domain is delimited by broken arrows. The characteristic GS domain of Ser/Thr kinase type I receptors is indicated by a double overline. The boxed nucleotides at the 5' end correspond to the sequence that is found in an inverted orientation at the 5' end of the bActRI₂ cDNA isoform. The beginning of the homologous sequence in both isoforms is indicated by a vertical bar.

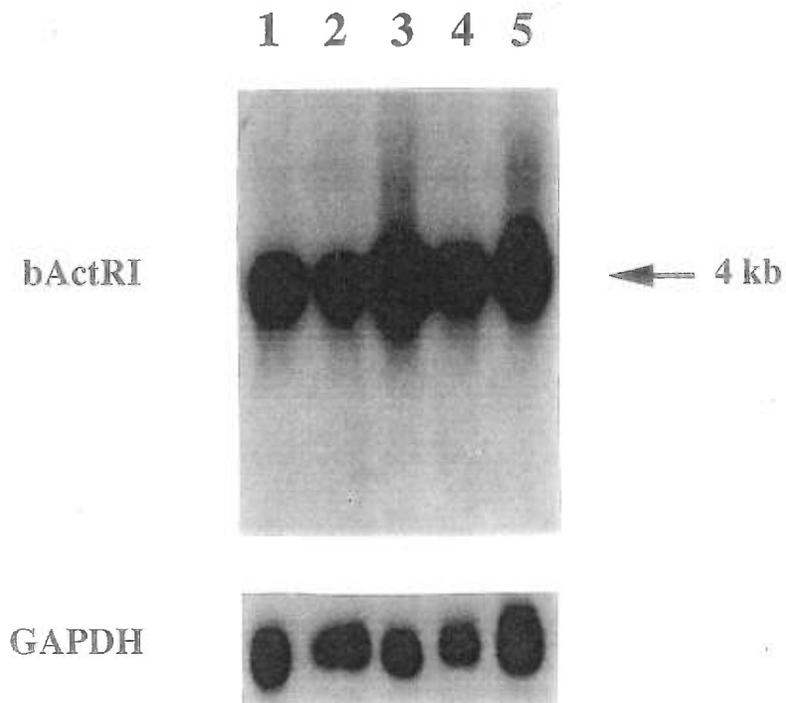


Fig.2 Northern analysis of bActRI mRNA expression in bovine female tissues involved in reproduction. Each lane contains poly(A)⁺ RNA purified from 300 μ g of total RNA. Lane 1: corpus luteum; lane 2: gonadotropin stimulated follicles; lane 3: anterior pituitary; lane 4: uterus; lane 5: cotyledons (8 months of gestation). Transcript size of 4 kb is indicated. GAPDH mRNA expression is shown as an internal sample loading control.

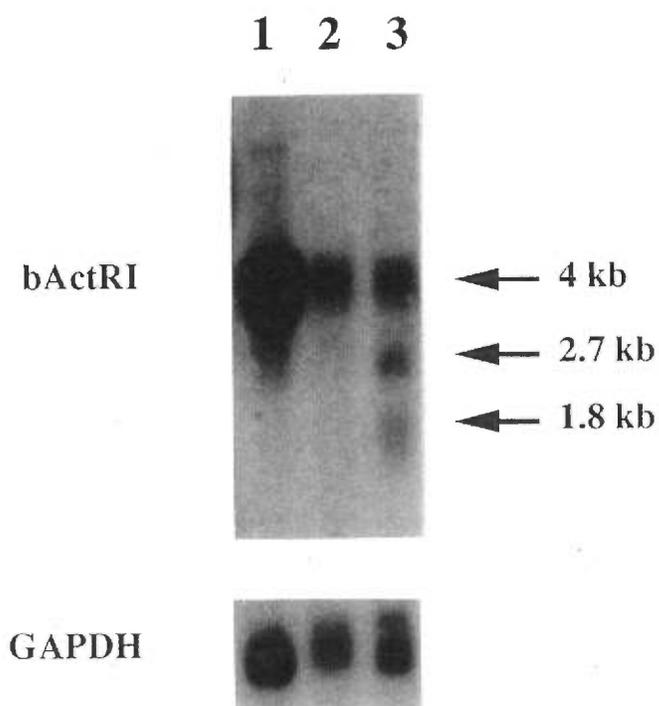


Fig.3 Northern analysis of developmental expression of bActRI mRNA in bovine testicles. Each lane contains poly(A)⁺ RNA purified from 300 μ g of total RNA. Lane 1: fetal testicles (7 months of gestation); lane 2: prepubertal 6 month old testicles; lane 3: adult testicles. Transcript sizes of 4 kb, 2.7 kb and 1.8 kb are indicated. This autoradiogram is representative of three different experiments. GAPDH mRNA expression is shown as an internal sample loading control.

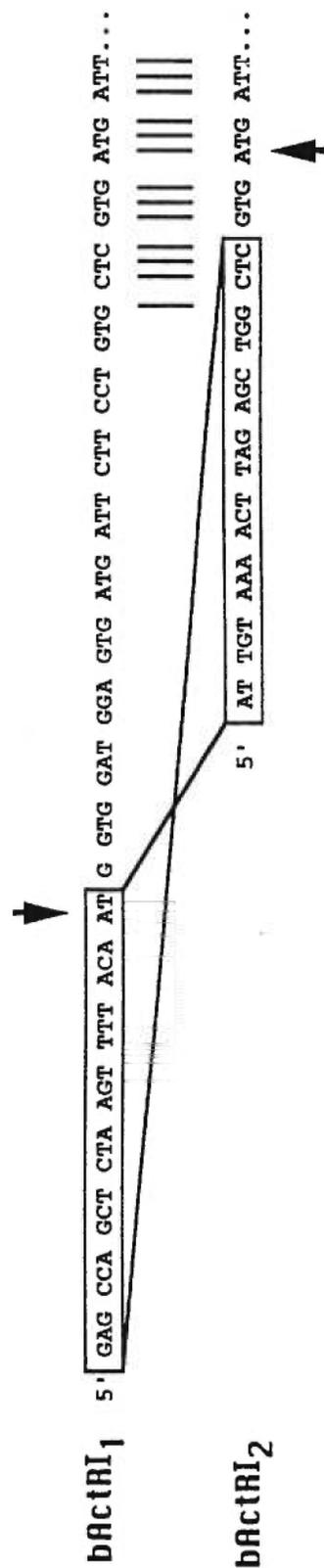


Fig.4 Details of the 5'end sequence of bActRI₁ and bActRI₂ cDNA isoforms. The bActRI₁ isoform corresponds to the sequence shown in figure 1. The inverted complementary sequences are boxed in both isoforms. The bActRI₁ ATG translation initiation codon and the one potentially used in bActRI₂ are indicated by an arrow. The beginning of the homologous sequence common to both isoforms is indicated by vertical bars.

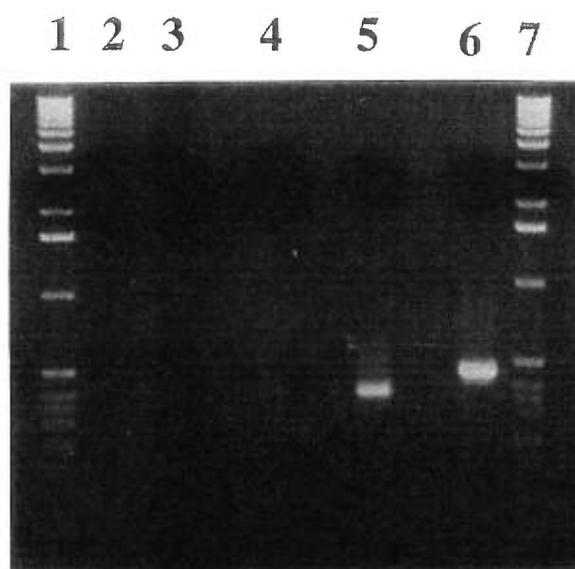


Fig.5 RT-PCR analysis of bActRI isoform expression. First strand cDNA was reverse-transcribed from bovine corpus luteum mRNA. PCR amplification were performed using an antisense primer (primer 4: GAGAGCAACTCCCAATAGG) common for both isoforms, which corresponded to nucleotides 438 to 420 of the bActRI₁ isoform sequence. The sense primer for the amplification of the bActRI₁ isoform (primer D: GAGCCAGCTCTAAGTTTTACAATGG) corresponded to nucleotides -21 to 4 italicized in figure 1. The primer specific for the bActRI₂ isoform amplification (primer 1000: ATTGTAAAACCTTAGAGCTGGC) corresponded to the divergent sequence found at the extreme 5' end of this isoform and allowed the detection of a shorter PCR product than the bActRI₁ PCR product. Amplification conditions were one cycle of 3 min. at 94°C; 90 sec at 56°C, and 3 min. at 72°C, followed by 44 cycles of 55 sec at 95°C, 55 sec at 56°C and 90 sec at 72°C. In order to obtain an appreciable signal for the bActRI₂ amplification, a second round of amplification of 25 cycles of 55 sec at 95°C, 55 sec at 56°C and 90 sec at 72°C were performed using 1 µl of the first PCR reaction as template. Lane 1 and 7: 1 kb DNA ladder; lane 2 and 3 are negative amplification controls (40 µl of the second PCR amplification reaction using only primer 4 or primer 1000 respectively); lane 4: 40µl of the first PCR bActRI₂ amplification reaction; lane 5: 10 µl of the second round of PCR bActRI₂ amplification reaction; lane 6: 5 µl of the first PCR bActRI₁ amplification reaction.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

