

Université de Montréal

**MÉCANISME D'ACTION DE PTX1, UN FACTEUR  
DE TRANSCRIPTION À HOMÉODOMAINE.**

par

Jacques Tremblay

**Programme de biologie moléculaire**

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en biologie moléculaire

août, 1998

© Jacques Tremblay, 1998



QH  
506  
U54  
1999  
V.009

Centre de Recherche

MÉCANISME D'ACTION DE RTX1, UN FACTEUR  
DE TRANSCRIPTION À HOMÉODOMAINES

par

Jean-Louis Verdier

Programme de biologie moléculaire  
à l'Université de la Saskatchewan

Thèse présentée à la Faculté des sciences

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en biologie (M.Sc.)

en biologie moléculaire

1999

© Jean-Louis Verdier, 1999



**IDENTIFICATION DU JURY.**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Mécanisme d'action de Ptx1, un facteur de transcription à homéodomaine.**

présentée par:

Jacques Tremblay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Guy Sauvageau  
Jacques Droien  
Muriel Aubry  
Jacques Limard  
Louise Limard

Thèse acceptée le: 99-03-25

*A ceux qui me sont chers,*



## SOMMAIRE

L'hypophyse est composée de six types cellulaires distincts qui apparaissent à des stades bien définis au cours du développement de cet organe. L'hypophyse constitue ainsi un excellent modèle pour l'étude de l'expression des gènes durant l'organogenèse et la différenciation cellulaire. Plusieurs facteurs de transcription importants au développement et la fonction de cette glande ont été identifiés au cours des dernières années. Étonnamment, plusieurs, dont Ptx1 isolé dans notre laboratoire, sont des facteurs à boîte homéo. Ces facteurs de transcription sont bien connus pour leurs importances dans le développement et la différenciation cellulaire, les mieux caractérisés étant les membres du complexe Hox. L'homéoprotéine Ptx1 est en fait le prototype d'une nouvelle famille de facteur à boîte homéo qui comprend aujourd'hui Ptx2 et Ptx3.

Ptx1 est exprimé tôt durant l'embryogenèse, avant même l'initiation du programme de différenciation hypophysaire, et son expression est maintenue dans la glande adulte, suggérant un rôle pour ce facteur dans le développement hypophysaire. En accord avec cette hypothèse, j'ai démontré que Ptx1 est requis pour l'expression du gène *Lim3/Lhx3*, un gène crucial pour l'expansion cellulaire au cours du développement hypophysaire. J'ai aussi montré que dans l'hypophyse, Ptx1 est exprimé sous deux isoformes générées par l'utilisation de promoteurs alternatifs. Ces deux isoformes, de même que les deux isoformes de Ptx2, possèdent tous des propriétés de liaison à l'ADN et des propriétés transcriptionnelles similaires. De plus, Ptx1 semble posséder deux domaines d'activation situés de chaque côté de l'homéodomaine et dont l'activité semble dépendante du promoteur cible.

J'ai pu définir Ptx1 comme un activateur transcriptionnel pan-hypophysaire puisqu'il active plusieurs promoteurs spécifiques à ce tissu. Il participe à l'activité

cellule-spécifique de ces promoteurs en coopérant avec d'autres facteurs de transcription d'expression restreinte à ces cellules tels l'hétérodimère bHLH NeuroD1/Pan1 sur le promoteur POMC, le facteur POU Pit1 sur les promoteurs GH et PRL et le récepteur nucléaire orphelin SF-1 de même que le facteur de réponse immédiate précoce Egr-1 sur le promoteur LH $\beta$ . J'ai démontré que l'interaction directe entre Ptx1 et SF-1 résulte en une activation du récepteur similaire à celle attendue suite à la liaison d'un ligand. Cette interaction entre Ptx1 et SF-1 définit ainsi un nouveau mécanisme pour l'activation des récepteurs nucléaires. De plus, l'expression du gène LH $\beta$  dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse, site majeur d'expression de Ptx1, est étroitement contrôlée par l'hormone hypothalamique GnRH. J'ai montré que cette hormone induit dramatiquement l'expression du facteur Egr-1, identifiant ce facteur comme médiateur transcriptionnel de la stimulation de LH $\beta$  induite par la GnRH. Egr-1 semble médier cette activation du promoteur LH $\beta$  par une interaction directe avec Ptx1 et SF-1.

Ainsi, l'ensemble des données présentées dans cette thèse définissent le rôle de Ptx1 et décrivent son mode d'action dans plusieurs aspects de la fonction hypophysaire, allant de son développement jusqu'à l'expression histo-spécifique de plusieurs gènes.

## AVANT-PROPOS

Je tiens, en premier lieu, à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr. Jacques Drouin. Durant mon séjour dans son laboratoire, il m'a accordé une confiance quasi-absolue de même qu'un encadrement exceptionnel, tant au point de vue matériel qu'intellectuel. Exigeant, il prêche toutefois par l'exemple. Toujours à l'écoute et attentif au besoin de chacun, il a appris à respecter mon besoin d'indépendance et d'autonomie dans la façon de mener à bien ce projet. Son dévouement et son dynamisme demeureront toujours une source de motivation.

Je voudrais aussi remercier les Drs. Linda Roselli-Rehfuss, Mona Némer et Cynthia Goodyer pour nos nombreuses et stimulantes discussions souvent critiques mais combien constructives.

Je suis tout aussi reconnaissant envers mes collègues, passés et présents, du laboratoire de Génétique Moléculaire: Thomas Lamonerie, Alexandre Philips, Scott McDonald, Christian Lanctôt, Alexandre Marcil, Bruno Lamolet, Gino Poulin, Mario Maira et Michael Crawford. Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues du 521, Claudine Grépin, Georges Némer, Robert Viger, et Ariel Arias, de même que les membres du laboratoire de Développement et Différenciation Cardiaques. Nos animées conversations scientifiques, et non-scientifiques heureusement, ont permis de tisser de forts liens d'amitié et de créer une atmosphère de travail chaleureuse.

Je ne pourrais oublier Michel Chamberland, Yves Gauthier et Lynda Robitaille, trois techniciens hors du commun sur qui j'ai toujours pu compter pour obtenir les meilleurs conseils grâce à leur expertise presque illimitée. Je veux également remercier

chaleureusement Lise Laroche pour son excellent travail de secrétariat et aussi pour son écoute attentive et cordiale.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, les Drs. Muriel Aubry, Bernard Turcotte et Mark Featherstone pour leurs judicieux conseils et leur intérêt dans la réussite de ce projet.

Je remercie le conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada, le fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche, la société de recherche sur le cancer, et la faculté des études supérieures de l'université de Montréal pour leur support financier.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>I</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XV</b>
<b>CHAPITRE I – INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 L'HYPOPHYSE.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Structure de l'hypophyse .....	3
1.2.1.1 Le lobe antérieur.....	3
1.2.1.2 Le lobe intermédiaire .....	4
1.2.1.3 Le pars tubéralis .....	4
1.2.1.4 La neurohypophyse .....	5
1.2.2 Fonctions de l'hypophyse .....	5
1.2.2.1 La pro-opiomélanocortine (POMC) .....	6
1.2.2.2 Les gonadotropines (LH et FSH) .....	8
1.2.2.3 La thyrostimuline (TSH) .....	9
1.2.2.4 La prolactine (PRL).....	9
1.2.2.5 L'hormone de croissance (GH) .....	9
1.2.2.6 L'oxytocine (OT) et la vasopressine (AVP).....	10
1.2.3 Origine de l'hypophyse .....	10
1.2.4 Développement et différenciation de l'hypophyse .....	12
1.2.4.1 Ontogénie des types cellulaires .....	12
1.2.4.2 Facteurs de transcription et développement hypophysaire.....	14
<b>1.3 RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE .....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Structure de la chromatine .....	18
1.3.2 Méthylation de l'ADN .....	22
<b>1.3.3 RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE .....</b>	<b>23</b>
1.3.3.1 Les facteurs généraux de transcription .....	25

1.3.3.1.1	Le complexe de pré-initiation .....	26
1.3.3.1.1.1	Assemblage du PIC .....	26
1.3.3.1.1.2	L'holoenzyme pol II .....	28
1.3.3.1.2	Initiation de la transcription .....	30
1.3.3.1.3	Élongation et maturation de l'ARNm et terminaison de la transcription: implication du CTD de l'ARN polymérase II .....	30
1.3.3.2	Les facteurs de transcription .....	35
1.3.3.2.1	Mode d'action des régulateurs transcriptionnels .....	35
1.3.3.2.1.1	Les répresseurs transcriptionnels .....	36
1.3.3.2.1.2	Les activateurs transcriptionnels .....	37
1.3.3.2.2	Régulation de l'activité des facteurs de transcription .....	39
1.3.3.2.2.1	Expression des gènes qui codent pour les facteurs de transcription .....	39
1.3.3.2.2.2	Les isoformes de facteur de transcription .....	40
1.3.3.2.2.3	Localisation intracellulaire .....	41
1.3.3.2.2.4	Phosphorylation .....	41
1.3.3.2.2.5	Liaison d'un ligand .....	42
1.3.3.2.2.6	Interaction protéines-protéines .....	43
1.3.3.2.2.6.1	Interactions entre facteurs se liant à l'ADN .....	44
1.3.3.2.2.6.2	Interactions avec les protéines accessoires .....	45
1.3.3.2.3	Familles de facteurs de transcription .....	48
1.3.3.2.3.1	Familles de facteurs de transcription: un survol .....	49
1.3.3.2.3.2	Les homéoprotéines .....	49
1.3.3.2.3.2.1	Les gènes à boîte homéo regroupés dans le génome .....	53
1.3.3.2.3.2.2	Les gènes à boîte homéo dispersés dans le génome .....	59
1.3.3.2.3.2.3	La famille Ptx .....	64
1.3.3.2.3.3	Les récepteurs nucléaires .....	69
1.3.3.2.3.3.1	Structures des récepteurs nucléaires .....	70
1.3.3.2.3.3.2	Propriétés de liaison à l'ADN .....	70
1.3.4	Régulation post-transcriptionnelle .....	75
1.3.4.1	Stabilité versus dégradation de l'ARNm .....	75
1.3.4.2	Contrôle de la traduction .....	76
1.3.4.3	Contrôle post-traductionnel .....	77

<b>1.4 RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES HYPOPHYSAIRES.....</b>	<b>77</b>
1.4.1 Régulation de l'expression de la POMC.....	78
1.4.2 Régulation de l'expression de la GH et de la PRL.....	80
1.4.3 Régulation de l'expression de la TSH $\beta$ .....	81
1.4.4 Régulation de l'expression de l' $\alpha$ GSU.....	82
1.4.5 Régulation de l'expression de la LH $\beta$ et de la FSH $\beta$ .....	85
<b>1.5 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....</b>	<b>86</b>
<b>CHAPITRE II – THE PAN-PITUITARY ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION, PTX1 (PITUITARY HOMEBOX 1), ACTS IN SYNERGY WITH SF-1 AND PIT1, AND IS AN UPSTREAM REGULATOR OF THE LIM- HOMEODOMAIN GENE LIM3/LHX3 .....</b>	<b>89</b>
<b>INTRODUCTION AU CHAPITRE.....</b>	<b>90</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>91</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>93</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>94</b>
<b>RESULTS .....</b>	<b>96</b>
Ptx1 Is Expressed in All Pituitary Cell Types.....	96
Ptx1 Activates Several Pituitary-Specific Promoters .....	98
Mapping of Ptx1-Responsive Elements in the $\alpha$ GSU and $\beta$ LH Promoters .....	101
Ptx1 Acts in Synergy with SF-1 and Pit1.....	102
Ptx1 Protein Is Expressed at High Levels in $\alpha$ GSU-Expressing Cells .....	104
Ptx1 Is the Major Ptx Protein Expressed in $\alpha$ GSU-Expressing $\alpha$ T3-1 Cells .....	104
Ptx1 Is Essential for $\alpha$ GSU and Lim3/Lhx3 Gene Expression.....	106
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>108</b>
Differential Expression of Ptx1 and Ptx2 in Pituitary Lineages .....	109
A pan-Pituitary Regulator of Transcription .....	110
Promoter-Specific Synergism .....	111
Regulatory Cascade during Pituitary Development.....	113
<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>116</b>
RNA Extraction and Analysis .....	116
Nuclear Extracts and Gel Retardation Assays .....	116
Cell Culture and Transfection Assays .....	116
Western Blot Analysis.....	117

Plasmids and Oligonucleotides .....	118
<b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>120</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>121</b>
<b>CHAPITRE III – TRANSCRIPTIONAL PROPERTIES OF PITUITARY PTX1 AND PTX2 ISOFORMS .....</b>	<b>129</b>
<b>INTRODUCTION AU CHAPITRE.....</b>	<b>130</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>131</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>132</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>133</b>
<b>RESULTS .....</b>	<b>135</b>
Cloning of a Ptx1 Isoform .....	135
The Two Ptx1 Isoforms are Generated by Differential Promoter Usage .....	136
Relative Expression of Ptx1 and Ptx1b .....	137
DNA Binding Specificity of Ptx1, Ptx2 and their Isoforms.....	139
Transactivation Properties of Ptx1, Ptx2, and their Isoforms .....	140
The Ptx1 and Ptx2 Isoforms Synergize with SF-1, Egr-1, Pit1 and NeuroD1/Pan1 ..	141
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>143</b>
<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>146</b>
cDNA Library Screening and DNA Sequencing .....	146
RNA Extraction and Analysis .....	146
Cell Culture and Transfection Assays .....	146
Nuclear Extracts, Gel Retardation Assay and Western Blot Analysis.....	147
Plasmids and Oligonucleotides .....	147
<b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>149</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>150</b>
<b>CHAPITRE IV – PTX1 REGULATES SF-1 ACTIVITY BY AN INTERACTION THAT BYPASSES THE NEED FOR LIGAND .....</b>	<b>156</b>
<b>INTRODUCTION AU CHAPITRE.....</b>	<b>157</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>158</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>159</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>160</b>
<b>RESULTS .....</b>	<b>163</b>



Specificity of Ptx1 and SF-1 Synergism for Activation of LH $\beta$ Promoter.....	163
Ptx1/SF-1 Synergism Requires SF-1, but not a Ptx1, Binding Site.....	164
Ptx1 and SF-1 Interact Directly .....	166
Mapping of Ptx1 Domain Interacting with SF-1 .....	166
Transactivation by Ptx1 Mutants .....	166
Synergism between Ptx1 and SF-1 .....	168
Ptx1 Modulates SF-1 Activity .....	171
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>173</b>
Organisation of Ptx1 Transcription Factor.....	174
Mechanism of Ptx1/SF-1 Synergism.....	174
Ptx1 as Modulatory Cofactor of SF-1 Activity .....	175
<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>178</b>
Cell Culture and Transfection Assays .....	178
Nuclear Extracts and Gel Retardation Assay .....	178
Plasmids and Oligonucleotides.....	178
Recombinant Protein Production .....	179
Protein-Protein Interaction Assay.....	180
<b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>181</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>182</b>
<b>CHAPITRE V – EGR-1 IS A DOWNSTREAM EFFECTOR OF GNRH AND SYNERGIZES BY DIRECT INTERACTION WITH PTX1 AND SF-1 TO ENHANCE LH<math>\beta</math> GENE TRANSCRIPTION .....</b>	<b>188</b>
<b>INTRODUCTION AU CHAPITRE.....</b>	<b>189</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>190</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>191</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>192</b>
<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>195</b>
Cell Culture and Transfection Assays .....	195
Hormone Treatment, RNA Extraction and Analysis .....	195
Plasmids and Oligonucleotides.....	196
Recombinant Protein Production and Pull Down Assays .....	196
<b>RESULTS .....</b>	<b>196</b>
GnRH Rapidly and Transiently Induces Egr-1 .....	196

PKC Enhances Egr-1-Dependent LH $\beta$ Promoter Activation.....	199
Egr-1, Ptx1 and SF-1 Cooperatively Activate the LH $\beta$ Promoter .....	200
Binding Site Requirements for Egr-1/Ptx1/SF-1 Synergism .....	202
Egr-1 and Ptx1 Interact Physically .....	204
Egr-1/Ptx1 Synergism Maps to a C-Terminal Domain of Ptx1 .....	205
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>206</b>
Regulation of Egr-1 Activity.....	206
Mechanism of Egr-1, Ptx1 and SF-1 Cooperation.....	207
Egr-1 as a Downstream Effector of GnRH .....	209
<b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>211</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>212</b>
<b>CHAPITRE VI – DISCUSSION .....</b>	<b>220</b>
Ptx1: un facteur clé pour la fonction hypophysaire?.....	222
Propriétés des facteurs Ptx.....	224
Implication de Ptx1 dans l'axe de la reproduction .....	227
Perspectives .....	234
<b>ANNEXE I – IMPLICATION DE PTX1 DANS L'EXPRESSION DU GÈNE POMC.....</b>	<b>239</b>
<b>ANNEXE II – PROPRIÉTÉS DE OTX1 .....</b>	<b>243</b>
<b>ANNEXE III – PROPRIÉTÉS DE PTX3.....</b>	<b>247</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>251</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