Le mécanisme d'action des récepteurs aux activines commence à être partiellement élucidé. Bien entendu, l'homologie que présentent les domaines intracellulaires des récepteurs aux activines avec les kinases spécifiques aux résidus de sérines et de thréonines fournissait déjà une bonne indication du mécanisme employé par ces récepteurs. Par conséquent, par analogie avec le mécanisme d'action des récepteurs à activité de tyrosine kinase, on peut en déduire que l'activation des récepteurs aux activines déclenche une cascade de réactions de phosphorylation. Par contre, étant donné la spécificité de phosphorylation de la kinase des récepteurs aux activines, de même que celle des autres récepteurs de la famille du TGF- β , leur mécanisme d'action serait probablement différent de celui des récepteurs à activité de tyrosine kinase. Jusqu'à présent, toutes les données relatives au mécanisme d'action des récepteurs aux activines convergent justement pour prouver l'existence d'une voie de signalisation intracellulaire encore inconnue.

En parallèle, plusieurs études suggèrent que les activines sont des joueurs importants dans les processus de reproduction chez les mammifères. C'est dans cet esprit que ces études doctorales furent amorcées. La caractérisation des récepteurs aux activines a été la voie empruntée pour comprendre davantage le fonctionnement de la signalisation des activines.

Le clonage et le séquençage des ADNc codant pour les récepteurs bActRI, bActRII et bActRIIB chez le bovin a conduit à cette première constatation, qui porte sur la forte homologie régnant entre les séquences d'acides aminés des récepteurs aux activines provenant de différentes espèces.

Les récepteurs de type II (i.e. bActRII et bActRIIB) ont une similarité de séquences beaucoup plus élevée lorsqu'ils sont comparés entre eux, que lorsqu'ils sont comparés avec les récepteurs de type I (bActRI ou avec ActRIB, isolé d'espèces différentes du bovin). Cette constatation s'applique à l'ensemble de la famille des récepteurs à activité de sérine et thréonine kinase; c'est-à-dire que deux sous-familles se démarquent clairement, soit une sous-famille de récepteurs de type I et une sous-famille de récepteurs de type II. La forte conservation de séquences des récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase au cours de l'évolution suggère que ces récepteurs doivent être impliqués dans des processus relativement importants. Cette conservation de séquence suggère également que ces récepteurs fonctionnent selon des mécanismes d'action similaires. Les études effectuées sur les complexes de signalisation du TGF- β et des activines confirment effectivement qu'il existe des ressemblances entre leurs mécanismes d'action. Néanmoins, le système de signalisation des activines doit nécessairement disposer de mécanismes exclusifs, lui permettant de transmettre ses signaux spécifiques.

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis de démontrer que l'ARNm des trois types de récepteurs aux activines étaient exprimés de façon ubiquiste dans les tissus bovins impliqués dans la reproduction. Donc, dans ces tissus, les récepteurs bActRI, bActRII et bActRIIB peuvent être simultanément présents à la surface des cellules qui sont la cible des activines. Ainsi, la transmission du signal des activines dans ces tissus reproducteurs ne serait pas l'apanage d'un type de récepteurs en particulier. Nous pouvons donc penser que ces trois types de récepteurs peuvent entrer dans la composition de complexes de transduction du signal des activines dans les tissus reproducteurs.

Il semble effectivement que les récepteurs aux activines, du moins le récepteur ActRII, transmettent des signaux d'importance assurant un maintien adéquat des fonctions de reproduction; ceci principalement chez la femelle. C'est la génération de souris mutante, dont le gène ActRII a été invalidé par recombinaison homologue [Matzuk *et al.*, 1995c], qui a fourni des données intéressantes sur le rôle *in vivo* d'ActRII dans les tissus reproducteurs. Les souris ayant une déficience en ActRII montraient une diminution marquée du niveau de FSH et les individus femelles avaient un cycle oestral anormal, ce qui se traduisait en infertilité.

Bien qu'aucune étude ne soit disponible pour démontrer un rôle *in vivo* dans les tissus reproducteurs pour les récepteurs ActRI et ActRIIB, il est fort probable que ces récepteurs soient également impliqués dans la transmission de signaux importants. De plus, l'identification d'isoformes, tant pour bActRI que pour bActRIIB, suggère que la quantité de complexes fonctionnellement différents formés à la surface cellulaire soit plus élevée que ne laisse prévoir le nombre de gènes de récepteurs aux activines. Ces isoformes pourraient être en fait responsables de la multitude de réponses attribuées aux activines.

L'ARNm de l'isoforme bActRI₁ a une extrémité 5' différente de l'ARNm de bActRI₂. L'extrémité 5' de l'isoforme bActRI₂ est en fait une copie complémentaire et inversée d'une séquence située dans la région 5' non-traduite de l'isoforme bActRI₁. Le mécanisme permettant de générer deux ARNm ayant de telles séquences inversées est malheureusement inconnu. D'après la séquence génomique du récepteur ActRI murin, cet événement semble impliquer les deux premiers exons. Chez l'isoforme bActRI₁, la

séquence réversible enjambe la fin de l'exon 1 et le début de l'exon 2, tandis que chez l'isoforme bActRI₂, la séquence réversible remplace la première partie de l'exon 2. Une modification post-transcriptionnelle par épissage alternatif du pré-ARNm de bActRI pourrait expliquer la génération des isoformes bActRI₁ et bActRI₂. Pour ce faire, le pré-ARNm doit arborer deux exons alternatifs pouvant faire office d'exon 2, lesquels possèdent chacun une des copies complémentaires et inversées (Fig.1). D'un autre côté, l'isoforme bActRI₂ pourrait tout simplement provenir d'une aberration chromosomique, phénomène souvent rencontré chez certains gènes mutés reliés à des maladies. Une autre explication, émise toutefois avec beaucoup de réserve, impliquerait un réarrangement programmé du gène de bActRI. Bien entendu, les exemples de réarrangement programmé de gènes ne sont pas courants chez les eucaryotes supérieurs. L'exemple le plus connu se retrouve dans le système immunitaire des mammifères; les gènes des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T subissent des réarrangements programmés, afin de créer une diversité accrue de molécules pour la reconnaissance des antigènes [Roitt, 1990]. Toutefois, l'inversion de séquences, comme celle détectée chez bActRI, n'est pas un des mécanismes utilisés pour réarranger les gènes des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T. Par contre, l'inversion de séquences de bActRI rappelle étrangement un processus décrit chez certaines bactéries ainsi que chez quelques bactériophages [Borst et Greaves, 1987]. Des segments d'ADN réversible sont présents sur les promoteurs de certains gènes pour ainsi contrôler l'expression génique. Des segments d'ADN réversible ont également été observés chez les eucaryotes et leurs virus, soit sur un plasmide circulaire de levures, ainsi que sur le duplexe d'ADN linéaire d'herpesvirus [Borst et Greaves, 1987]. Donc, l'inversion de séquences est un phénomène biologique qui existe, quoiqu'il semble très isolé.

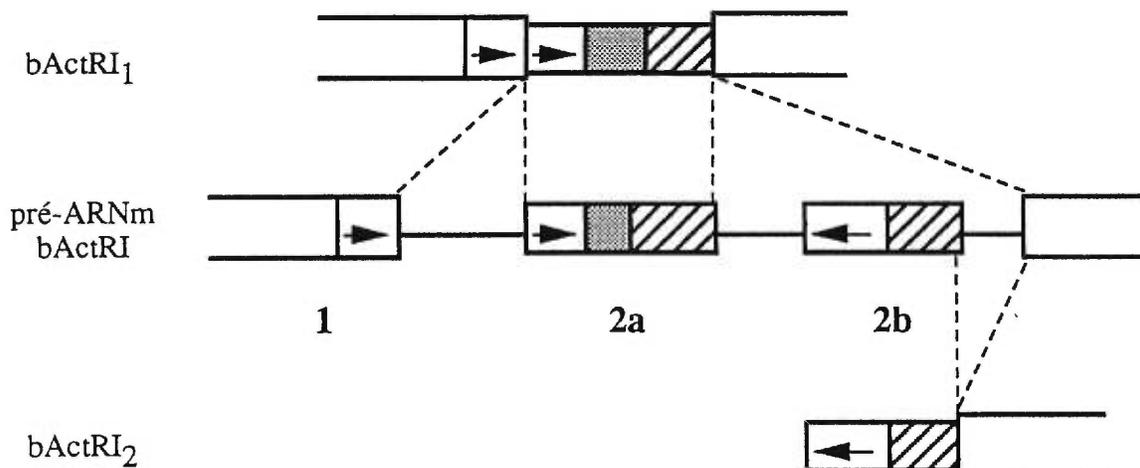


Fig.1 Modèle d'épissage alternatif suggéré pour la génération des isoformes bActRI₁ et bActRI₂. Dans ce modèle, le pré-ARNm de bActRI posséderait deux exons (exons 2a et 2b) pouvant se joindre à l'exon 3, selon un mode d'épissage alternatif d'exclusion mutuelle. L'extrémité 3' des exons 2a et 2b seraient identiques (boîtes hachurées). L'extrémité 5' de l'exon 2b serait une copie inversée de la séquence, formée par la jonction des exons 1 et 2a (double flèche pointant vers la droite). Par épissage alternatif, la jonction de l'exon 3 à l'exon 2a ou à l'exon 2b formerait respectivement les isoformes bActRI₁ et bActRI₂.

L'identification des isoformes bActRIIB₂ et bActRIIB₅ a mis en évidence une région riche en prolines qui permettrait à l'isoforme bActRIIB₂ d'avoir une interaction protéine-protéine avec des facteurs intracytoplasmiques de la machinerie de signalisation. Comme démontré dans l'article 2, cette région possède une séquence caractéristique de même que les propriétés d'interaction protéine-protéine propres aux sites de liaison aux domaines SH3.

Tous les récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase possèdent la même structure générale, c'est-à-dire qu'ils sont formés d'un domaine extracellulaire de liaison du ligand suivi d'un domaine transmembranaire et d'un domaine kinase. Pour tous ces récepteurs, les domaines transmembranaires et les domaines enzymatiques de la kinase sont joints par des séquences intermédiaires, auxquelles aucune fonction particulière n'a auparavant été assignée. Mais à ce jour, l'identification de domaines GS et d'un site potentiel de liaison aux domaines SH3, sur les séquences intermédiaires des récepteurs de type I et des récepteurs bActRII et bActRIIB respectivement, semble démontrer que ces séquences intermédiaires n'aient pas uniquement un rôle structural ou conformationnel. Ces séquences intermédiaires, positionnées entre les principaux domaines des récepteurs, auraient également un rôle à jouer dans le mécanisme de transmission des signaux intracellulaires. Hormis les domaines GS qui sont retrouvés chez tous les récepteurs de type I, les séquences intermédiaires ne sont que très peu homologues pour chacun des récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase. Ces régions pourraient conférer une spécificité d'activation de certains sentiers de signalisation intracellulaire.

La délétion par épissage alternatif de la région riche en prolines, comme un module fonctionnel, suggère évidemment que les isoformes bActRIIB₂ et bActRIIB₅ aient des fonctions distinctes ou du moins une capacité différente de transduction du signal. Quant à l'ARNm du récepteur ActRII, aucun événement d'épissage alternatif n'a été rapporté. Le récepteur bActRII conserverait donc toujours le site potentiel de liaison aux domaines SH3 et devrait se comporter fonctionnellement à la manière de l'isoforme bActRIIB₂.

Il devient donc intéressant de comparer deux études indépendantes, qui ont été effectuées sur des récepteurs ActRII dont le domaine intracellulaire était tronqué par manipulation génétique. La première étude utilisa un ActRII tronqué, qui conservait le site potentiel de liaison aux domaines SH3 [Tsuchida *et al.*, 1995]. Cette étude démontra que ce récepteur tronqué pouvait s'associer aux deux récepteurs ActRI et ActRIB. La deuxième étude utilisa un récepteur ActRII tronqué semblable à celui de l'étude précédente, mais cette fois-ci, le site potentiel de liaison aux domaines SH3 était absent [de Winter *et al.*, 1996b]. Ce récepteur, sans site de liaison aux domaines SH3, pouvait également avoir une association avec les récepteurs ActRI et ActRIB. Donc, le site potentiel de liaison aux domaines SH3 ne serait pas essentiel à la formation des interactions physiques entre les récepteurs de type I/IB et de type II/IIB dans les complexes de signalisation.

Tel que démontré dans l'article 2, ce site potentiel de liaison aux domaines SH3 de bActRIIB interagit avec des protéines intracellulaires de 69 kDa et de 71 kDa. Puisque ces molécules de 69 kDa et de 71 kDa se définissent pour l'instant comme des protéines interagissant avec les récepteurs aux activines, il est proposé de les nommer respectivement ARIP1 et ARIP2, pour "Activin Receptor Interacting Protein". La nature de ARIP1 et ARIP2 est

encore inconnue, mais étant donné que ces protéines montrent une interaction avec une séquence similaire aux sites de liaison aux domaines SH3, il est donc fort probable que ces protéines intracellulaires possèdent un domaine SH3, grâce auquel elles pourraient s'associer aux récepteurs ActRII et ActRIIB. De plus, il est possible que la protéine ARIP2 de 71 kDa soit un précurseur immature de ARIP de 69 kDa. La discussion de l'article 2 démontre clairement que ARIP1 et ARIP2 ne correspondent à aucune des protéines cytoplasmiques déjà identifiées comme ayant une interaction avec les récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase.

Ce n'est que la deuxième fois que des protéines intracellulaires sont identifiées comme pouvant s'associer avec un récepteur de type II à activité de sérine/thréonine kinase. La première protéine identifiée comme tel fut TRIP1 et semble n'interagir qu'avec T β RRII seulement. Quant à ARIP1 et à ARIP2, elles seraient des protéines spécifiques au mécanisme d'action des récepteurs ActRII et ActRIIB₂ puisque, de tous les récepteurs de la mégafamille du TGF- β , ils sont les seuls à posséder un site potentiel de liaison aux domaines SH3. Il est donc possible de penser que ARIP1 et ARIP2 seraient impliquées dans une voie de signalisation menant à une réponse particulière des activines. Il importe donc désormais de vérifier si l'isoforme bActRIIB₂, qui conserve le site d'interaction avec les protéines ARIP1 et ARIP2, est fonctionnellement différent de l'isoforme bActRIIB₅.

Depuis quelques années déjà, les substrats immédiats des récepteurs aux activines ont été recherchés, en vain. La nature des fonctions de ARIP1 et ARIP2 dans la transduction du signal des activines est encore inconnue. Il sera donc intéressant de vérifier si ARIP1 et ARIP2 subissent une

phosphorylation de la part des récepteurs de type II/IIB du complexe de signalisation. Le site potentiel de liaison aux domaines SH3 des récepteurs de type II/IIB pourrait servir à ancrer ARIP1 et ARIP2 afin de les présenter au domaine catalytique des récepteurs.

D'autre part, ARIP1 et ARIP2 pourraient agir en tant que protéines adaptatrices. Elles pourraient servir de point d'ancrage à des protéines cytoplasmiques, qui seraient des médiateurs ou des inhibiteurs de la signalisation.