**Table 2-1.** Putative Ptx1 Binding Sites Present in Pituitary-Specific Promoters .....99

**Table 5-1.** Site Requirements for Synergy on the LH $\beta$  Promoter .....204

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1-1.</b>	Développement de l'hypophyse. ....	11
<b>Figure 1-2.</b>	Différenciation des cellules hypophysaires. ....	13
<b>Figure 1-3.</b>	Comparaison des facteurs à homéodomaine de mammifères apparentés à bicoïde. ....	65
<b>Figure 2-1.</b>	Ptx1 and Ptx2, but Not Ptx3, Are Expressed in Several Pituitary- Derived Cell Lines. ....	97
<b>Figure 2-2.</b>	The Ptx1 Protein Is Present in Several Pituitary-Derived Cell Lines. ....	98
<b>Figure 2-3.</b>	Ptx1 Transactivates Several Pituitary-Specific Promoters. ....	100
<b>Figure 2-4.</b>	Mapping of Ptx1-Responsive Elements in the $\alpha$ GSU and $\beta$ LH Promoters. ....	101
<b>Figure 2-5.</b>	Ptx1 Can Synergise with SF-1 and Pit1. ....	103
<b>Figure 2-6.</b>	Ptx1 Is Strongly Expressed in $\alpha$ GSU-Expressing Cells. ....	104
<b>Figure 2-7.</b>	$\alpha$ T3-1 Cells Contain Almost Exclusively Ptx1. ....	105
<b>Figure 2-8.</b>	Endogenous Ptx1 Activity Is Decreased in Ptx1 Antisense Clones. ....	106
<b>Figure 2-9.</b>	Ptx1 Knockdown Cells Fail to Express the $\alpha$ GSU and Lim3/Lhx3 Genes. ....	108
<b>Figure 2-10.</b>	Regulatory Factors during Pituitary Development. ....	110
<b>Figure 3-1.</b>	Structure of Ptx1b. ....	136

<b>Figure 3-2.</b>	Alternate Promoter for Ptx1b Expression. ....	137
<b>Figure 3-3.</b>	Relative Expression of Ptx1 and Ptx1b.....	138
<b>Figure 3-4.</b>	DNA-Binding Properties of Ptx1 and Ptx2 Isoforms.....	139
<b>Figure 3-5.</b>	Ptx Proteins Have Similar Transactivation Properties.....	141
<b>Figure 3-6.</b>	Ptx1, Ptx1b, Ptx2 and Ptx2b Synergize with the Cell Restricted Factors SF-1, Egr-1, Pit1, and NeuroD1/Panl. ....	142
<b>Figure 4-1.</b>	Ptx1 and SF-1 Synergize on the LH $\beta$ promoter. ....	164
<b>Figure 4-2.</b>	The Synergy between Ptx1 and SF-1 Requires the SF-1, but Not the Ptx1, Binding Site.....	165
<b>Figure 4-3.</b>	Ptx1 and SF-1 Interact Directly.....	167
<b>Figure 4-4.</b>	Ptx1 Contains two Independent Activation Domains. ....	169
<b>Figure 4-5.</b>	The C-Terminal Domain of Ptx1 Is Required for Synergy with SF-1.....	170
<b>Figure 4-6.</b>	Interaction Domain with SF-1 Maps to a 37 amino acids C- Terminal Region of Ptx1.....	171
<b>Figure 4-7.</b>	Ptx1 Interaction Unmasks SF-1 Activity.....	172
<b>Figure 4-8.</b>	Ptx1 Modulates SF-1 Activity in the Pituitary. ....	177
<b>Figure 5-1.</b>	Egr-1, Ptx1 and SF-1 Binding Sites Are Conserved Across Species in the LH $\beta$ Promoter.....	197
<b>Figure 5-2.</b>	GnRH Rapidly Induces Egr-1 Gene Expression. ....	198

<b>Figure 5-3.</b>	Involvement of PKC Pathway in Egr-1-Dependent Activation of LH $\beta$ Promoter.....	199
<b>Figure 5-4.</b>	Egr-1, Ptx1 and SF-1 Synergize for Activation of the LH $\beta$ Promoter.....	201
<b>Figure 5-5.</b>	Site Requirements for Egr-1/Ptx1/SF-1 Cooperation.....	203
<b>Figure 5-6.</b>	Egr-1 Directly Interacts with Ptx1 and SF-1.....	204
<b>Figure 5-7.</b>	The C-Terminal Domain of Ptx1 Is Required for Physical Interaction and Transcriptional Cooperation with Egr-1.....	205
<b>Figure 5-8.</b>	Model for control of LH $\beta$ Gene Expression by Egr-1, Ptx1 and SF-1.....	208
<b>Figure AI-1.</b>	La protéine Ptx1 est présente dans les cellules AtT-20.....	241
<b>Figure AI-2.</b>	Blocage de l'activité du promoteur POMC par la surexpression d'ARN antisens de Ptx1 dans les cellules AtT-20.....	242
<b>Figure All-1.</b>	Otx1 lie spécifiquement une séquence apparentée à bicoïde.....	245
<b>Figure All-2.</b>	Otx1 active certains promoteurs hypophysaires.....	246
<b>Figure Alll-1.</b>	Propriétés de liaison à l'ADN de Ptx3.....	249
<b>Figure Alll-2.</b>	Propriétés transcriptionnelles de Ptx3.....	250

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

aa	:	Acide aminé
All	:	Angiotensine II
ACF	:	ATP-utilizing chromatin assembly and remodelling factor
ACTH	:	Adrenocorticotropic hormone (corticotropine)
AD	:	Activation domain (domaine d'activation)
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
AF-1	:	Activating function 1 (fonction activatrice 1)
AMPC	:	Adénosine mono-phosphate cyclique
AP-1	:	Activating protein 1 (protéine activatrice 1)
AR	:	Androgen receptor (récepteur des androgènes)
ARA	:	AR-activator (activateur du AR)
ARE	:	AU-rich element (élément riche en AU)
ANR	:	Anterior neural ridge (bourrelet neural antérieur)
Antp	:	Antennapedia
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messenger
AVP	:	Vasopressine
$\alpha$ GSU	:	Glycoprotein subunit alpha (sous-unité $\alpha$ des hormones glycoprotéiques)
$\beta$ -End	:	Beta-endorphine
bcd	:	Bicoïde
bHLH	:	Basic helix-loop-helix (région basique/hélice-boucle-hélice)
bZIP	:	basic leucine zipper (région basique/fermeture en leucine)

BMP	:	Bone morphogenetic protein (protéine morphogénétique des os)
Brn4	:	Brain factor 4
BTS	:	Bcd target site (site de liaison de Bcd)
CAF-1	:	Chromatin assembly factor 1 (facteur d'assemblage de la chromatine 1)
CAK	:	Cdk-activating kinase
CASP	:	CTD-associated SR-like protein (protéine apparentée à SR associée au CTD)
CBP	:	CREB-binding protein (protéine se liant à CREB)
Cdk	:	Cyclin dependent kinase (kinase dépendante des cyclines)
C/EBP	:	CCAAT/enhancer binding protein
CHRAC	:	Chromatin accessibility complex
CLIM	:	Co-factor of Lim-homeodomain protein (co-facteur des protéines Lim-homéodomaine)
CPSF	:	Cleavage and polyadenylation specificity factor (facteur de spécificité de polyadénylation et de clivage)
CRH	:	Corticotropin releasing hormone (hormone de libération de l'ACTH)
CstF	:	Cleavage stimulation factor (facteur de stimulation du clivage)
CTD	:	Carboxy terminal domain (domaine carboxy terminal)
CTE	:	Carboxy terminal extension (extension carboxy-terminale)
Da	:	Dalton
Dax1	:	Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome gene 1
DBD	:	DNA-binding domain (domaine de liaison à l'ADN)
Dll	:	Distal less
DNAse I	:	Désoxyribonucléase I
DPE	:	Downstream promoter element (élément aval du promoteur)



DRIP	:	VDR-interacting protein (protéine interagissant avec le VDR)
EGF	:	Epidermal growth factor (facteur de croissance épidermique)
Egr-1	:	Early growth response 1
Ems	:	Empty spiracle
ER	:	Estrogen receptor (récepteur des estrogènes)
ERAP	:	ER-associated protein (protéine associée au ER)
Exd	:	Extradenticle
FCP1	:	TFIIF-associated CTD phosphatase 1 (phosphatase 1 du CTD associée à TFIIF)
FGF	:	Fibroblast growth factor (facteur de croissance des fibroblastes)
FOG	:	Friend of GATA
FSH	:	Follicle-stimulating hormone (hormone folliculostimulante)
Ftz	:	Fushi tarazu
GAL4	:	Galactose factor 4
Gc	:	Glucocorticoïdes
GH	:	Growth hormone (hormone de croissance)
GHRH	:	Growth hormone releasing hormone (hormone de libération de la GH)
GnRH	:	Gonadotropin releasing hormone (hormone de libération des gonadotropines)
GnRH-R	:	GnRH-receptor (récepteur des gonadotropines)
GR	:	Glucocorticoid receptor (récepteur des glucocorticoïdes)
GTF	:	General transcription factor (facteur général de transcription)
HD	:	Homéodomaine
HD-1, -2	:	Histone deacetylase-1, -2 (désacétylase d'histone-1, -2)
HMG	:	High mobility group (groupe à mobilité rapide)
HNF-3, -4	:	Hepatocyte nuclear factor-3, -4 (facteur nucléaire hépatocytaire-3, -4)

HRE	:	Hormone response element (élément de réponse aux hormones)
HSP	:	Heat shock protein (protéine de choc thermique)
HTH	:	Helix-turn-helix (hélice-tour-hélice)
IGF	:	Insulin-like growth factor (facteur de croissance apparenté à l'insuline)
Inr	:	Initiator region (région initiatrice)
Isl-1	:	Insulin gene enhancer binding protein -1
LBD	:	Ligand binding domain (domaine de liaison du ligand)
LEF-1	:	Lymphoid enhancer-binding protein 1
LH	:	Luteinizing hormone (hormone lutéinisante)
Luc	:	Luciférase
MeCP1/2	:	Methyl-CpG binding protein1/2 (protéine liant le méthyle CpG)
MIS	:	Müllerian-inhibiting substance (hormone anti-Müllerienne)
MOT1	:	Modifier of transcription 1
MSH	:	Melanocyte stimulating hormone (hormone stimulant les mélanocytes)
NAP-1	:	Nucleosome assembly protein 1
NcoR	:	Nuclear receptor co-repressor (co-répresseur des récepteurs nucléaires)
NER	:	Nucleotide excision repair (réparation par excision de nucléotide)
NLS	:	Nuclear localisation signal (signal de localisation nucléaire)
NMP-1	:	Nuclear matrix protein 1 (protéine de la matrice nucléaire 1)
NR	:	Nuclear receptor (récepteur nucléaire)
NURF	:	Nucleosome remodeling factor (facteur de réarrangement des nucléosomes)
OT	:	Oxytocine
pb	:	Paire de base
P/CAF	:	p300 and CBP-associated factor
PD	:	Paired domain (domaine paired)

P-Frk	:	Pituitary forkhead
PIC	:	Pre-initiation complex (complexe de pré-initiation)
PKC	:	Protéine kinase C
POMC	:	Pro-opiomélanocortine
PPAR	:	Peroxisome proliferator-activated receptor
PR	:	Progesterone receptor (récepteur de la progestérone)
PRL	:	Prolactine
P-TEFb	:	Positive transcription elongation factor b
Ptx1	:	Pituitary homeobox 1
RAR	:	Retinoic acid receptor (récepteur de l'acide rétinoïque)
RSC	:	Remodels the structure of chromatin
RIP	:	Receptor interacting protein (protéine interagissant avec les récepteurs)
RMN	:	Résonance magnétique nucléaire
RSV	:	Rous sarcoma virus
RXR	:	9-cis-retinoic acid receptor (récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque)
SF-1	:	Steroidogenic factor 1
Shh	:	Sonic hedgehog
SHP	:	Small heterodimer partner (petit partenaire d'hétérodimérisation)
Six3	:	Sine oculis homeobox
SMRT	:	Silencing mediator for RAR and TR
SR	:	Serine/arginine-rich (protéine riche en serine et arginine)
SRF	:	Serum response factor
SWI/SNF	:	Switch/sucrose non-fermenting
SRB	:	Suppressors of RNA polymerase B
SRC-1	:	Steroid receptor co-activator (co-activateur des récepteurs stéroïdiens)
T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>	:	Thyroid hormone (hormone thyroïdienne)

TAF	:	TBP-associated factor (facteur associé à TBP)
TBP	:	TATA-binding protein (protéine se liant à la boîte TATA)
TOCF	:	Treacher Collins Franceschetti
TF	:	Transcription factor (facteur de transcription)
TPA	:	12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate
TR	:	Thyroid hormone receptor (récepteur des hormones thyroïdiennes)
TRH	:	Thyrotropin releasing hormone (hormone de libération de la thyroestimuline)
TRAP	:	TR-associated protein (protéine associée au TR)
TSH	:	Thyrotropin (thyroestimuline)
TTF-2	:	Thyroid transcription factor 2
Ubx	:	Ultrabithorax
UTR	:	Untranslated region (région non-traduite)
VDR	:	Vitamin D receptor (récepteur de la vitamine D)
WG	:	Wingless
WT-1	:	Wilms' tumor 1
ZnF	:	Zinc finger (doigt de zinc)

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION**

## 1.1 Introduction générale

L'hypophyse, ou glande pituitaire, est située au coeur de trois axes majeurs du système neuro-endocrinien: les axes hypothalamo-hypophyso-surrénalien, hypothalamo-hypophyso-gonadique, et hypothalamo-hypophyso-thyroïdien. Chacune des composantes de ces trois axes produisent et sécrètent des hormones qui agissent positivement ou négativement sur la fonction de la composante suivante. Ainsi, l'hypothalamus sécrète dans le système porte hypothalamo-hypophysaire des hormones trophiques qui atteignent rapidement l'hypophyse et modulent la production et la sécrétion des hormones hypophysaire. L'hypophyse est composée de six types cellulaires distincts qui produisent et sécrètent huit hormones. Chacune de ces hormones a une fonction bien précise et elles agissent sur plusieurs tissus dont les glandes surrénales, la thyroïde, et les gonades. Ces trois tissus endocriniens répondent aux hormones hypophysaires en sécrétant à leur tour des hormones qui, lorsqu'une concentration suffisante est atteinte, agissent par une boucle de rétroaction négative (negative feedback loop) sur l'hypothalamus et/ou l'hypophyse pour inhiber la sécrétion des hormones hypothalamiques et hypophysaires.

## 1.2 L'hypophyse

L'hypophyse régule, de par les hormones qu'elle produit, un nombre impressionnant de fonctions corporelles allant de la croissance jusqu'à la reproduction. Ces hormones sont synthétisées et sécrétées par des types cellulaires distincts, qui apparaissent à des stades précis au cours du développement de cet organe. Ainsi, l'hypophyse constitue un excellent modèle pour l'analyse de l'expression des gènes au cours de l'organogenèse, de la différenciation cellulaire, et en réponse aux divers stimuli environnementaux.

### **1.2.1 Structure de l'hypophyse**

L'hypophyse peut être divisée en quatre régions: pars distalis (lobe antérieur), pars intermedia (lobe intermédiaire), pars nervosa (lobe postérieur), et pars tuberalis. Les lobes antérieur et intermédiaire de même que la pars tuberalis sont aussi communément appelés l'adénohypophyse, alors que la neurohypophyse comprend le lobe postérieur et l'infundibulum. L'hypophyse est reliée à l'hypothalamus, avec qui elle entretient d'étroites relations, par la tige infundibulaire qui contient des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins.

#### **1.2.1.1 Le lobe antérieur**

Le lobe antérieur constitue la majeure partie de la portion glandulaire de l'hypophyse et contient cinq types cellulaires distincts. Ces types cellulaires sont facilement identifiables par l'hormone qu'ils sécrètent: les cellules corticotropes synthétisent l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) qui stimule la corticosurrénale, les somatotropes produisent l'hormone de croissance (GH) qui règle la croissance corporelle générale, les cellules lactotropes sécrètent la prolactine (PRL) qui stimule la sécrétion du lait par les glandes mammaires, les thyrotropes produisent l'hormone stimulant la thyroïde, ou thyroïdostimuline, (TSH) qui contrôle l'activité de la glande thyroïde, et les cellules gonadotropes synthétisent les gonadotropines, deux hormones qui agissent sur la fonction des gonades, l'hormone folliculostimulante (FSH) qui favorise le développement folliculaire des ovules et la prolifération des cellules de Sertoli embryonnaires, et l'hormone lutéinisante (LH) qui stimule la stéroïdogénèse dans les deux sexes, l'ovulation chez les femelles et la spermatogénèse chez les mâles. Toutes ces hormones sont déversées dans de micro vaisseaux sanguins abondamment présents dans le lobe antérieur.

Quoiqu'il soit accepté que chaque type cellulaire est responsable de la production d'une hormone, des études ont révélé la colocalisation de deux hormones, normalement produites par des types cellulaires distincts, à l'intérieur d'une même cellule. Par exemple, un faible nombre de cellules contenant GH et PRL ont été observées dans l'hypophyse de rat, de bovin et d'humain (Nikitovitch-Winer et al. 1987; Hashimoto et al. 1987). D'autre part, il existe aussi des cellules qui contiennent l'ACTH et la TSH simultanément (Sasaki et al. 1990). Fait intéressant, un traitement de 15 minutes au froid mène à l'augmentation du nombre de cellules corticotropes (Wu et al. 1991; Sasaki et al. 1990). Ainsi, le concept de cellules souches pluripotentes dans l'hypophyse antérieure a été suggéré. Après une stimulation appropriée, comme par exemple un stress au froid, ces cellules augmentent en nombre et s'ajoutent alors à la population sécrétrice déjà existante. Ainsi, l'hypophyse serait une structure dynamique qui ajusterait sa composition cellulaire en fonction des besoins.

#### **1.2.1.2 Le lobe intermédiaire**

Le lobe intermédiaire contient uniquement les cellules mélanotropes qui produisent l'hormone mélanotrope (MSH), une hormone reliée à la pigmentation de la peau. Le lobe intermédiaire est nettement moins vascularisé que le lobe antérieur et les capillaires de ce lobe se joignent à ceux du lobe antérieur (Marakami et al. 1985). De plus, des terminaisons nerveuses contactent les cellules épithéliales, suggérant que l'activité des cellules du lobe intermédiaire puisse être régulée par des contacts neuronaux directs.