En plus de déterminer le rôle de ARIP1 et ARIP2, il est primordial de connaître la distribution de leur expression. ARIP1 et ARIP2 n'ont pour l'instant été identifiées que dans des extraits de la lignée cellulaire Endo 8.3 d'endomètre utérin. D'après les études d'expression transcriptionnelle présentées dans les trois articles de cette thèse, les cellules lutéales bovines expriment l'ARNm des trois types de récepteurs aux activines. On devrait donc s'attendre à y retrouver la machinerie intracellulaire associée aux complexes de signalisation des récepteurs aux activines. Pourtant, les tentatives de purification des protéines ARIP1 et ARIP2, à partir de cellules lutéales en cultures, ont échoué. Était-ce ou non le reflet d'une expression différentielle *in vivo* des protéines ARIP1 et ARIP2? En répondant à cette question, il sera possible de déterminer si ARIP1 et ARIP2 font partie d'un mécanisme de signalisation spécifique aux cellules d'endomètre utérin ou bien au contraire, d'un mécanisme de signalisation plus général se retrouvant dans d'autres types cellulaires.

Malgré les efforts soutenus de plusieurs groupes de recherche étudiant les récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase, le mécanisme d'action des récepteurs aux activines n'est pas encore totalement défini. Néanmoins, il y a présentement un modèle tentant d'expliquer le mécanisme de base, qui est généralement accepté pour tous les récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase. Il est tout à fait plausible qu'un mécanisme de base soit commun à tous les récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase, puisque certaines réponses cellulaires peuvent être transmises par plus d'un type de récepteurs de la mégafamille du TGF- β . Par contre, certaines réponses sont spécifiques à chacun des systèmes de ligand-récepteur. En outre, les données recueillies dans cette thèse ainsi que des études précédentes suggèrent que les récepteurs de type II du TGF- β et des activines interagiraient avec des protéines intracytoplasmiques qui leur seraient propres, soit TRIP1 et ARIP1/ARIP2 respectivement. De plus, comme mentionné dans l'introduction, il semble que ActRI et ActRII peuvent transmettre des signaux différents. Donc, certaines réponses pourraient être spécifiquement transmises par des récepteurs en particulier. Ceci suggère donc qu'il existe des mécanismes spécifiques pour chaque système ligand-récepteur.

En fait, il ne serait pas étonnant de découvrir plusieurs voies de signalisation, par lesquelles les activines parviendraient à induire des réponses cellulaires. À la lumière des données bibliographiques disponibles et des résultats présentés dans cette thèse, il est maintenant possible de raffiner le modèle d'action des récepteurs aux activines (Fig.2).

L'activine se fixerait premièrement à un dimère de récepteurs de type II (ActRII ou ActRIIB) par l'entremise d'une de ses sous-unités β (Fig. 2a). Le

dimère ne serait composé que d'une seule espèce de récepteurs de type II. Le site de liaison aux domaines SH3, porté uniquement par les récepteurs ActRII et ActRIIB₂, serait occupé par ARIP1 ou ARIP2, dont le rôle reste encore à être déterminé. Les récepteurs ActRI et ActRIB, à l'état latent, seraient associés à FKBP12, lequel servirait de protéine adaptatrice pour juxtaposer une phosphatase cytoplasmique au domaine intracellulaire des récepteurs de type I. La phosphatase conserverait ces récepteurs dans un état hypophosphorylé inactif. En outre, contrairement au récepteur ActRI, le domaine intracellulaire de ActRIB serait associé à FT α (Fig. 2a).

La liaison de l'activine au récepteur de type II permettrait à la sous-unité β libre d'acquérir une conformation propice à la liaison aux récepteurs de type I (Fig. 2b). Donc, il y aurait recrutement d'un récepteur de type I (ActRI ou ActRIB), dont le domaine extracellulaire serait dorénavant occupé par la sous-unité β libre de l'activine dimérique. Puisque la stoechiométrie du complexe de signalisation n'est pas encore élucidée et pour des raisons de simplicité, le modèle présenté ne fait état de l'association que d'un seul récepteur de type I à l'homodimère de récepteurs de type II. Le complexe activine/ActRII (ou activine ActRIIB) pourrait recruter aussi bien ActRI que ActRIB.

Dès lors que le récepteur de type I est recruté dans le complexe de signalisation, il serait phosphorylé grâce à l'activité de kinase constitutive des récepteurs de type II (Fig. 2c). Cette phosphorylation se ferait principalement sur les résidus sérines et thréonines du domaine GS du récepteur de type I. La phosphorylation d'ActRI ou d'ActRIB induirait la relâche de FKBP12, ainsi que de la phosphatase associée. L'inhibition de l'activité du récepteur de type I par hypophosphorylation serait dès lors levée.

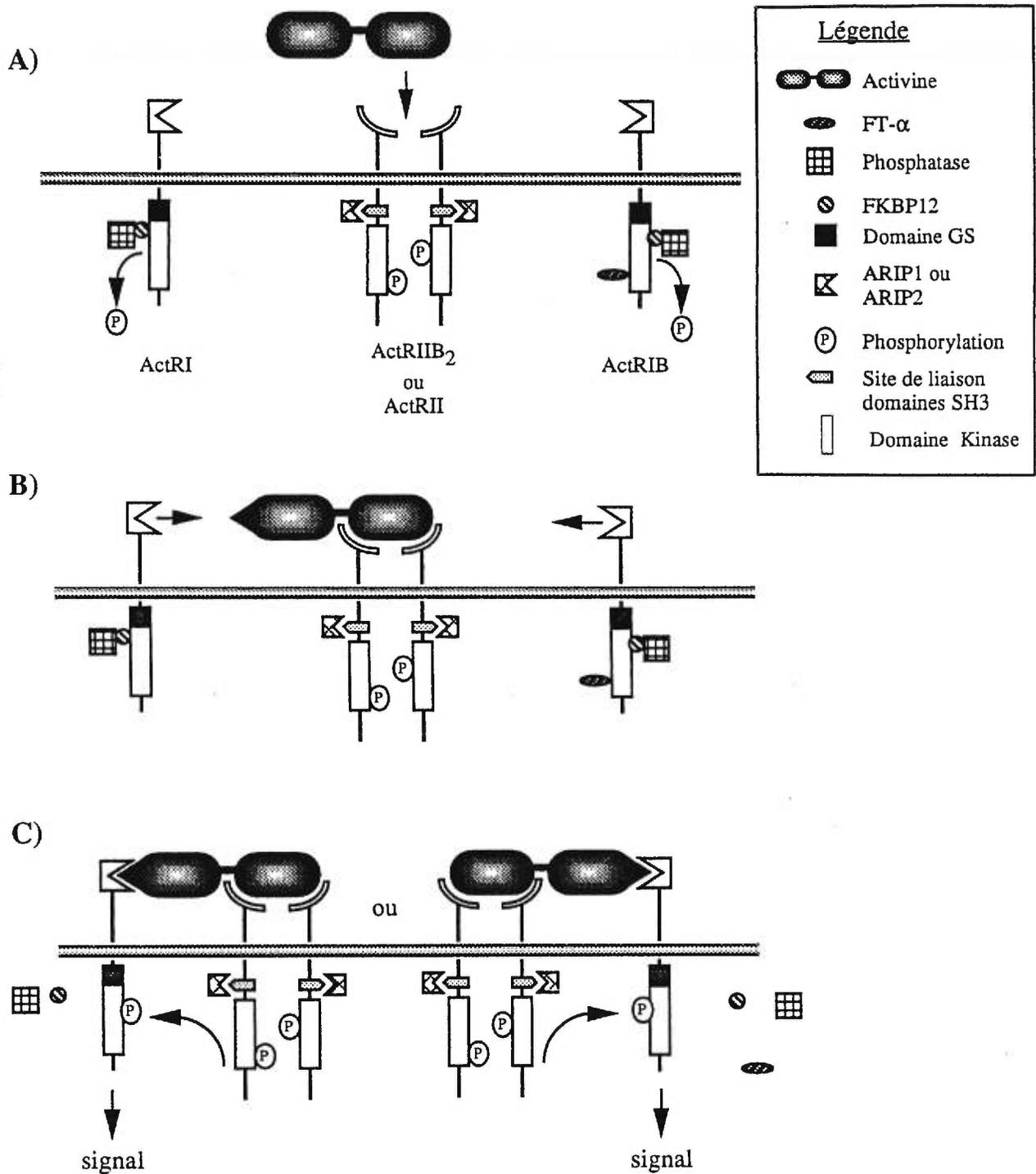


Fig.2 Représentation schématique d'un modèle expliquant le mécanisme d'action des récepteurs aux activines. Afin de ne pas surcharger l'explication, le modèle ne tient pas compte de toutes les interactions possibles entre les différents types et isoformes de récepteurs aux activines. Le modèle présente en 2C), la formation d'un complexe de signalisation entre les récepteurs ActRIIB2 (ou ActRII) et ActRI, de même qu'avec ActRIB. Voir le texte pour les explications.

ActRI et ActRIB seraient maintenant en mesure d'activer, probablement par phosphorylation, un médiateur cytoplasmique encore inconnu pour finalement déclencher une réponse cellulaire. D'autre part, lors de réponses spécifiques au récepteur ActRIB, l'activité de la kinase des récepteurs de type II induirait la phosphorylation du facteur cytoplasmique FT α , associé au récepteur ActRIB. Cette phosphorylation de FT α se ferait directement par le récepteur de type II/IIB ou par l'intermédiaire de kinases cytoplasmiques, associées au complexe de signalisation. Le récepteur ActRIB relâcherait alors FT α phosphorylé.

Comme mentionné précédemment, les signaux des activines parcourent probablement plus d'une voie intracellulaire de signalisation. Il a même été suggéré que les activines déclenchent certaines réponses cellulaires grâce à des médiateurs intracellulaires empruntés à la voie de signalisation des récepteurs à activité de tyrosine kinase. En ce sens, Kolodziejczyk et Hall [1996] ont revu en détail l'hypothèse intéressante voulant que certains signaux propagés par les récepteurs à activité de sérine/thréonine kinase convergent, grâce à l'intermédiaire d'une protéine G, vers les protéines RAS et RAF, ainsi que vers la cascade de kinases cytoplasmiques qui s'en suit.

De plus, les modèles tentant d'expliquer le mécanisme de transduction du signal des activines, devraient être révisés en tenant compte des protéines de liaison aux activines que sont la follistatine et l' α 2-M. Tel que mentionné dans l'introduction, ces protéines ne seraient pas uniquement des antagonistes de la réponse aux activines, comme il est présentement suggéré pour la follistatine, mais aussi des agonistes. La liaison des activines à la follistatine ou à l' α 2-M permettrait de moduler l'action des activines et ainsi permettre une

panoplie de réponses différentes selon le tissu ciblé. Il est possible de penser qu'il soit nécessaire que l'isoforme FS-288 de la follistatine forme un complexe avec l'activine, afin que cette dernière soit présentée adéquatement aux récepteurs aux activines de type II par l'entremise d'un récepteur-protéoglycane de type III.

D'autre part, la follistatine et les activines sont connues comme étant des protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire. Il a donc été inusité pour les groupes de Kogawa *et al.* [1991] et de Shaha *et al.* [1989] de constater que les protéines de la follistatine et de la sous-unité inhibine β_A étaient immunodétectées dans le noyau de cellules germinales. Ceci laisse donc supposer que ces deux facteurs auraient une action intracellulaire ou même intranucléaire directe, en plus de transmettre des signaux intracellulaires par l'entremise de récepteurs membranaires. Faute de données claires à ce sujet, il est malheureusement impossible de décrire pour le moment le mécanisme précis permettant l'internalisation de ces protéines. Il n'en demeure pas moins que l'on peut construire une hypothèse intéressante expliquant la présence d'activines et de follistatines dans le noyau cellulaire. Tout d'abord, comme proposé ci-dessus, le complexe activine-follistatine (FS-288) se lierait aux protéoglycanes de la surface cellulaire. Par la suite, au lieu d'être présenté aux récepteurs de type II, le complexe ligand/récepteur-protéoglycane serait internalisé pour ainsi relâcher l'activine et la follistatine, qui seraient éventuellement distribuées dans les compartiments intracellulaires appropriés. Ce phénomène ressemblerait en quelque sorte à une endocytose dépendante de récepteurs, comme dans le cas des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (LDL) [Bu et Schwartz, 1994].

Cependant, à l'encontre des hypothèses proposées ci-dessus, les études *in vitro* ont jusqu'ici toujours démontré un effet antagoniste de la part de la follistatine sur l'action des activines. Ceci pourrait néanmoins s'expliquer par le fait que les préparations de follistatine utilisée étaient principalement composées d'isoformes ne pouvant se fixer à la matrice cellulaire, causant ainsi une diminution de la concentration de molécules d'activine disponibles pour la liaison aux récepteurs de type II.

En plus des protéines de liaison aux activines, il est fort probable que la modulation de l'activité des activines implique d'autres mécanismes de contrôle. La découverte de plusieurs isoformes des récepteurs bActRI et bActRIIB, de même que pour le récepteur ActRIIB chez l'humain [Xu *et al.*, 1994], suggère qu'une cellule ait le potentiel de produire une panoplie d'isoformes de récepteurs. La cellule peut donc présenter à sa surface cellulaire, par différentes combinaisons d'isoformes de récepteurs, une grande variété de complexes de signalisation lui permettant de recevoir différents messages. De plus, la modulation de l'expression, tant spatiale que temporelle, des facteurs intracellulaires impliqués dans la signalisation des activines, permettrait également de moduler l'activité des activines.

Les études disponibles jusqu'à maintenant, ne font pas état des différences d'activité qui pourraient exister entre les 3 formes d'activines connues. Pourtant, dans le système des TGF- β , il a été démontré qu'il y avait une variation significative de l'activité biologique entre les trois formes de TGF- β [Cheifetz *et al.*, 1991; Merwin *et al.*, 1991; Qian *et al.*, 1992]. Il est donc plausible que les activines A, AB et B aient des activités différentes. De plus, vu la variété de récepteurs aux activines disponibles, il est possible que

certaines formes d'activines aient une préférence pour des complexes de récepteurs en particulier.

Finalement, comme mentionné dans l'introduction, certains indices remettent en question la spécificité de liaison des récepteurs aux activines. L'exemple le plus probant provient des souris dont le gène ActRII a été invalidé par recombinaison homologue [Matzuk *et al.*, 1995c]. Si ActRII ne transmettait que les signaux des activines, il aurait été normal que les souris ayant une déficience en récepteur ActRII aient des phénotypes qui recourent les phénotypes des souris ayant une déficience en sous-unité inhibine/activine β . Or, au contraire, ces deux types de souris ne montraient qu'une faible corrélation de phénotypes. En outre, les souris ayant une déficience en récepteur ActRII affichaient davantage de traits phénotypiques que celles n'exprimant plus la sous-unité β . Donc, le récepteur bActRII, et par extension bActRI et bActRIIB, seraient non seulement des récepteurs pour les activines A, AB et B, mais pourraient également transmettre le message d'une panoplie de facteurs extracellulaires supplémentaires. D'autre part, il est possible qu'il existe des complexes de signalisation spécifiques aux activines. Cette spécificité serait possible grâce à des composantes supplémentaires qui prendraient la forme d'un récepteur aux activines de type III ou de tout autre molécule membranaire auxiliaire.

CONCLUSION

La perception actuelle du mécanisme de signalisation des activines n'est malheureusement qu'une vision simpliste et même plutôt réductrice du processus. Le contrôle de ce mécanisme de signalisation est probablement plus complexe que ne laissent entrevoir les données bibliographiques disponibles. La mise à jour d'une pluralité d'isoformes pour les récepteurs bActRI et bActRIIB permet d'ores et déjà d'estimer cette complexité. De plus, il est tout à fait acceptable de penser que le processus de signalisation fasse appel à d'autres facteurs et mécanismes encore inconnus. En ce sens, les protéines intracellulaires ARIP1 et ARIP2, identifiées lors de ces études, font probablement partie du complexe de signalisation des récepteurs aux activines. Il est certain que beaucoup de travail et d'acharnement sont encore nécessaires avant que ne soit complètement élucidé le fonctionnement de la machinerie moléculaire impliquée dans la transduction et la propagation du signal intracellulaire des activines. Les années à venir devraient permettre de découvrir les pièces manquantes du casse-tête.