#### **1.2.1.3 Le pars tubéralis**

L'autre composante de l'adénohypophyse, le pars tuberalis, est aussi composé de cellules épithéliales glandulaires. Des analyses d'immunohistochimie ont montré que



certaines cellules contiennent la TSH et GnRH (une hormone sécrétée par l'hypothalamus et qui régule la sécrétion des gonadotropines par l'hypophyse), alors que d'autres correspondent à des gonadotropes puisqu'elles contiennent la sous-unité commune  $\alpha$  des hormones gonadotropes ( $\alpha$ GSU) et la sous-unité  $\beta$  de la LH (LH $\beta$ ) (Baker et al. 1975; Baker et al. 1977; Gross, 1983). L'origine des cellules gonadotropes du pars tuberalis demeure obscure mais il semblerait qu'elles migrent dans le pars tuberalis à partir du lobe antérieur.

#### **1.2.1.4 La neurohypophyse**

La neurohypophyse n'est pas considérée comme une glande endocrine puisqu'elle ne synthétise pas d'hormones. Elle est composée principalement de pituicytes qui ressemblent aux cellules gliales du système nerveux, et de terminaisons nerveuses qui contiennent des hormones hypothalamiques, telles l'oxytocine (OT) et la vasopressine (AVP), prêtes à être libérées dans le sang suivant une stimulation appropriée. Cette organisation d'un neurone sécréteur à proximité d'un vaisseau sanguin en l'absence d'une barrière hémato-encéphalique se retrouve uniquement dans la neurohypophyse et l'hypothalamus.

#### **1.2.2 Fonctions de l'hypophyse**

Bien qu'aujourd'hui les multiples fonctions de l'hypophyse soient bien caractérisées, tel n'était pas le cas au début du 20<sup>ième</sup> siècle. En effet, un dictionnaire de l'époque définissait l'hypophyse comme "...une petite structure à deux lobes de fonction inconnue attachée à l'infundibulum à la base du cerveau". Le concept que l'hypophyse soit essentielle pour la vie est toutefois apparût à la même époque suite aux travaux de Paulesco qui a montré une perte de viabilité à long terme chez des chiens ayant subit l'ablation de cette glande. Les fonctions de l'hypophyse furent d'abord identifiées par

des expériences d'ablation de la glande et injection de cellules du lobe antérieur. Ainsi, l'hypophysectomie chez des larves d'amphibiens bloque leur métamorphose et induit une atrophie des surrénales et de la thyroïde, ce qui peut être renversé par l'injection intra-péritonéale de cellules du lobe antérieur de boeuf (Allen, 1916; Allen, 1920; Smith, 1916; Smith et al. 1922a; Smith et al. 1922b). Des procédures de fractionnement protéiques furent utilisées durant les décennies suivantes afin de purifier les différentes "activités" du lobe antérieur de l'hypophyse. Éventuellement, à la fin des années 30, l'existence de six hormones dans le lobe antérieur a été établie: ces hormones contrôlent la croissance, l'activité des gonades, des glandes mammaires, de la thyroïde, et du cortex surrénalien. Aujourd'hui, les ADN complémentaires (ADNc) de ces hormones, connues sous les acronymes ACTH, GH, PRL, MSH, LH, FSH, TSH,  $\beta$ -END, ont été isolés et caractérisés chez plusieurs espèces par de nombreux groupes [revue dans (Caldwell et al. 1987)]. Ceci a mis en évidence une étonnante conservation au cours de l'évolution de la séquence nucléotidique des gènes codant pour ces hormones illustrant ainsi le rôle essentiel de ces hormones. Il en est de même des deux hormones, OT et l'AVP, produites dans les cellules neurosécrétrices du lobe postérieur.

#### **1.2.2.1 La pro-opiomélanocortine (POMC)**

La POMC est un précurseur protéique exprimé dans deux lignées cellulaires de l'hypophyse: (1) les cellules corticotropes du lobe antérieure où il est spécifiquement clivé pour générer l'ACTH (ou corticotropine), et (2) les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire où sa maturation donne naissance aux mélanotropines ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -MSH) et à la  $\beta$ -endorphine ( $\beta$ -END) (Jacobson et al. 1994). La corticotropine et les mélanotropines sont aussi appelées collectivement les mélanocortines. La POMC est aussi présente dans le noyau arqué de l'hypothalamus où son clivage génère la  $\alpha$ - et  $\gamma$ -

MSH et la  $\beta$ -END (Eipper et al. 1980; Smith et al. 1988). Tous les peptides générés à partir de la POMC ont des rôles importants dans la fonction des surrénales, du cerveau, et du système immunitaire, dans la pigmentation, dans la perception de la douleur, ainsi que dans le contrôle de l'appétit (Krude et al. 1998).

L'ACTH est un peptide monocaténaire qui contrôle la croissance et la fonction du cortex surrénalien. Dans la surrénale, la liaison de l'ACTH à son récepteur membranaire entraîne l'activation de la voie de signalisation impliquant une augmentation de l'AMP cyclique (AMPC). Ceci mène à une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des glucocorticoïdes (Gc) par la zone fasciculée de la corticosurrénale. Les glucocorticoïdes sont impliqués dans le maintien du métabolisme normal en activant la gluconéogenèse. Ils servent aussi à combattre le stress par différents moyens comme par exemple en augmentant l'apport en énergie (gluconéogenèse) et en rendant les vaisseaux sanguins plus sensibles aux agents vasoconstricteurs.

Les mélanotropines, ou hormones mélanotropes comprennent trois peptides  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -MSH. Les mélanotropines agissent principalement sur la pigmentation en dispersant les granules de mélanine intracellulaire entraînant ainsi le noircissement de la peau. Elles sont aussi impliquées dans la croissance et le développement des mélanocytes (Eberle, 1988). Ces activités sont attribuables aux  $\alpha$ - et  $\beta$ -MSH uniquement, car la  $\gamma$ -MSH ne possède aucune activité mélanotrope et serait surtout impliquée dans la fonction du cerveau (le récepteur pour cette hormone étant présent uniquement dans le cerveau). Ainsi, plusieurs autres fonctions sont imputables aux mélanocortines (ACTH + mélanotropines) telles, la stimulation de la régénération nerveuse, l'augmentation du rythme cardiaque, de la pression sanguine et de la

natriurèse, la diminution de la fièvre, de même que dans certains processus d'apprentissage (Gruber et al. 1989).

La  $\beta$ -END présente dans l'hypophyse est acétylée et probablement inactive, alors que dans les neurones du système nerveux central elle n'est pas acétylée. Les endorphines se lient aux mêmes récepteurs que la morphine et jouent un rôle dans la perception de la douleur. Elles sont cependant de 18 à 30 fois plus puissantes que la morphine!

### 1.2.2.2 Les gonadotropines (LH et FSH)

Les gonadotropines LH et FSH sont aussi appelées hormones glycoprotéiques en raison de leur forte glycosylation. Chacune de ces deux hormones est composée de deux sous-unités: une chaîne  $\alpha$  commune ( $\alpha$ GSU) et une chaîne  $\beta$  spécifique pour chacune (LH $\beta$  et FSH $\beta$ ) (Pierce et al. 1981). Ces deux hormones sont essentielles au fonctionnement des gonades. D'abord, la FSH agit au niveau des cellules folliculaires de l'ovaire et des cellules de Sertoli des testicules. Dans l'ovaire, la FSH stimule la croissance folliculaire, prépare le follicule à l'action de la LH, et augmente la libération de l'estrogène induite par la LH. Chez le mâle, la FSH stimule la prolifération des cellules de Sertoli avant la naissance de façon à établir le nombre de ces cellules chez l'adulte, et par conséquent la quantité de spermatozoïdes produits.

Chez la femelle, la LH stimule, conjointement avec le  $17\beta$ -estradiol, la formation du corps jaune de l'ovaire, qui sécrète la progestérone et aussi le  $17\beta$ -estradiol. D'autre part, elle stimule la libération de l'ovule par l'ovaire et prédispose l'utérus à la nidation de l'oeuf. Chez le mâle, elle induit la production de la testostérone par les cellules de Leydig. La testostérone est impliquée dans le développement et la différenciation des

organes sexuels mâles, à la spermatogenèse, à l'apparition des caractères secondaires masculins, et au développement de la masse musculaire.

### **1.2.2.3 La thyroïdostimuline (TSH)**

Tout comme les gonadotropines, la TSH est aussi une glycoprotéine hétérodimérique. De fait, elle partage la même sous-unité  $\alpha$  ( $\alpha$ GSU) avec la LH et la FSH. La TSH stimule toutes les phases de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes  $T_3$  et  $T_4$  telles l'entrée de l'iode dans la glande, sa transformation en iode organique et l'hydrolyse de la thyroglobuline, la protéine d'emmagasinage de  $T_3$  et  $T_4$  à l'intérieur de la glande. Les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus tels le métabolisme général, la croissance et le développement, et l'activité du système nerveux.

### **1.2.2.4 La prolactine (PRL)**

Comme son nom l'indique, le rôle principal de la prolactine est d'induire et de maintenir la production du lait par les glandes mammaires (voir revue de Bole-Feysot et al. 1998). En accord avec ce rôle, le nombre de cellules lactotropes du lobe antérieur de l'hypophyse augmente chez les femelles en gestation et en lactation. Cette augmentation de cellules lactotropes semble se faire aux dépens des cellules somatotropes (Goluboff et al. 1969; Porter et al. 1990; Porter et al. 1991). Toutefois, lors du sevrage, le processus est inversé. Ces deux types cellulaires dérivent d'un précurseur commun, les somatolactotropes (voir section 1.2.4.1).

### **1.2.2.5 L'hormone de croissance (GH)**

La GH est essentielle à la croissance post-natale en stimulant la croissance et la multiplication des cellules par augmentation directe de la vitesse à laquelle les acides

aminés pénètrent dans la cellule où ils sont transformés en protéines. La GH assure aussi un métabolisme normal des glucides, des lipides, de l'azote et des minéraux. Les actions de la GH sur la croissance s'effectuent toutefois par l'intermédiaire de l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1), un facteur de croissance produit par le foie, qui stimule entre autres le développement du squelette et des muscles squelettiques.

#### **1.2.2.6 L'oxytocine (OT) et la vasopressine (AVP)**

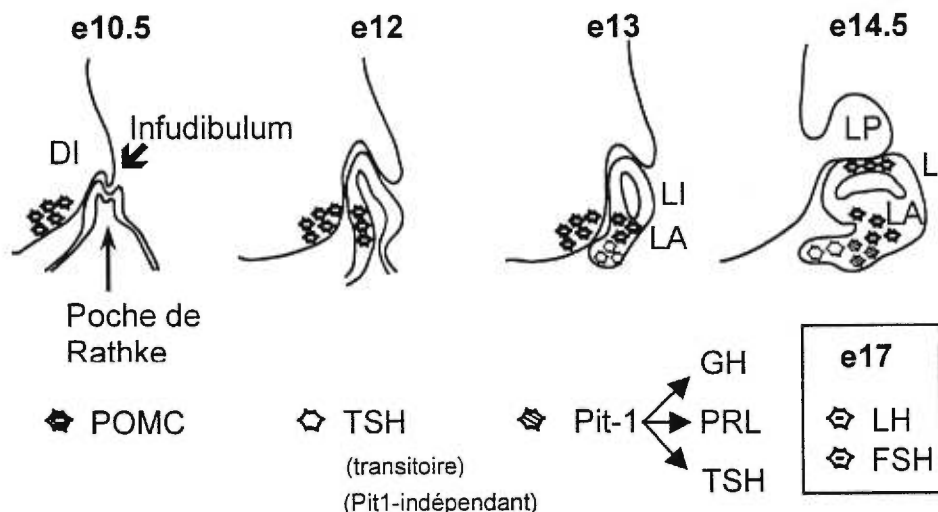
Chacune de ces hormones est synthétisée dans l'hypothalamus: l'OT dans le noyau paraventriculaire, et l'AVP dans le noyau supraoptique. Elles sont amenées aux terminaisons axonales à l'intérieur de l'hypophyse postérieure par des protéines de transport appelées neurophysines. L'OT stimule la contraction des muscles lisses dans l'utérus de la femme enceinte, induisant la parturition. Elle stimule aussi les cellules myoépithéliales entourant les alvéoles mammaires provoquant l'entrée du lait dans les canaux alvéolaires puis son éjection.

L'AVP sert d'une part à augmenter la pression artérielle en provoquant la constriction des artérioles. D'autre part, elle prévient une production excessive d'urine, d'où son autre appellation d'hormone antidiurétique. Elle amène les reins à retirer l'eau de l'urine nouvellement produite et à la retourner dans la circulation sanguine, ce qui réduit le volume urinaire et prévient la déshydratation.

#### **1.2.3 Origine de l'hypophyse**

La double origine de l'hypophyse telle qu'on la connaît aujourd'hui a été décrite vers le milieu du 19<sup>ième</sup> siècle par Rathke. En effet, Martin Heinrich Rathke rapporta pour la première fois en 1838 que l'hypophyse embryonnaire origine d'un contact entre une excroissance du plancher du diencephale et une invagination de l'épithélium pharyngé précoce (Rathke, 1838). Par de délicates expériences de greffes entre le

poulet et la caille, Couly et Le Douarin ont élégamment démontré que cet épithélium, aussi appelé stomodeum, dérive du bourrelet neural antérieur (anterior neural ridge = ANR) et qu'il donnera naissance aux épithéliums nasaux et oraux (Couly et al. 1985; Couly et al. 1987). Cette invagination de l'épithélium oral, visible au jour embryonnaire 8,5 (e8,5) chez la souris, est aujourd'hui appelée la poche de Rathke (Schwind, 1928). Tel qu'illustré à la Fig. 1-1, cette poche se développera pour former l'adénohypophyse, alors que l'évagination du diencephale produira la neurohypophyse. La poche se referme et se détache de l'épithélium oral vers e12,5 (Schwind, 1928) et une intense période de prolifération cellulaire (e12,5-e14) initie le processus de formation du lobe antérieur (Ikeda et al. 1991). Une seconde vague de prolifération cellulaire se produit à l'intérieur du lobe antérieur vers e16,5-e17,5 et coïncide avec la différenciation des cinq types cellulaires qui composent ce lobe (Ikeda et al. 1991).



**Fig. 1-1.** Développement de l'hypophyse.

Diagramme représentant le développement hypophysaire chez la souris. Le lobe postérieur origine du diencephale (DI) alors que l'adénohypophyse [lobe antérieur (LA) et lobe intermédiaire (LI)] dérive de la poche de Rathke. Cette poche se forme à partir d'une invagination de l'épithélium oral et est visible au jour e8,5. Le contact entre la poche de Rathke et une évagination du diencephale (DI) est essentiel au développement normal de l'hypophyse.

Le développement de l'adénohypophyse dépend du contact avec le diencephale, suggérant l'existence de signaux échangés entre ces deux structures (Daikoku et al. 1982). De récentes études ont de fait démontré que certaines molécules de signalisation, particulièrement BMP4 et BMP2 (bone morphogenetic protein) de même que FGF8 (fibroblast growth factor 8) et Wnt5a, sont sécrétées par les cellules du diencephale ou par les cellules de l'épithélium oral adjacentes à la poche de Rathke et forment des gradients dans l'hypophyse en développement. Ces molécules sont en fait directement impliquées et essentielles pour l'induction et la progression de la différenciation de l'hypophyse antérieure (Ericson et al. 1998; Treier et al. 1998).

#### **1.2.4 Développement et différenciation de l'hypophyse**

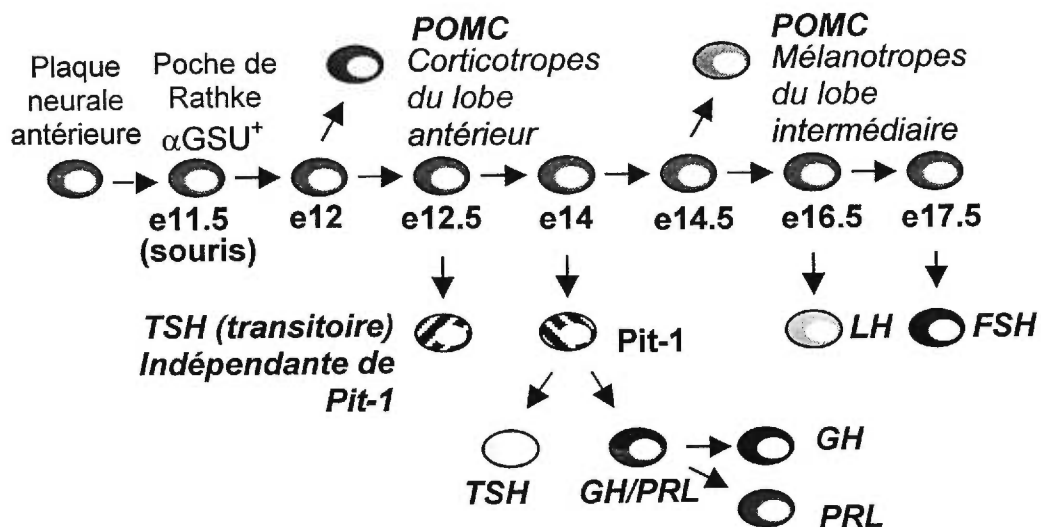
L'hypophyse adulte est composée de six types cellulaires distincts qui apparaissent à des moments précis au cours du développement. Chacun de ces types cellulaires est facilement identifiable par l'hormone qu'il produit.

##### **1.2.4.1 Ontogénie des types cellulaires**

Tel qu'illustré à la Fig. 1-2, les différents types cellulaires qui composent l'hypophyse apparaissent de façon séquentielle au cours du développement. L' $\alpha$ GSU est la première sous-unité hormonale à être exprimée au cours du développement hypophysaire, et ce au jour embryonnaire 11.5 (e11.5) chez la souris. La population cellulaire exprimant cette sous-unité à ce stade ne représente toutefois pas des cellules terminalement différenciées. Les premières cellules terminalement différenciées à apparaître sont les corticotropes au jour e12. Suivent ensuite les cellules thyrotropes à e14, et les mélanotropes, qui sécrètent les MSH, au jour e14.5. Les cellules somatotropes (GH) et lactotropes (PRL) se manifestent au jour e15.5, et les dernières cellules à se différencier sont les gonadotropes. Leur différenciation peut être séparée



en deux stades: l'expression de LH $\beta$  au jour e16.5, et de FSH $\beta$  au jour e17.5. (Voss et al. 1992; Japon et al. 1994). L'apparition ordonnée des lignées hypophysaires constitue donc un modèle intéressant pour étudier les relations entre ces lignées au



**Fig. 1-2.** Différenciation des cellules hypophysaires.

Les différentes cellules qui composent l'hypophyse se différencient de façon séquentielle durant l'organogenèse (Voss et al. 1992). La poche de Rathke, qui constitue l'ébauche de l'hypophyse, origine de la plaque neurale antérieure (Couly et al. 1985). Le premier jour de l'apparition des hormones est indiqué pour chaque lignée cellulaire chez la souris.

cours du développement et de la différenciation cellulaire. De plus, des expériences d'ablation d'un type cellulaire particulier et l'existence de tumeurs sécrétant plusieurs hormones ont permis de mettre en évidence une origine commune de certaines lignées cellulaires. Par exemple, les cellules lactotropes originent des somatotropes (Behringer

et al. 1988; Borrelli et al. 1989) via un type cellulaire intermédiaire qui produit simultanément GH et PRL appelée somatolactotrope (Hoeffler et al. 1985). D'autre part, l'identification de facteurs de transcription requis pour le développement hypophysaire a grandement contribué à nos connaissances sur l'origine des différents types cellulaires.

#### 1.2.4.2 Facteurs de transcription et développement hypophysaire

Plusieurs gènes importants pour l'organogenèse, la cytodifférenciation et la fonction hypophysaire ont été identifiés soit par l'analyse de mutations naturelles chez la souris ou l'humain qui perturbent la différenciation, par délétion d'un gène par recombinaison homologue (knock-out), soit par l'étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression des gènes codant pour les hormones hypophysaires. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription appartenant à différentes familles: POU, lim, homéoprotéine, récepteurs nucléaires, et doigts de zinc.

Le tout premier facteur, identifié en 1988, est le facteur Pit1 un membre de la famille POU (Bodner et al. 1988; Ingraham et al. 1988). Il fût d'abord caractérisé en tant que facteur de transcription important pour l'expression des gènes GH et PRL de même que pour sa propre expression (Rhodes et al. 1993). Deux lignées de souris naines, *Snell* et *Jackson*, n'expriment pas les gènes GH, PRL, et TSH $\beta$ , et trois lignées hypophysaires, les somatotropes, les lactotropes, et les thyrotropes ne prolifèrent pas chez ces souris. L'analyse des défauts génétiques responsables du phénotype de ces souris révéla des mutations dans le gène *Pit1*, élargissant par le fait même le rôle de Pit1 non seulement dans l'expression des gènes hypophysaires mais aussi dans la différenciation et la prolifération de trois types cellulaires de l'hypophyse (Li et al. 1990; Castrillo et al. 1991; Steinfelder et al. 1991; Gordon et al. 1993). Des mutations similaires dans le gène *PIT1* ont été identifiées chez des humains souffrant du syndrome

congénital d'hypothyroïdisme, de nanisme, et de déficience en PRL (Ohta et al. 1992; Pfaffle et al. 1992; Radovick et al. 1992).

Depuis la découverte du facteur Pit1, plusieurs autres facteurs ont été identifiés dont le facteur Ptx1 (Pituitary homeobox 1). Ptx1 est un facteur de transcription à homéodomaine important pour l'expression de la POMC [(Lamonerie et al. 1996) et présenté à l'annexe I]. Ptx1 est exprimé avant même la formation de la poche de Rathke, puisqu'il est déjà présent dans le stomodeum (Lanctôt et al. 1997). Son expression est maintenue dans tous les dérivés du stomodeum, incluant l'hypophyse. Un autre membre de la famille Ptx, Ptx2, est aussi exprimé dans le stomodeum, faisant ainsi de ces deux facteurs les marqueurs les plus précoces pour le développement hypophysaire (Mucchielli et al. 1996). Des travaux présentés en détails au chapitre II ont montré que Ptx1 est impliqué dans l'expression de plusieurs gènes hypophysaires, en plus d'être requis pour l'expression du facteur Lim3/Lhx3 (voir plus bas), positionnant ainsi Ptx1 en amont de Lim3/Lhx3 dans la cascade de régulateurs importants pour le développement hypophysaire (Tremblay et al. 1998).

Le facteur Rpx (aussi appelé Hesx1) est une homéoprotéine exprimée de façon transitoire dans la poche de Rathke (Hermesz et al. 1996; Thomas et al. 1995). Des études ont montré que Rpx s'associe avec le facteur Prop-1 (Prophet-of-Pit1 – voir plus bas), antagonisant alors l'activation dépendante de Prop-1 (Sornson et al. 1996). D'autres études préliminaires suggèrent que l'extinction de l'expression de Rpx soit requise au développement normal de l'hypophyse (Dr. Kathy Mahon, communication personnelle). A l'opposé, Dattani et al. ont récemment montré que l'inactivation du gène *Rpx* chez la souris résulte, entre autres, en de sévères malformations de la poche de Rathke lors de l'organogenèse de l'hypophyse (Dattani et al. 1998).

Deux facteurs lim-homéodomaine, Lim3/Lhx3 et Lhx4, sont exprimés tôt durant le développement hypophysaire (e9.5) (Bach et al. 1995; Seidah et al. 1994; Sheng et

al. 1997). Au jour e12,5, *Lim3/Lhx3* est exprimé dans la plupart des cellules de la poche de Rathke alors que *Lhx4* est restreint aux cellules du lobe antérieur (Bach et al. 1995). Au jour e15,5, l'expression de *Lhx4*, mais non celle de *Lim3/Lhx3*, s'atténue (Bach et al. 1995). La délétion de *Lim3/Lhx3* par recombinaison homologue chez la souris mène à un blocage de la prolifération cellulaire au stade de la poche de Rathke où tous les types cellulaires sont absents sauf les corticotropes (Sheng et al. 1996). Ces résultats suggèrent que dès le stade e9.5, il existe déjà dans l'hypophyse en formation deux populations cellulaires distinctes. De plus, dans les souris *Lim3/Lhx3*<sup>-/-</sup>, l'expression du gène *Rpx* est éteinte prématurément suggérant un rôle pour *Lim3/Lhx3* dans le maintien de l'expression de *Rpx* (Sheng et al. 1996). D'autre part, *Lim3/Lhx3* est impliqué directement dans l'expression de certains gènes hypophysaires (Bach et al. 1995) (voir section 1.2.4.2). L'inactivation du gène *Lhx4* produit aussi un blocage du développement hypophysaire à un niveau plus tardif de l'organogenèse comparativement au knock-out de *Lim3/Lhx3* (Sheng et al. 1997). La spécification cellulaire a cependant lieu puisque les cinq types cellulaires du lobe antérieur sont présents mais en nombre beaucoup moins important que dans l'hypophyse normale (Bach et al. 1995). Cependant, l'inactivation simultanée de ces deux gènes chez la souris induit un blocage de la formation de la poche de Rathke (Bach et al. 1995). Il semble donc que ces deux facteurs *Lhx* jouent des rôles partiellement redondants au cours des premières étapes de la formation de la poche mais que la spécification cellulaire requiert *Lhx3*, alors que *Lhx4* agirait dans la seconde phase de prolifération cellulaire.

Le gène *Prop-1* est exprimé transitoirement au cours du développement hypophysaire et code pour un facteur à boîte homéo qui stimule l'expression du gène *Pit1* (Sornson et al. 1996). Une expression insuffisante du facteur *Pit1*, due à une mutation dans le gène *Prop-1*, est responsable du phénotype des souris naines *Ames*.

Ces souris présentent une diminution importante des trois types cellulaires dépendant de Pit1 (somatotropes, lactotropes et thyrotropes) (Gage et al. 1996b). Prop-1 semble aussi impliqué dans l'extinction du gène *Rpx* puisque dans les souris *Ames*, l'expression de *Rpx* est prolongée jusqu'au jour e18.5 (Gage et al. 1996a; Sornson et al. 1996). Des mutations dans le gène *PROP-1* humain sont responsables du syndrome familial de déficience combinée des hormones hypophysaires (Wu et al. 1998). Chez ces patients, la sécrétion des gonadotropines est aussi dramatiquement réduite suggérant un rôle direct ou indirect pour Prop-1 dans l'ontogenèse de quatre lignées hypophysaires: gonadotropes, lactotropes, somatotropes et thyrotropes (Wu et al. 1998).

De nombreux autres facteurs de transcription, tels SF-1, ER, TR, GATA-2, Zn-15, Msx-1, Isl-1, Brn4, Nkx3.1, TTF-2, Six3, Nur77, NeuroD1, P-Frk et Egr-1 sont aussi exprimés dans l'hypophyse en développement et/ou adulte. Quoiqu'un rôle n'ait pas encore été identifié pour chacun de ces facteurs, plusieurs sont toutefois impliqués directement dans la régulation de l'expression de gènes hypophysaires. Ces régulateurs et leur mode d'action sont décrits en détails à la section 1.4.

### **1.3 Régulation de l'expression génique**

Les différentes cellules qui composent les tissus d'un même organisme ont des fonctions bien distinctes. Par conséquent, chacune doit produire des protéines spécifiques à un tissu donné, comme par exemple l'hypophyse, ce qui implique que seul un sous-ensemble de gènes cellulaires seront exprimés. L'expression des gènes est un processus complexe régulé à plusieurs niveaux, depuis l'accès à la molécule d'ADN jusqu'à l'obtention d'une protéine fonctionnelle.

### 1.3.1 Structure de la chromatine

Les histones, protéines nucléaires qui interagissent avec l'ADN pour former un nucléosome, sont essentielles à la régulation de la transcription et à l'empaquetage de l'ADN en chromatine. La chromatine peut être séparée en deux types. L'euchromatine est la chromatine qui se décondense durant l'interphase lors du cycle cellulaire et qui contient la vaste majorité des gènes codant pour les protéines cellulaires. A l'inverse, l'hétérochromatine demeure condensée en tout temps, même durant l'interphase, et elle est principalement constituée de séquences répétitives d'ADN. Elle est donc généralement inactive. La structure condensée de la chromatine constitue ainsi la première barrière pour l'expression des gènes.

Le noyau central du nucléosome est constitué de 8 histones dans une structure tripartite: un tétramère d'histones (H3-H4)<sub>2</sub> organise 120 pb d'ADN de façon identique à l'octamère d'histone final. C'est seulement lorsque ces 120 pb d'ADN sont enroulées autour du tétramère que viennent s'ajouter 2 dimères d'histones H2A-H2B, un dimère de chaque côté du tétramère, formant ainsi le noyau du nucléosome, une structure plus complexe qui contacte maintenant environ 160 pb d'ADN (Hayes et al. 1990). L'histone H1 agit ensuite comme protéine de jonction rapprochant les nucléosomes pour former une structure très compacte qui réprime ainsi la transcription *in vitro* et *in vivo*. Les nucléosomes doivent alors se décondenser pour rendre les gènes accessibles à la machinerie transcriptionnelle. Une indication des changements importants dans la structure de la chromatine dans les régions de gènes transcriptionnellement actifs est une sensibilité accrue à la désoxyribonucléase I (DNase I). En plus de cette sensibilité accrue à la DNase I dans la chromatine active, il existe des sites dits hypersensibles à la DNase I. Ces sites se retrouvent généralement dans les 1 000 pb en amont des gènes actifs, ce qui correspond à la région contenant plusieurs sites de liaisons de divers facteurs de transcription, ainsi que le site d'initiation de la transcription auquel se

lie la machinerie transcriptionnelle de base (voir section 1.3.3). Plusieurs mécanismes existent dans la cellule eucaryote pour modifier la structure de la chromatine. Ces mécanismes incluent les facteurs responsables de l'assemblage de l'ADN en chromatine, une machinerie de remodelage de la chromatine, et l'acétylation des histones.

L'assemblage de l'ADN en chromatine se produit principalement lors de la réplication de l'ADN. Ce processus requiert de l'ATP et la machinerie responsable de l'assemblage périodique des nucléosomes comprend un complexe protéique nommé ACF (**A**T**P**-utilizing chromatin assembly and remodelling factor) de même qu'une chaperone d'histone tel que CAF-1 (**ch**romatin **a**ssembly **f**actor-1) ou NAP-1 (**n**ucleosome **a**ssembly **p**rotein-1) (Ito et al. 1997). Cette réaction d'assemblage de la chromatine se fait par l'action conjuguée de l'ACF et d'une chaperone d'histone n'impliquant ni l'acétylation, ni la désacétylation des histones (voir ci-bas).

Tout comme l'assemblage de l'ADN en chromatine, le remodelage de la chromatine, ou repositionnement des nucléosomes, requiert de l'ATP. Les facteurs impliqués dans ce processus ont d'abord été identifiés chez la levure et appelés le complexe SWI/SNF (**s**witch/**s**ucrose **n**on-fermenting). Aujourd'hui, ces machineries comprennent aussi le complexe RSC chez la levure, les complexes NURF, CHRAC, ACF et BRM chez la drosophile, et, chez les mammifère, les complexes contenant BRG1 ou hbm1 [revue dans (Tsukiyama et al. 1997)]. Ces complexes fonctionnent en perturbant l'interaction ADN-histone dans un mononucléosome facilitant ainsi la liaison de facteurs de transcription (Côté et al. 1994). Un autre mécanisme existe toutefois pour remodeler les nucléosomes. Il s'agit de la liaison de facteurs de transcription. En effet, certains facteurs de transcription, dont le récepteur des glucocorticoïdes, le facteur GAL4, et le facteur HNF-3, peuvent se lier à leur site à l'intérieur du nucléosome, ce qui induit un changement dans sa structure, rendant par ce fait même accessible les sites

de liaison de d'autres facteurs de transcription (Perlmann et al. 1988; Pina et al. 1990; Archer et al. 1991; Workman et al. 1992; McPherson et al. 1993). Fait intéressant, le facteur HNF-3 semble posséder des propriétés de liaison aux nucléosomes similaires à celles de l'histone H1 et la présence périodique de site de liaison pour un tel facteur permet de réorganiser plusieurs nucléosomes (McPherson et al. 1993). Un autre aspect important du remodelage des nucléosomes concerne le rapprochement de deux séquences de régulation normalement éloignées l'une de l'autre, facilitant ainsi l'interaction entre les facteurs de transcription (Schild et al. 1993; Gothard et al. 1996).

Malgré le fait que Vincent Allfrey proposa dès 1964 que l'acétylation des histones était associée à l'activité transcriptionnelle dans les cellules eucaryotes (Allfrey et al. 1964), il a fallu attendre plus d'une décennie pour que plusieurs groupes démontrent que les noyaux d'histones acétylées sont de fait préférentiellement associés à la chromatine transcriptionnellement active (Sealy et al. 1978; Vidali et al. 1978; Hebbes et al. 1988). L'acétylation se produit sur des résidus lysine situés dans la queue N-terminale des histones, ce qui a pour effet de neutraliser sa charge positive et ainsi diminuer son affinité pour l'ADN (Hong et al. 1993). Suite à l'acétylation des histones, il se produit une altération de la conformation des nucléosomes (Norton et al. 1989) augmentant l'accessibilité des facteurs de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN (Lee et al. 1993; Vettese-Dadey et al. 1996).

Ce n'est qu'au cours des deux dernières années que nos connaissances sur la relation entre l'acétylation des histones et l'expression des gènes ont pris un nouveau tournant avec l'identification de protéines possédants une activité acétylase ou désacétylase [revue dans (Grunstein, 1997)]. Chez les vertébrés, la famille des acétylases d'histones comprend: TAF130/250, qui est en fait une sous-unité du complexe TFIID (une composante de base de la machinerie transcriptionnelle associée à l'ARN polymérase II – voir section 1.3.3.1) et est donc essentiellement associée à tous



les promoteurs lors de l'initiation de la transcription (Mizzen et al. 1996). Le facteur p300/CBP a d'abord été décrit comme un co-activateur transcriptionnel (voir section 1.3.3.2.2.6.2) interagissant avec plusieurs facteurs de transcription (Bannister et al. 1996; Ogryzko et al. 1996), mais de récentes études ont démontré qu'il est de plus associé à l'holoenzyme Pol II (voir section 1.3.3.1.1.2) (Nakajima et al. 1997). Une activité histone acétylase est aussi présente dans d'autres co-activateurs transcriptionnels, ACTR (Chen et al. 1997), SRC-1 (Spencer et al. 1997) et P/CAF (Blanco et al. 1998), qui interagissent avec des récepteurs nucléaires de façon hormone-dépendante. De plus, P/CAF se retrouve souvent associée avec p300/CBP (Yang et al. 1996), ACTR et SRC-1 (Chen et al. 1997; Spencer et al. 1997), formant ainsi un complexe avec plusieurs activités acétylases. A ce jour, les protéines responsables de la désacétylation des histones sont les désacétylases HD1 (Taunton et al. 1996) et HD2 (Lusser et al. 1997).