BIBLIOGRAPHIE

Albano RM, Groome N, Smith JC 1993 Activins are expressed in preimplantation mouse embryos and in ES and EC cells and are regulated on their differentiation. *Development* 117:711-723

Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massagué J 1992 Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* 68:97-108

Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FMB, Massagué J, Wrana JL 1993 Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75:671-680

Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massagué J 1996 Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 16:1066-1073

Baker JC, Harland RM 1996 A novel mesoderm inducer, *Madr2*, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev* 10:1880-1889

Bilezikjian LM, Vale WW 1992 Local extragonadal roles of activins. *Trends endocrinol metab* 3:218-223

Borst P, Greaves DR 1987 Programmed gene rearrangements altering gene expression. *Science* 235:658-666

Bu G, Schwartz AL 1994 Receptor-mediated endocytosis. Dans: The liver: Biology and pathobiology, 3^e édition, éditeurs: M Arias, JL Boyer, N Fausto, WB Jakoby, DA Schachter, DA Shafritz, Raven Press Ltd, New York, pp.259-274

Cameron VA, Nishimura E, Mathews LS, Lewis KA, Sawchenko PE, Vale WW 1994 Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. *Endocrinology* 134:799-808

Carcamo J, Weis FMB, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massagué J 1994 Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor β and activin. *Mol Cell Biol* 14:3810-3821

Cheifetz JC, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massagué J 1991 Distinct transforming growth factor- β subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF- β isoforms. *J Biol Chem* 265:20533-20538

Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M 1992 Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027-19030

Chen R-H, Derynck R 1994 Homomeric interactions between type II transforming growth factor- β receptors. *J Biol Chem* 269:22868-22874

Chen Y, Lebrun J-J, Vale W 1996a Regulation of transforming growth factor β - and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12992-12997

Chen X, Rubock MJ, Whitman M 1996b A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signalling. *Nature* 383:691-696

Childs SR, Wrana JL, Aroba K, Attisano L, O'Connor MB, Massagué J 1993 Identification of a *Drosophila* activin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9475-9479

Crookston KP, Webb DJ, Wolf BB, Gonias SL 1994 Classification of α 2-macroglobulin-cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. *J Biol Chem* 269:1533-1540

de Kretser DM, Foulds LM, Hancock M, McFarlane J, Goss N, Jenkin G 1994 The isolation of activin from ovine amniotic fluid. *Endocrinology* 134:1231-1237

DePaolo LV, Bicsak TA, Erickson GF, Shimasaki S, Ling N 1991 Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:500-512

Derynck R 1994 TGF- β -receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 19:548-553

de Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJM, van Achterberg TAE, Sugino H, de Waele P, Huylebroeck D, Verschueren K, van den Eijnden-van Raaij AJM 1996a Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* 116:105-114

de Winter JP, de Vries CJM, van Achterberg TAE, Ameerun RF, Feijen A, Sugino H, de Waele P, Huylebroeck D, Verschueren K, van den Eijnden-van Raaij AJM 1996b Truncated activin type II receptors inhibit activin bioactivity by the formation of heteromeric complexes with activin type I receptors. *Exp Cell Res* 224:323-334

Donaldson CJ, Mathews LS, Vale WW 1992 Molecular cloning and binding properties of the human type II activin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184:310-316

Ebner R, Chen R-H, Chum L, Lawler S, Zioncheck TF, Lee A, Lopez AR, Derynck R 1993a Cloning of a type I TGF- β receptor and its effect on TGF- β to the type II receptor. *Science* 260:1344-1348

Ebner R, Chen R-H, Chum L, Lawler S, Zioncheck TF, Derynck R 1993b Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 262:900-902

Fang J, Yin W, Smiley E, Wang SQ, Bonadio J 1996 Molecular cloning of the mouse activin β_E subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun* 228:669-674.

Feige JJ, Negoescu A, Keramidas M, Souchelniskiy S, Chambaz EM 1996a α 2-macroglobulin: a binding protein for TGF β and various cytokines. *Horm Res* 45:227-232

Feige JJ, Quirin N, Souchelnitskiy S 1996b TGF β , un peptide biologique sous contrôle: formes latentes et mécanismes d'activation. *Médecine/Sciences* 12:929-939

Feng Z-M, Madigan MB, Chen C-LC 1993 Expression of type II activin receptor genes in the male and female reproductive tissues of the rat. *Endocrinology* 132:2593-2600

Findlay JK 1993 An updates on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod* 48:15-23

Forage RG, Ring JM, Brown RW, McInerney BV, Cobon GS, Gregson RP, Robertson DM, Morgan FJ, Hearn MTW, Findlay JK, Wettenhall REH, Burger HG, de Kretser DM 1986 Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3091-3095

Gaddy-Kurten D, Hickey G, Fey G, Gauldie J, Richards J 1989 Hormonal regulation and tissue-specific localization of α 2-macroglobulin in rat ovarian follicles and corpora lutea. *Endocrinology* 125:2985-2995

Graff JM, Bansal A, Melton DA 1996 *Xenopus* Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF- β superfamily. *Cell* 85:479-487

Gray AM, Mason AJ 1990 Requirement for activin A and transforming growth factor- β 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247:1328-1330

Heldin C-H 1995 Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223

Hemmati-Brivanlou A, Melton DA 1992 A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 359:609-614

He WW, Gustafson ML, Hirobe S, Donahoe PK 1993 Developmental expression of four novel serine/threonine kinase receptors homologous to the activin/transforming growth factor- β type II receptor family. *Dev Dyn* 196:133-142

Hildén K, Tuuri T, Erâmaa M, Ritvos O 1994 Expression of type II activin receptor genes during differentiation of human K562 cells and cDNA cloning of the human type IIB activin receptor. *Blood* 83:2163-2170

Hillier SG et Miró F 1993 Inhibin, activin, and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. *Annals NY Acad Sci* 687:29-38

Hino M, Tojo A, Miyazono K, Miura Y, Chiba S, Eto Y, Shibai H, Takaku F 1989 Characterization of cellular receptors for erythroid differentiation factor on murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 264:10309-10314

Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, Wrana JL 1996 MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85:489-500

Hötten G, Neidhardt H, Schneider C, Pohl J 1995 Cloning of a new member of the TGF- β family: a putative new activin β_C chain. *Biochem Biophys Res Commun* 206:608-613

Houde A, Lussier JG, Ethier J-F, Gagnon C, Silversides DW 1994 Cloning and tissue expression of bovine follistatin cDNA. *Mol Rep Dev* 37:391-397

Hully JR, Chang L, Schwall RH, Widmer HR, Terrell TG, Gillett NA 1994 Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A. *Hepatology* 20:854-861

Ichijo H, Yamashita H, ten Dijke P, Eto Y, Heldin C-H, Miyazono K 1993 Characterization of *in vivo* phosphorylation of activin type II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 194:1508-1514

James K 1990 Interactions between cytokines and α_2 -macroglobulin. *Immunol Today* 11:163-166

Jenkin G, McFarlane J, de Kretser DM 1995 Inhibin and activin in embryonic and fetal development in ruminants. *J Rep Fert suppl.*49:177-186

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K, Engel ME, Moses HL 1995 Interaction of the transforming growth factor- β type I receptor with farnesyl-protein transferase- α . *J Biol Chem* 270:29628-29631

Kingsley DM 1994 The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133-146

Kogawa K, Ogawa K, Hayashi Y, Nakamura T, Titani K, Sugino H 1991 Immunohistochemical localization of follistatin in rat tissues. *Endocrinol Jpn* 38:383-391

Kolodziejczyk SM, Hall BK 1996 Signal transduction and TGF- β superfamily receptors. *Biochem Cell Biol* 74:299-314

Kondo M, Tashiro K, Fujii G, Asano M, Miyoshi R, Yamada R, Muramatsu M, Shiokawa K 1991 Activin receptor mRNA is expressed early in *Xenopus* embryogenesis and the level of the expression affects the body axis formation. *Biochem Biophys Res Commun* 181:684-690

Koseki T, Yamato K, Krajewski S, Reed JC, Tsujimoto Y, Nishihara T 1995 Activin A-induced apoptosis is suppressed by BCL-2. *FEBS Lett* 376:247-250

Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzman G, Cox ET, Baly DL, Mann E, Garg S, Wong W-L, Cossum P, Mather JP 1993 Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology* 132:431-443

LaPolt PS, Soto D, Su J-G, Campen CA, Vaughan J, Vale W, Hsueh AJW 1989 Activin stimulation of inhibin secretion and messenger RNA levels in cultured granulosa cells. *Mol Endocrinol* 3:1666-1673