Il existe actuellement trois modèles pour expliquer comment l'acétylation/désacétylation des histones affecte l'expression des gènes. D'abord un modèle non-spécifique dans lequel la modification des histones se produit à l'échelle du génome avec peu de spécificité pour des régions précises de la chromatine. Dans un deuxième modèle, la modification des histones est sélectivement ciblée aux régions promotrices sans toutefois être spécifiques à des gènes précis. C'est le cas par exemple de l'activité acétylase de la sous-unité TAF130/250 du complexe TFIID, complexe présent dans tous les promoteurs fonctionnels. Finalement, le modèle de ciblage à des gènes précis implique le recrutement des activités de modification des histones à des promoteurs particuliers par le biais de protéines se liant à des séquences spécifiques d'ADN. Le meilleur exemple pour ce modèle est la répression de la transcription par des complexes de désacétylation contenant HD1/2. Ces complexes interagissent directement avec des répresseurs protéiques qui se lient spécifiquement à

l'ADN tels Mad et YY1, ou encore avec leurs co-répresseurs (NcoR, SMRT), suggérant que la répression spécifique par ces facteurs implique l'ancrage des désacétylases d'histones (Yang et al. 1996; Ayer et al. 1995).

### 1.3.2 Méthylation de l'ADN

La modification covalente de l'ADN constitue certes un mécanisme direct et puissant pour réguler l'expression des gènes. Le génome des vertébrés contient 60-90% de ses cytosines dans le dinucléotide CpG méthylées par l'action d'une ADN méthyletransférase (Gruenbaum et al. 1981; Bestor et al. 1994). La méthylation est toutefois absente dans le génome des cellules souches embryonnaires où elle n'est pas requise pour leur viabilité. Par contre, elle s'avère essentielle pour la viabilité cellulaire lorsque ces cellules commencent à se différencier (Panning et al. 1996). Par ailleurs, la délétion du gène codant pour l'ADN méthyletransférase par recombinaison homologue résulte en une léthalité embryonnaire (Li et al. 1992). La méthylation de l'ADN est aussi un déterminant crucial dans le processus d'imprinting (Li et al. 1993; King et al. 1995).

La méthylation de l'ADN peut, par exemple, altérer la reconnaissance de l'ADN par la machinerie de transcription. En fait, il existe une corrélation directe entre une augmentation de la densité en méthyle-CpG et la répression de la transcription (Boyes et al. 1992; Hsieh, 1994). La méthylation peut affecter l'expression d'un seul gène ou, plus globalement, de plusieurs gènes à l'intérieur d'un chromosome. Le rôle de la méthylation de l'ADN dans la répression de la transcription a été confirmé par des expériences d'inhibition de l'activité méthyletransférase par le 5-azacytidine, qui induit l'activation de plusieurs gènes normalement réprimés (Jones, 1985).

Des études ont démontré que la répression de la transcription par la méthylation est en fait causée par la liaison directement au méthyle-CpG de répresseurs

transcriptionnels (Boyes et al. 1991). Deux protéines, MeCP1 et MeCP2, associées au méthyle-CpG et possédant des activités de répresseur ont été identifiées (Meehan et al. 1989; Lewis et al. 1992). Tout comme la méthylation de l'ADN en soi, MeCP2 n'est pas requis pour assurer la viabilité des cellules souches, mais elle est essentielle au développement embryonnaire (Tate et al. 1996). MeCP2 contient deux domaines distincts: un domaine de liaison à l'ADN méthylé, et un domaine de répression (Nan et al. 1993). MeCP2 est associé à la chromatine et peut déplacer l'histone H1, ce qui pourrait expliquer l'assemblage distinct de la chromatine sur l'ADN méthylé (Nan et al. 1997; Nan et al. 1996; Keshet et al. 1986). De plus, la fusion d'une portion d'ADN organisé en chromatine et méthylé (contenant donc MeCP2) à un promoteur non-méthylé confère la répression transcriptionnelle (Kass et al. 1993). Il semble donc que MeCP2 n'ait pas besoin de se lier directement à des séquences régulatrices pour conférer la répression de la transcription. L'assemblage de l'ADN en chromatine aurait alors un impact positif sur le mécanisme d'action à distance de MeCP2 en le rapprochant des composantes de régulation de la transcription. Le mode d'action de MeCP2 pour la répression de la transcription a récemment été mis à jour; MeCP2 recrute une histone désacétylase afin de réprimer la transcription (Jones et al. 1998).

### **1.3.3 Régulation transcriptionnelle**

Chez les eucaryotes, les ARN polymérases I, II, et III, sont responsables de la transcription de différents groupes de gènes. L'ARN pol I transcrit les gènes codant pour les ARNs ribosomiaux, la pol II transcrit les gènes des ARN messagers (ARNm), et la polymérase III est responsable principalement de la transcription des gènes codant les ARNs de transfert. Le travail présenté dans cette thèse portant toutefois exclusivement sur la transcription des gènes par l'ARN polymérase II, seule une analyse plus détaillée de la transcription par cette polymérase sera effectuée.

La transcription par l'ARN polymérase II est complexe et fait l'objet d'études intensives depuis plusieurs années. Chaque promoteur des gènes reconnus par cette polymérase possède deux types d'éléments caractéristiques: les éléments de base du promoteur (promoteur minimal), et les éléments de modulation de l'activité promotrice. Les éléments du promoteur minimal comprennent habituellement une boîte TATA et/ou une séquence initiatrice (Inr). La boîte TATA, comme son nom l'indique, est une courte séquence AT-riche qui se retrouve à environ -25 bp du site d'initiation de la transcription (+1). Cet élément est en fait le site de liaison du facteur TBP (TATA-binding protein), une composante du complexe TFIID (voir section 1.3.3.1). La séquence consensus de cet élément est souvent TATAAA, mais elle diffère considérablement dans certains cas (Zenzie-Gregory et al. 1993; Wiley et al. 1992; Singer et al. 1990). Quant à l'élément Inr, il chevauche le premier nucléotide transcrit (+1) et il est suffisant pour conférer la spécificité d'initiation de la transcription même en absence d'une boîte TATA (Smale et al. 1989). La séquence consensus pour l'élément Inr est PyA<sub>+1</sub>N(T/A)PyPy (où A<sub>+1</sub> correspond au site d'initiation de la transcription) (Smale et al. 1989; Javahery et al. 1994). Les deux éléments, TATA et Inr, fonctionnent indépendamment ou de façon synergique. Les promoteurs cellulaires contiennent l'un, l'autre, les deux, ou aucun des 2 éléments (Smale, 1994). Le facteur TBP, et donc TFIID, ne peut pas se lier directement aux promoteurs sans boîte TATA. Par conséquent, l'assemblage du complexe de pré-initiation (voir section 1.3.3.1.1) à ces promoteurs requiert un autre élément identifié récemment dans plusieurs promoteurs sans boîte TATA (TATA-less) de la drosophile et nommé DPE (downstream promoter element) (Burke et al. 1996). Cet élément est situé à +30 pb et agit en conjonction avec les séquences du site d'initiation pour permettre l'ancrage de TFIID au promoteur. Les éléments du promoteur minimal sont en soit suffisants pour le recrutement spécifique de l'ARN polymérase II de même que pour la transcription basale, c'est-à-dire non-modulée.

Les éléments de modulation quant à eux ne sont pas requis pour l'initiation de la transcription, mais agissent plutôt en stimulant ou inhibant les niveaux de base de la transcription (enhancers et repressors). Il s'agit en fait de courtes séquences d'ADN de 5-15 pb correspondant à des sites de liaisons de facteurs de transcription (éléments-*cis*). Tous les gènes possèdent une combinaison d'éléments-*cis* positifs et négatifs, dont le nombre et la position sont uniques pour chaque gène. La plupart de ces éléments se retrouvent habituellement dans une région de plusieurs centaines de pb en amont du +1, mais d'autres exercent leur contrôle sur des distances beaucoup plus grandes (1 à 30 kpb) en amont et même en aval du +1 comme par exemple dans les introns ou dans la région 3' du gène. Ces éléments sont reconnus par des facteurs de transcription, activateurs ou répresseurs. Ainsi la quantité, mais aussi l'activité, de ces facteurs représentent une composante importante de la régulation des niveaux d'expression de leurs gènes cibles. Ceci implique que ces régulateurs de l'expression génique doivent aussi être soumis à une régulation (voir section 1.3.3.2.2).

### **1.3.3.1 Les facteurs généraux de transcription**

La transcription peut être séparée en trois étapes distinctes: (1) l'initiation de la transcription, (2) l'élongation de l'ARNm, et (3) la terminaison de la transcription. Longtemps, on a cru que ces étapes étaient effectuées par trois entités distinctes. Toutefois, l'identification du complexe de l'holoenzyme de la polymérase II a révélé que ce méga-complexe holoenzymatique contient toutes les composantes qui régulent l'initiation de la transcription, l'élongation de l'ARNm, la maturation de l'ARNm, et la terminaison de la transcription.

### **1.3.3.1.1 Le complexe de pré-initiation**

La première étape de l'initiation de la transcription d'un gène est la formation du complexe de pré-initiation (PIC). Ce complexe est composé d'environ 30 polypeptides collectivement appelés facteurs généraux de transcription (GTF). La plupart de ces facteurs ont été complètement purifiés et nommés TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, et TFIIH (TF = transcription factor). Il est généralement accepté que ces GTF peuvent être assemblés de façon séquentielle sur le promoteur pour ainsi former un complexe nucléoprotéique qui recrute ensuite l'ARN pol II. Toutefois, l'existence de l'holoenzyme de l'ARN polymérase II suggère que la majorité de la machinerie d'initiation de la transcription pourrait se lier au promoteur en une seule étape. Il sera décrit plus en détails à la section 1.3.3.1.1.2.

#### **1.3.3.1.1.1 Assemblage du PIC**

Le premier GTF à contacter le promoteur est TFIID. Tel que mentionné ci-haut, TFIID reconnaît spécifiquement la boîte TATA via sa sous-unité TBP. TBP a été identifié dans une impressionnante variété d'organismes, soulignant ainsi le caractère essentiel de cette protéine. TBP est un facteur de transcription eucaryote universel puisqu'il est aussi impliqué dans la transcription par les ARN polymérases I et III (Sharp, 1992; Struhl, 1994; Hernandez, 1993). En plus de TBP, le complexe TFIID comprend au moins 8 sous-unités additionnelles appelées TAF<sub>II</sub> (TBP-associated factor). Ces TAF<sub>II</sub> sont entre autres requis pour la stimulation de la transcription par des protéines activatrices. De plus, de nombreuses études supportent un rôle des TAF<sub>II</sub> dans la reconnaissance du promoteur, plus particulièrement pour une utilisation efficace de l'élément Inr (Smale et al. 1990; Pugh et al. 1991; Zhou et al. 1992; Kaufmann et al. 1994; Purnell et al. 1994) et de l'élément DPE (Burke et al. 1996).

TFIID est le plus imposant des TAF<sub>II</sub> et possède plusieurs particularités dont une activité sérine kinase spécifique à la large sous-unité de TFIIF (Dikstein et al. 1996). Une structure similaire à l'octamère d'histone, composée d'un hétérotétramère de TAF<sub>II</sub>31 et TAF<sub>II</sub>80 entre deux homodimères de TAF<sub>II</sub>20, existe à l'intérieur de TFIID quoique sa fonction demeure obscure (Xie et al. 1996). La plus grosse sous-unité de TFIID, TAF<sub>II</sub>250, interagit directement avec TBP et semble cruciale pour l'ancrage des autres TAF<sub>II</sub> à TBP (Weinzierl et al. 1993). Plusieurs autres interactions TAF<sub>II</sub>-TBP et TAF<sub>II</sub>-TAF<sub>II</sub> ont aussi été décrites [revue dans (Burley et al. 1996)].

Suite à la liaison de TFIID à l'ADN, TFIIB est recruté pour former un complexe ternaire plus stable (le complexe DB). Le rôle principal de TFIIB est de recruter TFIIF et la pol II dans le complexe (voir ci-bas). De fait, TFIIB contient des sites d'interaction pour le complexe TFIID-ADN (Buratowski et al. 1989; Maldonado et al. 1990), TFIIF (Ha et al. 1993), et l'ARN pol II (Ha et al. 1993; Fang et al. 1996). L'interaction entre TFIIB et la pol II est d'autant plus importante qu'elle est critique pour la spécification du site d'initiation de la transcription (Li et al. 1994). Tout comme TFIIB, TFIIA peut aussi interagir avec le complexe TBP-ADN (Buratowski et al. 1989; Cortes et al. 1992; Lee et al. 1992) induisant ainsi une augmentation de l'affinité de TBP pour la boîte TATA (Imbalzano et al. 1994). De par cette interaction, TFIIA déplace des répresseurs associés à TBP comme, par exemple, la topoisomérase I (Merino et al. 1993) et le répresseur MOT1 (Auble et al. 1994). En plus de cette activité "d'anti-répression", TFIIA agit aussi comme activateur transcriptionnel (Ma et al. 1993; Ma et al. 1996).

Dès que TFIID et TFIIB sont assemblés au promoteur, TFIIF entre dans le complexe et recrute la pol II, formant ainsi le complexe DBpolIF (Flores et al. 1991). TFIIF prévient l'initiation cryptique de la transcription en inhibant et même renversant la liaison de la polymérase aux séquences non-promotrices de l'ADN (Killeen et al. 1992). En plus de son rôle dans l'initiation de la transcription, TFIIF augmente aussi la

spécificité et l'efficacité de la transcription par la pol II en stimulant le taux d'élongation (Bengal et al. 1991). TFIIF est le seul GTF impliqué dans l'initiation et l'élongation de la transcription (Price et al. 1989). Avec maintenant TFIID, TFIIB et TFIIF dans le complexe, la pol II ne peut toujours pas initier la transcription. Elle requiert la présence de 2 autres GTF: TFIIE et TFIIH. TFIIE se joint au complexe via une interaction avec la pol IIA (forme non phosphorylée – voir section 1.3.3.1.3) et recrute ensuite TFIIH [complexe DBpolFEH; (Maxon et al. 1994; Flores et al. 1990)]. Ce dernier est un complexe multi-protéique qui contient entre autres une activité de protéine kinase spécifique au domaine C-terminal de l'ARN polymérase (CTD = carboxy-terminal domain) (voir section 1.3.3.1.3) (Lu et al. 1992), et deux ADN hélicases dépendantes de l'ATP (Drapkin et al. 1994). De plus, le clonage de l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour les sous-unités de TFIIH a révélé un rôle insoupçonné pour ce facteur dans la réparation de l'ADN [(nucleotide excision repair = NER; (Weeda et al. 1990)], supportant l'hypothèse que la transcription et la réparation de l'ADN sont deux processus intimement liés (Feaver et al. 1993; Wang et al. 1994). De fait, des lésions dans l'ADN sont réparées beaucoup plus rapidement dans des gènes transcriptionnellement actifs qu'inactifs (Mellon et al. 1989). L'addition de TFIIE et TFIIH au complexe de pré-initiation complète son assemblage ce qui, par le fait même, rend la pol II compétente pour l'initiation de la transcription.

#### 1.3.3.1.1.2 L'holoenzyme pol II

L'holoenzyme pol II a été identifiée chez la levure et chez les mammifères (Thompson et al. 1993; Kim et al. 1994; Chao et al. 1996; Ossipow et al. 1995; Maldonado et al. 1996). Cet immense assemblage protéique *in vivo* peut contenir les 5 GTF essentiels à la transcription, la pol II et d'autres protéines appelées complexe SRB/mediator, retrouvées uniquement dans l'holoenzyme (Koleske et al. 1994; Koleske



et al. 1995; Kim et al. 1994). Ainsi, en théorie, la liaison d'un facteur de transcription à l'ADN et son interaction avec une ou plusieurs composantes de l'holoenzyme pol II serait suffisante pour activer la transcription. En fait, plusieurs groupes ont démontré que la création d'une interaction artificielle entre une protéine se liant à l'ADN et l'holoenzyme pol II était suffisante pour activer la transcription (Barberis et al. 1995; Farrell et al. 1996; Koleske et al. 1994; Hengartner et al. 1995). Une augmentation de la concentration en holoenzyme stimule aussi la transcription, qui n'est alors plus dépendante des activateurs. Ceci démontre bien que le rôle des activateurs est de recruter, via leur domaine d'activation (Keaveney et al. 1998), l'holoenzyme qui est en concentration limitante (Gaudreau et al. 1998).

L'holoenzyme pol II, de par sa composition, semble impliqué dans plusieurs processus entourant les premières étapes de l'expression d'un gène. Une telle fonction potentiellement attribuable à l'holoenzyme est le remodelage de la chromatine. Chez la levure, il semble qu'une partie des holoenzymes pol II présents dans la cellule contiennent le complexe SWI/SNF, un complexe impliqué dans le remodelage de la chromatine (voir section 1.3.1) (Wilson et al. 1996). De plus, le rôle de certaines protéines du complexe SRB/mediator (protéines spécifiquement associés à l'holoenzyme pol II) commence à être connu, attribuant par le fait même d'autres fonctions à l'holoenzyme. Par exemple, le facteur SRB10 est en fait une kinase qui, tout comme la cdk7 de TFIIIF, peut phosphoryler le CTD de l'ARN polymérase II, une étape essentielle à la maturation de l'ARNm (voir ci-bas) (Liao et al. 1995), impliquant ainsi l'holoenzyme dans ce processus. Enfin, certains facteurs requis pour la maturation de l'ARNm et la terminaison de la transcription (voir plus bas) ont déjà été copurifiés avec l'holoenzyme pol II (McCracken et al. 1997). Il apparaît donc que l'holoenzyme pol II peut aisément être défini comme un méga-complexe protéique contenant approximativement 70 polypeptides. Cet immense complexe, de la taille d'un ribosome

(la machinerie responsable de la traduction des ARNm) pourrait difficilement diffuser librement dans le noyau. Ainsi, Halle et al. ont suggéré que l'initiation de la transcription par ce complexe ait lieu dans une usine de transcription, appelée transcriptosome ancrée à des endroits précis du noyau (Halle et al. 1996). En accord avec cette hypothèse est le fait qu'une composante de l'holoenzyme pol II de mammifère, le facteur de transcription YY1 (Maldonado et al. 1996), est la protéine NMP-1, une protéine associée à la matrice nucléaire (Guo et al. 1990). Ainsi, YY1/NMP-1 pourrait ancrer l'holoenzyme pol II à la matrice nucléaire, possiblement par une interaction avec la forme phosphorylé du CTD de l'ARN pol II (Patturajan et al. 1998).

#### **1.3.3.1.2 Initiation de la transcription**

L'initiation de la transcription par la pol II requiert de l'énergie. Cette énergie est nécessaire à la séparation des deux brins d'ADN, rendant ainsi accessible à la polymérase le gabarit d'ADN. Ce processus, appelé fonte du promoteur (promoter melting), est immédiatement suivi de la formation du premier lien phosphodiester de l'ARNm. Des études ont révélé que c'est une sous-unité hélicase de TFIIH qui requiert cette énergie sous forme d'ATP (Drapkin et al. 1994; Holstege et al. 1996). De telles activités hélicases sont normalement associées aux processus (comme la réplication de l'ADN) qui nécessitent la relaxation de l'ADN, facilitant ainsi la séparation des brins d'ADN. Il est donc légitime de supposer que l'hélicase de TFIIH joue un rôle similaire dans la fonte du promoteur.

#### **1.3.3.1.3 Élongation et maturation de l'ARNm et terminaison de la transcription: implication du CTD de l'ARN polymérase II**

L'élongation de l'ARNm provoque la dissociation de l'ARN polymérase du PIC. Ce processus est appelé dégagement du promoteur (promoter clearance), et signifie

l'entrée dans l'étape d'élongation. Seul TFIID reste lié au promoteur lors de l'élongation. Les autres GTF sont soit libérés, soit associés à la pol II pour faciliter l'élongation, ce qui est par exemple le cas de TFIIIF. La polymérase II s'arrête toutefois temporairement (pausing) après avoir synthétisé de 20 à 30 nucléotides. C'est durant cette pause, qui définit précisément la transition entre l'initiation et l'élongation et qui est limitante pour la transcription, que le CTD de la pol II devient abondamment phosphorylé (O'Brien et al. 1994; Dahmus, 1996; Krumm et al. 1995). Cette structure carboxy-terminale de l'ARN polymérase II est extrêmement bien conservée au cours de l'évolution. Elle est constituée de répétitions en tandem de l'heptapeptide Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser dont le nombre varie de 26 chez la levure à 52 chez l'humain [revue dans (Dahmus, 1994)]. Ainsi la pol II recrutée dans le PIC de même que celle présente dans l'holoenzyme est la forme non-phosphorylée (forme pol IIA) (Lu et al. 1991; Laybourn et al. 1989; Ossipow et al. 1995), alors que la polymérase du complexe d'élongation est phosphorylée sur son CTD (forme pol IIO) (Laybourn et al. 1989; O'Brien et al. 1994; Dahmus, 1994).

Plusieurs kinases peuvent phosphoryler le CTD *in vitro*, ce qui n'est pas surprenant puisque près de la moitié des acides aminés qui le composent peuvent être phosphorylés (Dahmus, 1994). Deux kinases sont toutefois responsables de cette phosphorylation *in vivo*: une kinase impliquée dans la progression du cycle cellulaire, cdk7 (cyclin-dependent kinase), qui est en fait une sous-unité de TFIIH (Feaver et al. 1994; Roy et al. 1994; Serizawa et al. 1995; Shiekhattar et al. 1995; Parada et al. 1996) et la protéine SRB10 associée à l'holoenzyme (Liao et al. 1995). Dans les cellules de mammifères, cdk7 est associée avec sa partenaire, la cycline H et une protéine activatrice MAT-1, formant ainsi un complexe appelé CAK (cdk-activating kinase). Le complexe CAK semble jouer un rôle crucial dans la régulation de la progression du cycle cellulaire. Le fait que CAK soit une composante essentielle de TFIIH permet de supposer que l'initiation de la transcription par la pol II soit associée à

la régulation du cycle cellulaire. Cependant, Adamczewski et al. ont montré que l'activité kinase de TFIIH ne varie pas lors du cycle cellulaire (Adamczewski et al. 1996). Il semble que l'absence de régulation de l'activité kinase soit due au facteur MAT-1 [une composante de TFIIH (Drapkin et al. 1996)], protéine à bague de zinc (ring-finger) qui stimule l'association de cdk7 avec la cycline H, abolissant alors la nécessité d'une phosphorylation sur un résidu thréonine de cdk7 pour son activation (Devault et al. 1995).

Le CTD fut identifié il y a plus de 13 ans et depuis plusieurs études ont démontré l'importance de ce domaine pour la croissance et la viabilité cellulaire, de même que pour la réponse de la machinerie transcriptionnelle aux protéines régulatrices (Allison et al. 1988; Scafe et al. 1990). Ce n'est que récemment, grâce à l'identification de l'holoenzyme pol II et des protéines qui y sont associées, que plusieurs nouvelles fonctions ont été attribuées au CTD, de même que les conséquences de son intense phosphorylation lors de la transition de l'initiation à l'élongation de la transcription. En effet, avant la découverte de l'holoenzyme, on croyait que le CTD était une structure nue alors qu'on sait aujourd'hui qu'il est orné de plus de 20 polypeptides principalement impliqués dans l'élongation de l'ARNm, la maturation (ajout de la coiffe, épissage, et polyadénylation) de l'ARN messenger précurseur (pré-ARNm), de même que dans la terminaison de la transcription.

Quoique la phosphorylation du CTD ne semble pas requise pour l'élongation dans des essais *in vitro*, certaines données supportent l'importance de la phosphorylation du CTD de la pol II pour l'élongation de l'ARNm. D'abord, des inhibiteurs de l'activité kinase de TFIIH inhibent l'élongation, tout comme des anticorps anti-TFIIH (Yankulov et al. 1996). De plus, le facteur de stimulation de l'élongation P-TEFb de la drosophile (positive transcription elongation factor b) est en fait une kinase qui phosphoryle le CTD (Marshall et al. 1995; Marshall et al. 1996). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de l'élongation suite à la phosphorylation du CTD demeurent cependant

obscur. Il semble que la phosphorylation du CTD permet le recrutement de certains facteurs impliqués dans le contrôle de l'élongation de l'ARNm tels TFIIS (SII) et SIII (elongin) (Pan et al. 1997), dont le rôle est de prévenir l'arrêt de la pol II à des sites de terminaison cryptiques dans l'ADN [revue dans (Reines et al. 1996; Archambault et al. 1992; Reines et al. 1989)].

La maturation des pré-ARNm est efficace seulement lorsque les transcrits sont produits à partir de la pol II et non à partir des ARN pol I ou III (Smale et al. 1985; Sisodia et al. 1987; Gunnery et al. 1995), ce qui suggère l'existence d'un élément unique à la pol II impliqué dans la maturation des pré-ARNm. Comme le CTD est spécifique à la pol II, il fut proposé en 1990 que ce motif soit responsable de la maturation des pré-ARNm. (Corden, 1990). La première modification du pré-ARNm est l'ajout de la coiffe (CAP) qui se produit spécifiquement lors de la phosphorylation du CTD de la pol II au moment de la pause (Rasmussen et al. 1993). Il ne fut donc pas étonnant de trouver les enzymes responsables de l'ajout de la coiffe associées au CTD seulement lorsqu'il est phosphorylé (McCracken et al. 1997; Cho et al. 1997). D'autre part, des expériences récentes ont impliqué le CTD de la pol II dans l'épissage et la polyadénylation de pré-ARNm; des peptides correspondant au CTD de même que des anticorps anti-CTD inhibent l'épissage *in vitro* (Yuryev et al. 1996), alors que sa troncation résulte en un épissage et une polyadénylation peu efficace *in vivo* (McCracken et al. 1997). L'épissage du pré-ARNm a lieu à l'intérieur d'un complexe multiprotéique appelé le spliceosome et la forme IIO (phosphorylée) de la pol II y est associée [revue dans (Corden et al. 1997)]. Les phospho-protéines SR (Ser/Arg-rich) (Wang et al. 1998; Colwill et al. 1996) de ce complexe sont essentielles à l'épissage constitutif et alternatif (Chandler et al. 1997; Caceres et al. 1994; Fu, 1995; Neugebauer et al. 1997) puisqu'elles stimulent ces processus (Graveley et al. 1998; Liu et al. 1998). L'interaction entre les protéines SR et le CTD s'effectue via une nouvelle

famille de protéines SR-like, les CASP (CTD-associated SR-like proteins), récemment identifiées (Yuryev et al. 1996). Ces CASP possèdent aussi un domaine SR, en plus d'une région d'interaction avec le CTD de la pol II. Certaines CASP possèdent en plus un domaine de liaison à l'ARN, agissant ainsi comme un pont entre le spliceosome et le CTD de la pol II. Enfin, il semble que ces CASP reconnaissent spécifiquement la forme phosphorylée du CTD (Corden et al. 1997). Le facteur à doigt de zinc ZNF74 est aussi potentiellement impliqué dans la maturation du pré-ARNm puisqu'il interagit spécifiquement avec la forme hyperphosphorylée de la pol II. De plus, il se lie spécifiquement à l'ARN et est localisé dans un sous-domaine nucléaire riche en facteurs de maturation de l'ARNm tel le facteur d'épissage SC35 (Grondin et al. 1996; Grondin et al. 1997). La polyadénylation est la dernière étape de maturation du pré-ARNm et signifie la terminaison de la transcription. Deux facteurs impliqués dans ce processus, CstF (cleavage stimulation factor) et CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor), interagissent avec TBP et avec le CTD, qu'il soit phosphorylé ou non (Dantonel et al. 1997; McCracken et al. 1997). Il semble toutefois que CPSF soit d'abord recruté dans le complexe de transcription par TFIID et ensuite transféré au CTD seulement lorsque l'élongation est initiée (Dantonel et al. 1997).

Comme la phosphorylation du CTD est importante pour l'élongation et la maturation de l'ARNm, il apparaîtrait logique que sa déphosphorylation soit requise (ou du moins impliquée) dans la terminaison de la transcription et le recyclage de la pol II. En accord avec cette hypothèse est l'existence d'une phosphatase spécifique au CTD purifiée dans les cellules de mammifères de même que chez la levure (Chambers et al. 1994; Chambers et al. 1995; Chambers et al. 1996). De plus, de récentes études ont montré qu'une composante essentielle de cette phosphatase, FCP1 (TFIIF-associated CTD phosphatase 1), interagit avec TFIIF et est présente dans l'holoenzyme pol II (Chambers et al. 1995; Pfaff et al. 1996). Ceci pourrait expliquer la non-

phosphorylation du CTD de la pol II lors de l'initiation de la transcription, alors que sa phosphorylation subséquente lors de la transition de l'initiation à l'élongation augmente l'efficacité de cette étape. Il est alors vraisemblable que dans ce complexe d'élongation, la phosphatase soit activée pour déphosphoryler le CTD seulement lorsque le signal de polyadénylation est atteint, incorporé à l'ARNm, et reconnu par le facteur de polyadénylation CPSF. Les facteurs de maturation du pré-ARNm se détachent alors du CTD non-phosphorylé de la pol II, qui redevient ainsi accessible aux protéines du complexe SRB/mediator de même qu'à TBP et TFIIE qui interagissent spécifiquement avec la forme non-phosphorylée du CTD (Usheva et al. 1992; Maxon et al. 1994). La pol II est alors disponible pour redémarrer un nouveau cycle de transcription.

### **1.3.3.2 Les facteurs de transcription**

Une quantité phénoménale de facteurs de transcription ont été identifiés au cours des années. Quoique différents en bien des points (propriétés de liaison à l'ADN, domaine d'expression, structure), ils partagent toutefois une fonction commune: la régulation de l'expression des gènes. En effet, ces facteurs, aussi appelés facteurs-*trans*, se lient à des séquences spécifiques des régions promotrices et enhancers menant à l'activation ou la répression de la transcription. Ainsi, l'expression de gènes cibles est étroitement dépendante de la quantité et/ou l'activité de ces régulateurs transcriptionnels. Par conséquent, l'expression et/ou de l'activité transcriptionnelle de ces régulateurs doit aussi être contrôlée.

#### **1.3.3.2.1 Mode d'action des régulateurs transcriptionnels**

Les régulateurs transcriptionnels sont soit activateurs, soit répresseurs, et agissent via différents mécanismes principalement au niveau de la formation du PIC et



de l'élongation de l'ARNm. Ils agissent seuls ou requièrent la présence de protéines co-régulatrices: les co-activateurs et les co-répresseurs.

#### **1.3.3.2.1.1 Les répresseurs transcriptionnels**

Tel que mentionné ci-haut, il existe plusieurs facteurs de répression de la transcription. Ils agissent selon plusieurs mécanismes, qu'il est possible de classer en deux catégories selon qu'ils soient liés ou non à l'ADN. Une fois lié à l'ADN, le répresseur peut interagir avec différentes protéines pour réprimer la transcription comme par exemple avec: (1) des composantes de la machinerie basale, (2) avec des activateurs et/ou co-activateurs (voir plus bas) transcriptionnels, (3) ou encore avec des co-répresseurs (vois plus bas). Ces derniers interagiront avec les activateurs, co-activateurs ou avec la machinerie basale pour réprimer la transcription.

La répression directe implique la liaison du répresseur à un élément de répression du promoteur. Tout comme pour les enhancers, ces éléments fonctionnent indépendamment de leur orientation et de leur position et ont été nommés silencers. Ce type de répression implique une interaction entre le répresseur et une ou plusieurs composantes de la machinerie basale. Par exemple, le récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR) en l'absence de son ligand et le facteur Krüppel de la drosophile se lient à l'ADN et interagissent directement avec TFIIB, TBP, ou TFIIE (Baniahmad et al. 1992; Fondell et al. 1993; Fondell et al. 1996; Sauer et al. 1995b). Cette interaction peut ou non impliquer des co-répresseurs (voir plus bas). D'autre part, le répresseur peut aussi compétitionner directement avec les activateurs ou la machinerie transcriptionnelle pour un site commun sur l'ADN (compétition). Il peut interférer avec un activateur afin d'empêcher son interaction avec la machinerie basale (interférence), ou inhiber (bloquer) les fonctions activatrices d'un activateur via une interaction entre les deux protéines liées à des sites contigus sur l'ADN (quenching). Le répresseur lié à



l'ADN peut aussi recruter des facteurs de modulation de la structure de la chromatine (comme par exemple les désacétylases) (Yang et al. 1996; Johnson, 1995).

Les répresseurs peuvent aussi agir sans se fixer à l'ADN. Par exemple, le facteur Dr1 inhibe la transcription en interagissant directement avec TBP l'empêchant alors de recruter TFIIB dans le complexe (rappelons que TFIIB est nécessaire au recrutement de la pol II – voir section 1.3.3.1.1) (Inostroza et al. 1992; Yeung et al. 1994; White et al. 1994). La répression peut aussi résulter de la titration d'un facteur essentiel pour la transcription via une interaction protéine-protéine, prévenant ainsi la liaison de l'activateur à l'ADN (squelching).

#### **1.3.3.2.1.2 Les activateurs transcriptionnels**

En général, les facteurs de transcription possèdent au moins deux domaines: un requis pour la liaison à l'ADN (DBD = **DNA binding domain**) et l'autre pour la transactivation (AD = **activation domain**). La fonction principale du AD est en fait d'interagir spécifiquement avec les autres composantes de la machinerie transcriptionnelle. Quatre types distincts de AD ont été identifiés et classés selon leur séquence primaire: acide, riche en proline, riche en glutamine, et riche en sérine et thréonine (Gerber et al. 1994; Blau et al. 1996). Certains transactivateurs possèdent aussi un interface de dimérisation leur permettant de former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres protéines régulatrices.

Les facteurs de transcription augmentent l'expression des gènes en stimulant la formation du PIC et/ou le processus d'élongation de l'ARNm. La plupart exerce leur fonction par des interactions directes avec une ou plusieurs composantes de la machinerie basale, comme par exemple avec TFIIB et TBP [(Roberts et al. 1993; Lin et al. 1991; Stringer et al. 1990; Tansey et al. 1994) et revue dans (Zawel et al. 1995)], mais principalement avec les TAF (facteurs associés à TFIID) (Hoey et al. 1993; Gill et

al. 1994; Goodrich et al. 1994). D'autre part, il apparaît que les activateurs de différentes classes (acidique, riche en glutamine, etc.) interagissent avec différentes sous-unités du complexe TBP-TAF. L'association des TAF à TBP constitue une étape importante de l'activation puisque les TAF, en agissant comme lien entre les activateurs et les autres composantes de la machinerie (Tjian et al. 1994; Chen et al. 1994), sont essentiels à la transcription activée mais non basale (Dymlacht et al. 1991; Tanese et al. 1991; Zhou et al. 1993). Les activateurs facilitent ainsi le recrutement des GTF dans le PIC (Chi et al. 1995), ou encore de l'ancrage de l'holoenzyme au promoteur (Barberis et al. 1995; Farrell et al. 1996; Koleske et al. 1994; Hengartner et al. 1995). Les activateurs peuvent aussi agir en maintenant les GTF sur le promoteurs après l'initiation de la transcription, facilitant ainsi la prochaine ronde d'initiation. De plus, certains activateurs dont le facteur YY1, en association avec les TAF, sont impliqués dans la reconnaissance des promoteurs qui possèdent une boîte TATA dégénérée (qui sera peu ou pas reconnue par TBP) ou encore des promoteurs qui ne possèdent pas cet élément (TATA-less) (Seto et al. 1991; Usheva et al. 1994; Burke et al. 1996).