Legerski R, Zhou X, Dresback J, Eberspaecher H, McKinney S, Segarini P, de Crombrughe B 1992 Molecular cloning and characterization of a novel rat activin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 183:672-679

Letourneur O, Goetschy J-F, Horisberger M, Grütter MG 1996 Ligand-induced dimerization of the extracellular domain of the TGF- β receptor type II. *Biochem Biophys Res Commun* 224:709-716

Ling N, Ying S-Y, Ueno N, Esch F, Denoroy L, Guillemin R 1985 Isolation and partial characterization of Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7217-7221

Ling N, Ying S-Y, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R 1986 Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321:779-782

Lin HY, Moustakas A, Knauss P, Wells RG, Henis YI, Lodish HF 1995 The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)- β receptor. *J Biol Chem* 270:2747-2754

Li R, Phillips DM, Mather JP 1995 Activin promotes ovarian follicles development *in vitro*. *Endocrinology* 136:849-856

Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, Massagué J 1996 A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381:620-623

López-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massagué J 1991 Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 67:785-795

López-Casillas F, Wrana JL, Massagué J 1993 Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell* 73:1435-1444

Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying S-Y, Guillemin R, Niall H, Seeburg PH 1985 Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- β . *Nature* 318:659-663

Mason AJ, Berkemeier LM, Schmelzer CH, Schwall RH 1989 Activin B: precursor sequences, genomic structure and *in vitro* activities. *Mol Endocrinol* 3:1352-1358

Mason AJ, Farnworth PG, Sullivan J 1996 Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Mol Endocrinol* 10:1055-1065

Mather JP, Attie KM, Woodruff TK, Rice GC, Philips DM 1990 Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis. *Endocrinology* 127:3206-3214

Mather JP, Woodruff TK, Krummen LA 1992 Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc Soc Exp Biol Med* 201:1-15

Mather JP, Roberts PE, Krummen LA 1993 Follistatin modulates activin activity in a cell- and tissues-specific manner. *Endocrinology* 132:2732-2734

Mathews LS 1994 Activin receptors and cellular signalling by the receptor serine kinase family. *Endocrine Rev* 15:310-325

Mathews LS, Vale WW 1991 Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65:973-982

Mathews LS, Vale WW 1993 Characterization of type II activin receptors. *J Biol Chem* 268:19013-19018

Mathews LS, Vale WW, Kintner CR 1992 Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in xenopus embryos. *Science* 255:1702-1705

Matsuzaki K, Xu J, Wang F, McKeehan WL, Krummen L, Kan M 1993 A widely expressed transmembrane serine/threonine kinase that does not bind activin, inhibin, transforming growth factor β , or bone morphogenic factor. *J Biol Chem* 268:12719-12723

Matzuk MM 1995 Functional analysis of mammalian members of the transforming growth factor- β superfamily. *Trends Endocrin Metab* 6:120-127

Matzuk MM, Lu N, Vogel H, Sellheyer K, Roop DR, Bradley A 1995a Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* 374:360-363

Matzuk MM, Kumar TR, Vassalli A, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R, Bradley A 1995b Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 374:354-356

Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A 1995c Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374:356-360

McCarthy SA, Bicknell R 1994 Activin-A binds to a heterotrimeric receptor complex on the vascular endothelial cell surface. *J Biol Chem* 269:3909-3912

McCullagh DR 1932 Dual endocrine control of the testes. *Science* 76:19-20

Mercado M, Shimasaki S, Ling N, DePaolo L 1993 Effects of estrous cycle stage and pregnancy on follistatin gene expression and immunoreactivity in rat reproductive tissues: progesterone is implicated in regulating uterine gene expression. *Endocrinology* 1332:1774-1781

Merwin JR, Newman W, Beall LD, Tucker A, Madri J 1991 Vascular cells respond differentially to transforming growth factor beta 1 and beta 2 *in vitro*. Am J Pathol 138:37-51

Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W 1988 Gonadal and extragonadal expression of inhibin α , β_A , β_B subunits in various tissues predicts diverse functions. Proc Natl Acad Sci USA 85:247-251

Michel U, Albiston A, Findlay JK 1990 Rat follistatin: gonadal and extragonadal expression and evidence for alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun 173:401-407

Michel U, Farnworth P, Findlay JK 1993 Follistatins: more than follicle-stimulating hormone suppressing proteins. Mol Cell Endocrinol 91:1-11

Minegishi T, Tano M, Nakamura K, Karino S, Miyamoto K, Ibuki Y 1995 Regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. Mol Cell Endocrinol 108:67-73

Miró F, Hillier SG 1992 Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab 75: 1556-1561

Miró F, Hillier SG 1996 Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. Endocrinology 137:464-468

Miyamoto K, Hasegawa Y, Fukuda M, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H 1985 Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1513-1519

Moustakas A, Lin HY, Henis YI, Plamondon J, O'Connor-McCourt MD, Lodish HF 1993 The transforming growth factor β receptors types I,II, III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand. *J Biol Chem* 268:22215-22218

Mulder KM, Morris SL 1992 Activation of p21^{ras} by transforming growth factor β in epithelial cells. *J Biol Chem* 267:5029-5031

Murata M, Eto Y, Shibai H, Sakai M, Muramatsu M 1988 Erythroid differentiation factor is encoded by the same mRNA as that of the inhibin beta A chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2434-2438

Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H 1990 Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247:836-838

Nakamura T, Sugino K, Titani K, Sugino H 1991 Follistatin, an activin-binding protein, associates with heparan sulfate chains of proteoglycans on follicular granulosa cells. *J Biol Chem* 266:19432-19437

Nakamura T, Asashima M, Eto Y, Takio K, Uchiyama H, Moriya N, Ariizumi T, Yashiro T, Sugino K, Titani K, Sugino H 1992a Isolation and characterization of native activin-B. *J Biol Chem* 267:16385-16389

Nakamura T, Sugino K, Kurosawa N, Sawai M, Takio K, Eto Y, Iwashita S, Muramatsu M, Titani K, Sugino H 1992b Isolation and characterization of activin receptor from mouse embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem* 267:18924-18928

Nakamura M, Minegishi T, Hasegawa Y, Nakamura K, Igarashi S, Ito I, Shinozaki H, Miyamoto K, Eto Y, Ibuki Y 1993 Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expression in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 133:538-544

Nishihara T, Okahashi N, Ueda N 1993 Activin A induces apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 197:985-991

Nishimatsu S, Oda S, Murakami K, Ueno 1992 Multiple genes for *Xenopus* activin receptor expressed during early embryogenesis. *FEBS Lett* 303:81-84

Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, Yamashita H, Enomoto S, Miyazono K 1996 Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* 271:21345-21352

Oda S, Nishimatsu S, Murakami K, Ueno N 1995 Molecular cloning and functional analysis of a new activin β subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun* 210:581-588

Qian SW, Burmester JK, Merwin JR, Madri JA, Sporn MB, Roberts AB 1992 Identification of a structural domain that distinguishes the actions of type 1 and 2 isoforms of transforming growth factor β on endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 89:6290-6294

Rivier J, Spiess J, McClintock R, Vaughan J, Vale W 1985 Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. Biochem Biophys Res Commun 133:120-127

Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MTW, Burger HG, Wettenhall REH, de Kretser DM 1985 Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. Biophys Res Commun 126:220-226

Roberts VJ, Barth S, El-Roeiy A, Yen SSC 1993 Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 77:1402-1410

Roitt Y 1990 Immunologie. Éditions Pradel, Paris, 287 p.

Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun C-Y, Baird SE, Padgett RW 1996 *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. Proc Natl Acad Sci USA 93:790-794

Schwall R, Schmelzer CH, Matsuyama E, Mason AJ 1989 Multiple actions of recombinant activin-A *in vivo*. Endocrinology 125:1420-1423

Schwall RH, Robbins K, Jardieu P, Chang L, Lai C, Terrell TG 1993
Activin induces cell death in hepatocytes *in vivo* and *in vitro*. *Hepatology*
18:347-356

Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM 1995
Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required
for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139:1347-
1358

Shaha C, Morris PL, Chen C-LC, Vale W, Bardin CW 1989
Immunostainable inhibin subunits are in multiple types of testicular cells.
Endocrinology 125:1941-1950

Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S, Ling N, 1991 Follistatin binds to
both activin and inhibin through the common beta-subunit. *Endocrinology*
128:3313-3315

Shukovski L, Findlay JK 1990 Activin-A inhibits oxytocin and progesterone
production by preovulatory bovine granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology*
126:2222-2224

Shukovski L, Zhang ZW, Michel U, Findlay JK 1992 Expression of mRNA
for follicle-stimulating hormone suppressing protein in ovarian tissues of
cows. *Reprod Fert* 95:861-867

Shukovski L, Dyson M, Findlay JK 1993 The effects of follistatin, activin and inhibin on steroidogenesis by bovine thecal cells. *Mol Cell Endocrinol* 97:19-27

Sugino H, Nakamura T, Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Igarashi M, Eto Y, Shibai H, Titani K 1988 Erythroid differentiation factor can modulate follicular granulosa cell functions. *Biochem Biophys Res Commun* 153:281-288

Sugino K, Nakamura T, Takio K, Miyamoto K, Hasegawa Y, Igarashi M, Titani K, Sugino H 1992 Purification and characterization of high molecular weight forms of inhibin from bovine follicular fluid. *Endocrinology* 130:789-796

Sugino K, Kurosawa N, Nakamura T, Takio K, Shimasaki S, Ling N, Titani K, Sugino H 1993 Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. *J Biol Chem* 268:15579-15587

Takumi T, Moustakas A, Lin H, Lodish HF 1995 Molecular characterization of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF- β and activin in the rat pituitary tumor cell line GH3. *Exp Cell Res* 216:208-214

ten Dijke P, Ichijo H, Franzén P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin C-H, Miyazono K 1993 Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8:2879-2887

ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, Heldin C-H 1994a Characterization of type I receptors for transforming growth factor- β and activin. *Science* 264:101-104

ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin C-H, Miyazono K 1994b Identification of type I receptor for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269:16985-16988

ten Dijke P, Miyazono K, Heldin C-H 1996 Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* 8:139-145

Thomsen G, Woolf T, Sokol WS, Vaughan J, Vale W, Melton DA 1990 Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell* 63:485-493

Torney AH, Robertson DM, Hodgson YV, de Kretser DM 1990 In vitro bioactive and immunoactive inhibin concentrations in bovine fetal ovaries and testes throughout gestation. *Endocrinology* 127 2938-2946

Torney AH, Robertson DM, de Kretser DM 1992 Characterisation of inhibin and related proteins in bovine fetal testicular and ovarian extracts: evidence for the presence of inhibin subunit products and FSH-suppressing protein. *J Endocrinol* 133:111-120

Travis J, Salvensen G 1983 Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* 52:655-709

Tsuchida K, Mathews LS, Vale WW 1993 Cloning and characterization of a transmembrane serine kinase that acts as an activin type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11242-11246

Tsuchida K, Vaughan JM, Wiater E, Gaddy-Kurten D, Vale WW 1995 Inactivation of activin-dependent transcription by kinase-deficient activin receptors. *Endocrinology* 136:5493-5503

Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J 1986 Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321:776-779

Vale W, Hsueh A, Rivier C, Yu J 1990 The inhibin/activin family of hormones and growth factors. Dans: *Peptide growth factors and their receptors: Handbook of Experimental Physiology*, Éditeurs: Sporn MA, Roberts AB, Springer-Verlag, Berlin, vol 95:211-248

van Dissel Emiliani FM, Grootenhuis AJ, de Jong FH, de Rooij DG 1989 Inhibin reduces spermatogonial numbers in testes of adult mice and Chinese hamsters. *Endocrinology* 125:1899-1903

Vassalli A, Matzuk MM, Gardner HAR, Lee K-F, Jaenisch R 1994 Activin/inhibin β_B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes Develop* 8:414-427

Vaughan JM, Vale WW 1993 α 2-macroglobulin is a binding protein of inhibin and activin. *Endocrinology* 132:2038-2050

Ventura F, Doody J, Liu F, Wrana JL, Massagué J 1994 Reconstitution and transphosphorylation of TGF- β receptor complexes. *EMBO J* 13:5581-5589

Ventura F, Liu F, Doody J, Massagué J 1996 Interaction of transforming growth factor- β receptor I with farnesyl-protein transferase- α in yeast and mammalian cells. *J Biol Chem* 271:13931-13934

Wada M, Shintani Y, Kosaka M, Sano T, Hizawa K, Saito S 1996 Immunohistochemical localization of activin A and follistatin in human tissues. *Endocrine J* 43:375-385

Wang X-F, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA 1991 Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell* 67:797-805

Wang T, Donahoe PK, Zervos AS 1994 Specific interaction of type I receptors of the TGF- β family with immunophilin FKBP-12. *Science* 265:674-676

Wang T, Li B-Y, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK 1996a The immunophilin FKBP12

functions as a common inhibitor of the TGF β family type I receptors. *Cell* 86:435-444

Wang T, Danielson PD, Li B-Y, Shah PC, Kim SD, Donahoe PK 1996b The p21 RAS farnesyltransferase α subunit in TGF- β and activin signaling. *Science* 271:1120-1122

Watabe T, Kim S, Candia A, RothbÄcher U, Hashimoto C, Inoue K, Cho K W Y 1995 Molecular mechanisms of Spemann's organizer formation: conserved growth factor synergy between *Xenopus* and mouse. *Genes Dev* 9:3038-3050

Weber H, Holewa B, Jones EA, Ryffel GU 1996 Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: identification of the HNF4-binding site as an activin A responsive element in the *Xenopus* HNF1a promoter. *Development* 122:1975-1984

Whitman M, Melton DA 1992 Involvement of p21^{ras} in *Xenopus* mesoderm induction. *Nature* 357:252-254

Willis SA, Zimmerman CM, Li L, Mathews LS 1996 Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Mol Endocrinol* 10:367-379

Woodruff TK, Meunier H, Jones PBC, Hsueh AJW, Mayo KE 1987 Rat inhibin: molecular cloning of α - and β -subunit complementary

deoxyribonucleic acids and expression in the ovary. *Mol Endocrinol* 1:561-568

Woodruff TK, Lyon RJ, Hansen SE, Rice GC, Mather JP 1990 Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 127:3196-3205

Woodruff TK, Krummen LA, Chen S, DeGuzman G, Lyon R, Baly DL, Allison DE, Garg S, Wong WL, Hebert N, Mather JP, Cossum P 1993a Pharmacokinetic profile of recombinant human (rh) inhibin A and activin A in the immature rat. I. Serum profile of rh-inhibin A and rh-activin A in the immature female rat. *Endocrinology* 132:715-724

Woodruff TK, Krummen L, Chen SA, Lyon R, Hansen SE, DeGuzman G, Covello R, Mather J, Cossum P 1993b Pharmacokinetic profile of recombinant human (rh) inhibin A and activin A in the immature rat. II. Tissue distribution of [¹²⁵I]rh-inhibin A and [¹²⁵I]rh-activin A in immature female and male rats. *Endocrinology* 132:725-734

Woodruff TK, Krummen L, McCray G, Mather JP 1993c In situ ligand binding of recombinant human [¹²⁵I] activin-A and recombinant human [¹²⁵I] inhibin-A to the adult rat ovary. *Endocrinology* 133:2998-3006

Woodruff TK, Mather JP 1995 Inhibin, activin and the female reproductive axis. *Annu Rev Physiol* 57:219-244

Xiao S, Robertson DM, Findlay JK 1992 Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/folistatin on FSH receptors

and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131:1009-1016

Xu J, Matsuzaki K, McKeehan K, Wang F, Kan M, McKeehan WL 1994 Genomic structure and cloned cDNAs predict that four variants in the kinase domain of serine/threonine kinase receptors arise by alternative splicing and poly(A) addition. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7957-7961

Xu J, McKeehan K, Matsuzaki K, McKeehan WL 1995 Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. *J Biol Chem* 270:6308-6313

Xu J, Liao L, McKeehan K, McKeehan WL 1996 Kinase-inactive splice variants of the activin type I receptor. *In Vitro Cell Dev Biol* 32:131-134

Yamashita H, ten Dijke P, Franzén P, Miyazono K, Heldin C-H 1994 Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 269:20172-20178

Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath K, Andries M, Smith JC, Heldin C-H, Miyazono K 1995 Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130:217-226

Zhang Y, Feng X-H, Wu R-Y, Derynck R 1996 Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature* 383:168-172