Un autre mode d'action utilisé par certains activateurs pour stimuler la transcription n'implique pas d'interaction directe avec la machinerie transcriptionnelle. Ils jouent plutôt un rôle dans la structure tri-dimensionnelle d'un complexe enhancer. Ceci est bien illustré par le facteur LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor 1) spécifique à l'enhancer du récepteur  $\alpha$  des cellules T. L'élément reconnu par ce facteur est actif uniquement dans son contexte naturel. Ainsi, LEF-1 ne peut activer la transcription seul et doit agir avec deux autres facteurs se liant à des sites adjacents dans l'enhancer. LEF-1 contient un domaine de liaison à l'ADN de type HMG (high mobility group) qui reconnaît le sillon mineur de l'ADN et sa liaison induit une importante courbure dans la structure de l'ADN (Giese et al. 1992). Ainsi, le rôle de LEF-1 serait d'induire une telle courbure permettant le rapprochement et une interaction directe entre

les facteurs liés de part et d'autre de LEF-1 (Giese et al. 1993; Carlsson et al. 1993). LEF-1 contient donc un domaine "d'activation de la transcription" spécifique à un contexte enhancer particulier et qui agit en stimulant l'interaction entre des facteurs de transcription spécifiques.

### **1.3.3.2 Régulation de l'activité des facteurs de transcription**

Plusieurs mécanismes existent pour contrôler l'expression et l'activité des régulateurs transcriptionnels. Ces mécanismes comprennent la régulation transcriptionnelle, la génération d'isoformes, le transport au cytoplasme et la dégradation de l'ARNm. Le blocage du transport au noyau du facteur de transcription constitue aussi un mode de régulation. Enfin, l'activité de liaison à l'ADN, la dimérisation et le potentiel de transactivation peuvent être modulés par divers mécanismes impliquant des modifications post-traductionnelles (phosphorylation), la liaison d'un ligand et l'interaction avec d'autres facteurs de transcriptions ou avec des co-régulateurs (co-activateurs et co-répresseurs).

#### **1.3.3.2.1 Expression des gènes qui codent pour les facteurs de transcription**

La transcription est la principale étape de contrôle pour l'expression de tous les gènes, incluant ceux qui codent pour les facteurs de transcription. Tel que décrit dans les sections précédentes, la transcription requiert l'action combinée de plusieurs facteurs de transcription qui se lient au promoteur et à l'enhancer. Certains facteurs sont normalement peu exprimés dans la cellule mais leur expression augmente rapidement et transitoirement en réponse à divers stimuli. Des exemples de tels facteurs sont les facteurs de réponse immédiate précoce et incluent par exemple Egr-1 [NGFI (nerve growth factor-induced)-A, (Gashler et al. 1995), voir aussi chapitre V], Nur77 [(NGFI-B)

(Chavrier et al. 1990)], NGFI-C (Crosby et al. 1991), Egr-3 (Patwardhan et al. 1991), et c-Fos. Plusieurs autres facteurs de transcription agissent comme facteur d'auto-régulation puisqu'ils sont impliqués dans l'activation de la transcription de leur propre gène. Quelques exemples de tels facteurs incluent le facteur hypophysaire Pit1 (Rhodes et al. 1993) et les facteurs myogéniques MyoD et Myf5 (Thayer et al. 1989; Braun et al. 1989). En agissant de cette façon, la cellule s'assure d'avoir un niveau suffisamment élevé de ces facteurs, niveau qui est souvent crucial (threshold) pour l'induction des événements de développement et de différenciation cellulaire.

#### **1.3.3.2.2 Les isoformes de facteur de transcription**

La production d'isoformes de facteurs de transcription à partir d'un seul gène assure à un organisme une flexibilité accrue dans le contrôle de l'expression et de l'activité du facteur. Il existe principalement deux processus qui mènent à la production d'une isoforme: l'utilisation d'un promoteur alternatif [revue dans (Ayoubi et al. 1996)] et l'épissage différentiel [revue dans (Lopez, 1995)]. Une quantité importante de facteurs de transcription sont produits sous différentes isoformes. Certaines isoformes de facteurs sont exprimées selon des ratios constants tout au cours du développement, alors que pour d'autres, leurs proportions sont régulées en fonction du stade de développement ou encore selon le tissu ou le type cellulaire.

Les isoformes peuvent varier dans le premier exon (séquence non-traduite 5' = 5'-UTR) ou le dernier exon (séquence non-traduite 3' = 3'-UTR), ce qui n'affecte en rien la structure et la fonction finale de la protéine. Toutefois, la différence dans ces séquences peut mener à une modification de la stabilité de l'ARNm et de l'efficacité de la traduction comme dans le cas des isoformes du facteur de transcription à homéodomaine (HD) HoxD4 (Cianetti et al. 1990) et ceux de l'oncogène *c-myc* (Marcu et al. 1992). Les isoformes diffèrent généralement dans la séquence codante, ce qui

génère alors des protéines différentes. Tel est le cas pour de nombreux facteurs incluant Pit1 (Bodner et al. 1988; Ingraham et al. 1988; Konzak et al. 1992; Morris et al. 1992; Haugen et al. 1993; Day et al. 1994; Voss et al. 1993), le récepteur de la progestérone (PR) (Kastner et al. 1990), les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) [revue dans (Leid et al. 1992)], le modulateur des éléments de réponse à l'AMP cyclique (CREM) (Laoide et al. 1993), l'homéoprotéine Pax6 (Epstein et al. 1994), de même que certains membres de la famille Ptx, Ptx1 (décrit en détails au chapitre III), et Ptx2 (Gage et al. 1997). Ces isoformes peuvent avoir des propriétés de liaison à l'ADN différentes (CREM, Pax6) et/ou présentent des propriétés transcriptionnelles modifiées (Pit1, CREM).

#### **1.3.3.2.3 Localisation intracellulaire**

La rétention d'un facteur de transcription dans le cytoplasme peut affecter sa fonction puisque cela l'empêche d'atteindre ses cibles génomiques. Le facteur à boîte homéo Exd de la drosophile (Pbx chez les vertébrés) en est un exemple. Le facteur Exd est fréquemment retrouvé dans le cytoplasme au cours du développement chez la drosophile (Mann et al. 1996; Aspland et al. 1997). Cependant, Exd subit une translocation vers le noyau en réponse à deux molécules de signalisation, Wingless (WG) et Decapentaplegic (DPP) (Mann et al. 1996), où il peut s'associer aux facteurs Hox/HOM de façon à moduler spécifiquement l'expression des gènes au cours du développement.

#### **1.3.3.2.4 Phosphorylation**

La phosphorylation d'un facteur de transcription peut affecter sa localisation intracellulaire de même que ses propriétés de liaison à l'ADN et/ou de transactivation. Par exemple, le facteur ubiquitaire NF- $\kappa$ B est séquestré dans le cytoplasme à l'intérieur

d'un complexe inactif où il est associé avec la protéine inhibitrice I $\kappa$ B. Cette dernière agit en masquant le signal de localisation nucléaire (NLS) de NF- $\kappa$ B (Baeuerle et al. 1988). En réponse à différents stimuli tels les cytokines et les agents mitotiques, I $\kappa$ B est inactivé par phosphorylation et se détache de NF- $\kappa$ B qui peut ainsi se rendre au noyau et activer la transcription (Ghosh et al. 1990). L'activité de liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription tels le facteur bHLH-ZIP Max (Berberich et al. 1992), le facteur POU Pit1 (Kapiloff et al. 1991), le facteur de réponse au sérum SRF (Janknecht et al. 1992), et le facteur de réponse immédiate précoce Egr-1 (NGFI-A) (Huang et al. 1994; Cao et al. 1993) est aussi régulée par la phosphorylation. La phosphorylation du proto-oncogène *c-Jun* à des sites contigus au DBD inhibe sa liaison à l'ADN. Cette inhibition est renversée par une phosphatase activée par les facteurs de croissance et le TPA (Boyle et al. 1991; Lin et al. 1992). Les propriétés transcriptionnelles sont aussi sujettes à la régulation par la phosphorylation. Ainsi, la phosphorylation de résidus situés dans le domaine d'activation N-terminal de *c-Jun* par les kinases JNK et SAPK stimule son potentiel de transactivation sans affecter sa liaison à l'ADN (Binetruy et al. 1991; Pulverer et al. 1991; Hibi et al. 1993). La phosphorylation du facteur C/EBP (CCAAT enhancer-binding protein) augmente son potentiel de transactivation via une approche différente de *c-Jun*. En fait, la phosphorylation de résidus situés dans des domaines inhibiteurs qui camoufle le domaine d'activation de C/EBP, provoque la dévoilement du domaine de transactivation (Kowenz-Leutz et al. 1994).

#### 1.3.3.2.5 Liaison d'un ligand

Les récepteurs stéroïdiens (estrogène, ER; progestérone, PR; androgène, AR; glucocorticoïdes, GR; minéralocorticoïdes, MR) agissent sous forme d'homodimère. Ils sont toutefois associés à un large complexe multiprotéique composé de chaperones

(Hsp90 et autres protéines de choc thermique) [revue dans (Pratt, 1993)]. La liaison de l'hormone induit un changement de conformation dans le domaine de liaison du ligand (LBD), provoquant la dissociation du complexe multimérique et exposant la surface de dimérisation de même que le domaine de transactivation situé dans la partie C-terminale de la protéine. Ce domaine semble interagir avec la machinerie d'initiation de la transcription par l'intermédiaire de co-activateurs (voir plus bas). Contrairement aux récepteurs stéroïdiens, les récepteurs des hormones non-stéroïdiennes (acide rétinoïque tout *trans*, RAR; acide rétinoïque 9-*cis*, RXR; hormone thyroïdienne, TR; vitamine D<sub>3</sub>, VDR; peroxisome proliferator-activated, PPAR) ne sont pas associés à des protéines de choc thermique et peuvent se lier à l'ADN en présence ou en absence de leur ligand. Ils se lient généralement à l'ADN sous forme hétérodimérique avec RXR. Tout comme dans le cas des récepteurs stéroïdiens, la liaison du ligand semble induire un changement de conformation qui facilite la formation d'un complexe transcriptionnellement actif en présence de co-activateurs (voir plus bas). En absence du ligand, les hétérodimères TR/RXR et RAR/RXR se lient à l'ADN et réprime activement la transcription par un mécanisme faisant intervenir des co-répresseurs (voir plus bas) (Baniahmad et al. 1992; Chen et al. 1995; Horlein et al. 1995).

#### **1.3.3.2.6 Interaction protéines-protéines**

L'activité d'un facteur de transcription peut être grandement influencée par son interaction avec d'autres protéines, qui se lient ou non à l'ADN. Ces interactions modulent l'activité de liaison à l'ADN et/ou les propriétés de transactivation d'un ou des deux partenaires.

#### 1.3.3.2.6.1 Interactions entre facteurs se liant à l'ADN

Parmi les facteurs se liant à l'ADN, des interactions (dimérisation) entre membres d'une même famille, comme les facteurs basique hélice-boucle-hélice (bHLH), les facteurs basique leucine-zipper (bZIP), les récepteurs nucléaires, et les homéoprotéines (HD) sont fréquentes et généralement essentielles à leurs fonctions. Toutefois, certains partenaires de dimérisation préviennent la liaison à l'ADN et par conséquent séquestrent les facteurs de transcription. Ainsi, le facteur HLH Id qui possède le domaine de dimérisation (HLH) peut donc dimériser avec les autres membres de cette famille, même s'il ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN (basique) (Benezra et al. 1990; Sun et al. 1991). Par conséquent, la régulation des niveaux de protéine Id dans une cellule constitue un moyen de contrôle de l'activité des membres de la famille bHLH. Dans d'autres cas, malgré que les facteurs se lient à l'ADN séparément, leur association augmente soit l'affinité, soit la spécificité de liaison à l'ADN. Une telle association existe entre deux familles d'homéoprotéines: les facteurs Pbx et les membres du complexe Hox (Exd et membres du complexe HOM-C chez la drosophile). Plusieurs homéoprotéines du complexe HOX possèdent une spécificité de liaison à l'ADN similaire *in vitro*. L'interaction directe avec les facteurs Pbx module la spécificité de liaison à l'ADN des facteurs Hox *in vivo* (Knoepfler et al. 1995; Lu et al. 1996; Mann et al. 1996). Les propriétés de liaison à l'ADN des HD seront décrites plus en détails à la section 1.3.3.2.3.2.

Des interactions entre facteurs se liant à l'ADN, mais appartenant à des familles différentes, sont aussi fréquentes. De telles interactions se produisent entre homéoprotéines (HD) et récepteurs nucléaires (Ptx1/SF-1 – chapitre IV), HD et facteurs à doigts de zinc (ZnF) [Ptx1/Egr-1 – chapitre V, Nkx2.5/GATA-4 (Durocher et al. 1997)], HD et POU [Ptx1/Pit1 – (Szeto et al. 1996)], HD et bHLH [Ptx1/Pan1 (Poulin et al., soumis)].



### 1.3.3.2.6.2 Interactions avec les protéines accessoires

Une interaction peut se produire entre un facteur de transcription se liant à l'ADN et un facteur accessoire ne se liant pas à l'ADN et qui sert de pont protéique (bridging protein) entre le facteur de transcription et la machinerie basale, ou encore, qui agit en modifiant la spécificité de la liaison à l'ADN. Ces facteurs comprennent par exemple CBP (Kwok et al. 1994; Chrivia et al. 1993), FOG (Tsang et al. 1997) et CLIM (Bach et al. 1997; Agulnick et al. 1996; Jurata et al. 1997). Le facteur de transcription CREB active la transcription seulement lorsqu'il est phosphorylé en réponse à l'AMPc. Cette phosphorylation ne modifie pas sa localisation intracellulaire ni ses propriétés de liaison à l'ADN et de transactivation intrinsèque. La phosphorylation permet le recrutement d'un co-facteur, CBP (CREB binding protein) qui interagit uniquement avec la forme phosphorylée de CREB. CBP agit ensuite comme protéine de lien avec la machinerie transcriptionnelle puisqu'il interagit aussi avec TFIIB (Kwok et al. 1994; Chrivia et al. 1993). Similairement, les protéines CLIM (cofactor of LIM homeodomain protein), aussi appelée Lbd1 et NLI, interagissent avec le domaine LIM des protéines LIM-HD (Jurata et al. 1998; Agulnick et al. 1996). Les facteurs CLIM ne se lient pas à l'ADN mais leur présence augmente l'activation de la transcription induite par les facteurs LIM seul ou en association avec avec l'homéoprotéine Ptx1 (Bach et al. 1997). Ces données suggèrent que les protéines CLIM agissent comme protéines de lien entre deux facteurs de transcription et/ou avec la machinerie basale (Wadman et al. 1997).

Les ponts protéiques (bridging factors) les mieux connus sont les co-activateurs et les co-répresseurs. Quoiqu'initialement isolés comme co-facteurs impliqués dans l'activité des récepteurs nucléaires, ces co-régulateurs sont maintenant aussi associés à la régulation et/ou la médiation de l'activité de d'autres familles de facteurs de transcription.

La famille des co-activateurs comprend un nombre grandissant de facteurs dont SRC-1 (steroid receptor co-activator) (Onate et al. 1995), P/CAF (Blanco et al. 1998), RIP140 (receptor-interacting protein) (Cavailles et al. 1995), RIP160/ERAP160 (estrogen receptor-associated proteins) (Halachmi et al. 1994), TIF1 (transcriptional intermediary factor) (LeDouarin et al. 1995), TIF2 (Hong et al. 1996), Trip1 (TR-interacting protein) (Lee et al. 1995), TRAP (TR-associated proteins) (Fondell et al. 1996), DRIPs (VDR-interacting proteins) (Rachez et al. 1998), GRIP1 (GR-interacting protein) (Voegel et al. 1996), ARA<sub>70</sub> (AR-activator) (Yeh et al. 1996), le complexe Ada chez la levure (vom Baur et al. 1998) et bien d'autres [revue dans (Horwitz et al. 1996)]. La plupart de ces facteurs ont été isolés à l'aide du système double-hybride chez la levure en utilisant le LBD de différents récepteurs nucléaires comme appâts. Plusieurs co-activateurs sont exprimés de façon ubiquitaire et leur mode d'action est simple: ils interagissent avec le LBD de différents récepteurs nucléaires stéroïdiens (PR, ER, GR, AR) ou non (TR, RAR, RXR, VDR) lorsqu'ils sont en présence de leur ligand et liés à l'ADN stimulant ainsi leur potentiel de transactivation probablement via une interaction directe avec la machinerie basale, ce qui n'a pas été démontré pour tous les activateurs (Horwitz et al. 1996). De plus, de récentes études ont montré que le co-activateur SRC-1 interagit aussi avec SF-1 (steroidogenic factor 1), un récepteur nucléaire orphelin (pour lequel aucun ligand n'a été identifié), résultant en une augmentation de la transactivation dépendante de SF-1 (Ito et al. 1998), élargissant ainsi le champs d'action des co-activateurs. Les co-activateurs semblent avoir une certaine spécificité d'action puisqu'ils interagissent avec plusieurs, mais pas tous, les récepteurs nucléaires (Horwitz et al. 1996). Néanmoins, ceci suppose l'existence d'une certaine redondance dans leur fonction. Ceci a d'ailleurs été récemment confirmée dans des souris SRC-1<sup>-/-</sup> qui souffrent d'une résistance partielle aux hormones (Xu et al. 1998).

La protéine CBP (CREB binding protein), de même qu'une protéine apparentée p300, peuvent aussi interagir avec certains récepteurs nucléaires (Chakravarti et al. 1996) en plus d'être la cible d'un signal de transduction (impliquant l'AMPc) émanant d'un récepteur membranaire. Ainsi, CBP est plutôt défini comme un co-intégrateur. De plus, CBP et SRC-1 interagissent physiquement résultant en une potentiation synergique de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires (Smith et al. 1996; Kamei et al. 1996; Ito et al. 1998).

Tel que mentionné précédemment, les hétérodimères TR/RXR et RAR/RXR se lient à l'ADN en absence de leur ligand réprimant ainsi activement la transcription. Cette répression est en fait le résultat d'une interaction avec les co-réresseurs N-CoR (nuclear receptor **co**-repressor) (Horlein et al. 1995) et SMRT (silencing mediator for RAR and TR) (Chen et al. 1995). Ils interagissent avec les récepteurs TR et RAR, mais non RXR, dans les hétérodimères TR/RXR et RAR/RXR en absence du ligand. La liaison du ligand au récepteur induit la dissociation du complexe récepteur/co-répresseur et le recrutement d'un co-activateur (Kurokawa et al. 1995). Cet effet du ligand est toutefois dépendant de la polarité du site de liaison. En effet, un complexe RAR/RXR/co-répresseur lié à un élément DR-5 (répétition directe du demi-site de liaison AGGTCA séparée par 5 nucléotides) sera dissocié par le ligand, alors que ce dernier sera inefficace pour dissocier ce complexe s'il est lié à un élément DR-1, et ce malgré le recrutement du co-activateur (Kurokawa et al. 1995). Il apparaît donc que l'activité du co-répresseur soit dominante sur celle du co-activateur. D'autres co-répresseurs, nommés TRAC, ont aussi été identifiés [(Sande et al. 1996), revue dans (Perlmann et al. 1995)]. La protéine NAB1 (NGFI-A-binding protein) a d'abord été isolée par sa propriété à interagir avec le domaine R1 (identifié comme répresseur) du facteur de transcription NGFI-A (Egr-1) (Russo et al. 1995). NAB1 possède un domaine répresseur fonctionnel et peut réprimer directement la transcription lorsqu'artificiellement

ancré à l'ADN (fusion avec le DBD d'un autre facteur) (Swirnoff et al. 1998). NAB1 n'est toutefois pas spécifique à NGFI-A puisqu'il peut interagir avec tous les facteurs de transcription qui possèdent un domaine R1. De tels domaines de répression transférables ont été identifiés dans pratiquement tous les co-répresseurs. On ignore toutefois si les co-répresseurs contactent directement une ou des composantes de la machinerie basale pour médier leur effets répresseurs. Cependant, les co-répresseurs N-CoR et SMRT agissent en recrutant un complexe protéique qui comprend mSin3A et mRPD3 (HD1), des désacétylases d'histones (Alland et al. 1997; Heinzel et al. 1997; Nagy et al. 1997). L'activité des co-activateurs, du co-intégrateur et des co-répresseurs n'est toutefois pas limitée aux récepteurs nucléaires puisque certains interagissent aussi avec des facteurs de transcription de d'autres familles. Certains exemples ont déjà été présentés dans les paragraphes précédents (CLIM, FOG, NAB) mais plusieurs autres ont aussi été documentés. En effet, CBP interagit aussi avec CREB, l'antigène grand T de SV40, l'oncoprotéine adénovirale E1A (Arany et al. 1995), les proto-oncogènes *c-Jun* (Arias et al. 1994), *c-Myb* (Dai et al. 1996), et *c-Fos* (Bannister et al. 1995), avec JunB (Lee et al. 1996), et avec le facteur suppresseur de tumeur p53 (Gu et al. 1997; Lill et al. 1997). Similairement, SRC-1 augmente l'activation transcriptionnelle dépendante du facteur à doigts de zinc Sp1 et de la protéine chimérique Gal4-VP16. La répression de la transcription basale par le facteur Dr1 (voir section 1.3.3.2.1.1) s'effectue à l'aide d'un co-répresseur (Mermelstein et al. 1996).

#### **1.3.3.2.3 Familles de facteurs de transcription**

Les nombreux facteurs de transcription peuvent être classés en famille selon leur motif de liaison à l'ADN. Entre autres, ces familles comprennent les protéines à doigts de zinc (ZnF), les basique leucine-zipper (bZIP), les facteurs basique hélice-boucle-

hélice (bHLH), les protéines à homéodomaine (HD) et les récepteurs nucléaires (NR). D'autre part, certains facteurs de transcription combinent plusieurs domaines de liaison à l'ADN comme tels les facteurs LIM qui contiennent soit seulement un domaine lim (deux ZnF) et appelé LMO, soit un domaine lim associé à un homéodomaine appelé LHX. D'autres, comme les facteurs POU, contiennent un domaine POU et un HD, alors que les facteurs *paired* possèdent un domaine paired (PD) et un HD.

#### 1.3.3.2.3.1 Familles de facteurs de transcription: un survol

Plusieurs familles de facteurs de transcription existent comme par exemple les facteurs bZIP, bHLH, ZnF, Ets et MADS pour n'en nommer que quelques unes (Tan et al. 1998). Comme tous facteurs de transcription, ils ont des rôles importants à jouer dans différents processus cellulaires. Une description exhaustive des différentes familles de facteurs de transcription est regroupée dans un ouvrage publié par Latchman (Latchman, 1994). Néanmoins, une description de deux familles, les HD et les NR, pertinentes à mon travail est présentée dans les sections suivantes.

#### 1.3.3.2.3.2 Les homéoprotéines

##### **Historique**

La boîte homéo, caractéristique de cette famille de protéines, a été identifiée en 1984 dans le gène *Ultrabithorax (Ubx)* de la drosophile. Lors d'expériences d'hybridation de l'ADN, cette séquence reconnaît aussi les gènes *Antennapedia (Antp)* et *Fushi tarazu (Ftz)* (cross-hybridization) (McGinnis et al. 1984; Scott et al. 1984). Cette boîte de 180 pb code pour un polypeptide de 60 acides aminés appelé homéodomaine. En utilisant ce motif comme sonde, plusieurs autres gènes possédant une boîte homéo ont pu être isolés. Dans la même année, McGinnis et al. ont montré que les gènes possédant une boîte homéo ne sont pas restreints à la mouche mais sont

aussi présents chez les vertébrés incluant le poulet, les rongeurs et les humains (McGinnis et al. 1984; McGinnis et al. 1984), suggérant l'importance de la fonction de ces gènes. Aujourd'hui, plusieurs centaines de gènes à boîte homéo ont été identifiés; certains sont regroupés dans le génome mais la grande majorité y sont dispersés (Bürglin, 1993). Ces derniers possèdent fréquemment une région conservée autre que le HD permettant de les classer. Ainsi, l'ensemble des gènes à boîte homéo sont classés en superclasse (regroupés et dispersés), en classe (engrailed, paired, paired-like, POU, LIM, cut, ZF, NK-2 et PBC), et en famille (la famille Ptx) et ce selon la séquence primaire de leur homéodomaine et, s'il y a lieu, selon la présence d'autres motifs conservés (Bürglin, 1993).

### ***Structure et propriétés de l'homéodomaine***

L'homéodomaine reconnaît spécifiquement l'ADN, tel que montré pour la première fois par de nombreux groupes entre 1985 et 1988 en utilisant une approche *in vitro* (Desplan et al. 1985; Desplan et al. 1988; Hoey et al. 1988). Des études plus récentes de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de cristallographie et rayons X ont révélé que l'homéodomaine forme trois hélices  $\alpha$  bien définies et une quatrième plus flexible généralement contigüe à l'hélice 3 (Qian et al. 1989; Otting et al. 1990; Tsao et al. 1995; Kissinger et al. 1990; Li et al. 1995; Tan et al. 1998). Ces hélices forment une structure hélice 1-boucle-hélice 2 (HLH) et hélice 2-tour-hélice 3/4 (HTH), le tout se repliant dans une structure globulaire. La structure HTH entre les hélices 2 et 3 est aussi présente dans plusieurs protéines régulatrices chez les procaryotes (Pabo et al. 1992). Toutefois, le motif HTH chez les eucaryotes est plus long en C-terminal (hélice 4) que celui des procaryotes afin de mieux contacter l'ADN. De plus, les protéines HTH procaryotiques se lient à l'ADN sous forme dimérique alors que les homéoprotéines des eucaryotes se lient à l'ADN généralement en monomère (Affolter et al. 1990). L'hélice 3

est responsable en grande partie de la liaison à l'ADN et elle s'insère dans le sillon majeur de la double hélice (Qian et al. 1989; Otting et al. 1990). Pour cette raison, elle est aussi appelée hélice de reconnaissance. Le bras N-terminal qui précède l'hélice 1 contacte aussi des bases dans le sillon mineur de l'ADN et participe ainsi à la spécificité de reconnaissance (Otting et al. 1990; Wolberger et al. 1991; Gehring et al. 1994). Les séquences de 6 nucléotides reconnues par plusieurs homéoprotéines sont souvent similaires et contiennent généralement les nucléotides 5'-TAAT-3' au centre de l'élément de reconnaissance. Ainsi, ces quatre nucléotides sont reconnus par des résidus extrêmement bien conservés parmi toutes les homéoprotéines comme le N<sub>51</sub> (asparagine) qui reconnaît le nucléotide A en position 3, alors que la V/I<sub>47</sub> contacte le T en position 4 (Wilson et al. 1996). Les deux nucléotides en 3' du TAAT diffèrent fréquemment (Hoey et al. 1988; Desplan et al. 1988). Il s'avère en fait que cette différence des nucléotides en 3' du TAAT constitue un élément fondamental de la spécificité de liaison des différentes familles d'homéoprotéines. Le seul acide aminé ayant un rôle général dans la spécificité de liaison à l'ADN est le résidu 50 de l'homéodomaine (9<sup>ème</sup> résidu de l'hélice 3) qui varie entre les familles d'homéoprotéines (Hanes et al. 1989; Treisman et al. 1989). Par des approches génétiques, il a été démontré que la nature de ce résidu (Gln dans Hox, Lys dans Bcd, Ser dans Prd, His dans Cut, Cys dans POU, etc) est responsable de la reconnaissance du dinucléotide immédiatement en 3' du TAAT (Treisman et al. 1989; Percival-Smith et al. 1990; Hanes et al. 1991; Ades et al. 1994; Damante et al. 1996; Hanes et al. 1994; Phelan et al. 1994). Par exemple, les facteurs Hox reconnaissent un dinucléotide GG alors que les facteurs apparentés à bicoïde (dont la famille Ptx) se lient au CC en position 5 et 6.

### ***Fonction des homéoprotéines***

Pour certains de ces gènes, des fonctions ont été proposées avant même qu'ils ne soient isolés. En effet, des mutations chez la drosophile produisaient des mouches avec deux paires d'ailes ou encore avec une paire de pattes à la place des antennes (Gehring, 1993). Ces mutations suggéraient l'existence de gènes impliqués dans le contrôle génétique du plan du corps (body plan). Après l'identification de ces gènes à boîte homéo, certains ont été appelés gènes homéotiques car leur mutation ou leur expression ectopique cause une transformation des segments thoraciques, aussi bien chez la mouche que chez l'humain (Bürglin, 1993; Balling et al. 1989; Sauvageau et al. 1995). Cependant, cette boîte homéo n'est pas présente uniquement dans les gènes homéotiques; elle se retrouve aussi dans des gènes de spécification des gradients moléculaires (comme *bicoïde* et *caudal*) et des patrons de segmentation (*engrailed* et *ftz*), de même que dans des facteurs de transcription spécifiques à un tissu (comme Pit1 et Pdx1).

Des expériences de transfection de cellules en culture ont mis en évidence les propriétés transcriptionnelles des homéoprotéines. En fait, ces facteurs peuvent agir comme activateurs ou répresseurs transcriptionnels (Jaynes et al. 1988; Biggin et al. 1989; Han et al. 1989) et certains contactent directement des composantes de la machinerie basale de transcription (Zhu et al. 1996; Um et al. 1995; Johnson et al. 1992; Austin et al. 1995; Zhang et al. 1996). Les premières indications de telles propriétés transcriptionnelles *in vivo* ont été obtenues chez la drosophile en montrant que le facteur bicoïde se lie spécifiquement et active le promoteur du gène *Hunchback* (Driever et al. 1989a; Driever et al. 1989b) et que le facteur Fushi tarazu auto-régule sa propre expression (Schier et al. 1992). Aujourd'hui, on connaît mieux l'importance des homéoprotéines dans de nombreux processus tels la spécification de l'axe antéro-



postérieur, le développement des organes, la prolifération et la différenciation cellulaire et dans l'expression de nombreux gènes.

#### **1.3.3.2.3.2.1 Les gènes à boîte homéo regroupés dans le génome**

La notion de gènes regroupés (cluster) a d'abord été identifiée chez la drosophile (Lewis, 1978). Chez la mouche à fruit, deux groupes de gènes homéotiques, ANT-C et BX-C séparés par trois gènes non-homéotiques, forment le complexe HOM-C. Chez les vertébrés, les 39 gènes homéotiques sont regroupés dans quatre complexes, HoxA, B, C et D, d'environ 120 kpb chacun (Bürglin, 1993; Zeltser et al. 1996). Il semble que les 4 complexes Hox sont le résultat de duplications à partir d'un seul complexe. Chacun des complexes contient environ 10 gènes qui peuvent être alignés en 13 groupes appelés paralogues (Scott, 1992; Bürglin, 1993). Les gènes d'un groupe paralogue semble être fonctionnellement équivalents dans quelques cas, puisque l'inactivation (knock-out) de plusieurs gènes d'un même paralogue amplifie le phénotype observé suite à l'inactivation d'un seul des gènes (Sharkey et al. 1997; Horan et al. 1995; Horan et al. 1995). Les gènes d'un complexe Hox sont beaucoup plus rapprochés que ceux de la drosophile; par exemple, la longueur de l'ensemble du complexe HoxA est similaire au seul gène *Antennapedia* de la drosophile (100 kbp) (Duboule et al. 1989). De plus, ils ne sont pas séparés par d'autres gènes non-Hox. La courte distance intergénique de même que des patrons d'expression se chevauchant pour des gènes adjacents (voir plus bas) ont permis d'identifier certains éléments de régulation communs pour l'expression des certains gènes Hox (Simeone et al. 1988; Krumlauf, 1994; van der Hoeven et al. 1996; Gould et al. 1997).

Tous les gènes d'un complexe sont orientés et transcrits dans la même direction. De plus, leur position sur le chromosome correspond à l'endroit où ils sont exprimés: les

gènes en 3' du complexe sont exprimés dans la partie antérieure de l'embryon alors que les gènes en 5' sont exprimés dans la partie postérieure (Duboule et al. 1989; Gaunt, 1988; Graham et al. 1989; Kondo et al. 1998). C'est le phénomène de colinéarité spatiale. Seulement quelques gènes sont exprimés dans la région antérieure et plus on se déplace vers la région postérieure, de plus en plus de gènes Hox sont exprimés. Ainsi, l'expression d'un gène homéotique n'est jamais activée avant que celui qui le précède sur l'axe antéro-postérieur ne soit exprimé. Il s'agit de la colinéarité temporelle (Wright, 1991; Krumlauf, 1994). Ces deux phénomènes de colinéarités se produisent simultanément (Duboule, 1994). L'acide rétinoïque est un inducteur de l'expression des gènes Hox (Langston et al. 1992; Conlon et al. 1992; Morriss-Kay et al. 1991; Simeone et al. 1990; Boncinelli et al. 1991; Studer et al. 1994; Langston et al. 1994; Folberg et al. 1997) et il existe une sensibilité colinéaire dans le temps et le niveau de réponse des gènes Hox à l'acide rétinoïque (Simeone et al. 1990; Boncinelli et al. 1991; Lohnes et al. 1993). Les gènes en 3', qui sont activés en premier lieu et exprimés antérieurement, sont les plus sensibles à l'acide rétinoïque. Plus on se déplace vers l'extrémité postérieure de l'axe antéro-postérieur, moins les gènes sont sensibles à cette hormone. Un autre mécanisme impliqué dans la régulation de l'expression des gènes dans le complexe Hox/HOM est la modulation de la structure de la chromatine à cet endroit. Plusieurs facteurs sont impliqués dans ce processus et sont regroupés en famille selon leur structure et leur activité. Par exemple, deux familles agissent positivement sur l'expression des gènes du complexe: d'une part, les membres de la famille *brahma* de la drosophile (*BRG1* et *SNF2/SWI2* chez les eukaryotes) maintiennent la chromatine ouverte grâce à leur activité ATPase (Tamkun et al. 1992) et, d'autre part, les facteurs de la famille *Trithorax* (*HRX* chez l'humain) qui se lient à l'ADN de la chromatine active via leur motif en crochet-AT (AT-hook) afin de contrebalancer l'effet répresseur des membres de la famille *polycomb* (Pc-G) (Kennison,

1995; Schumacher et al. 1997). Ces derniers, qui incluent entre autres BMI-1, Mel-18 et M31 à M33, se lient à l'ADN via leur chromodomaine et induisent la formation d'hétérochromatine (chromatine inactive). Tout comme la mutation des gènes Hox, la mutation de ces gènes *Pc-G* induit aussi des transformations homéotiques. Tous ces phénomènes servent donc à réguler minutieusement l'expression des gènes Hox et, par conséquent, le développement embryonnaire. Ainsi, les différents segments de l'embryon contiennent différentes combinaisons de facteurs Hox, sorte de code, responsable de la spécification de l'identité des différentes régions du corps (Hunt et al. 1992) par la régulation de la transcription des gènes cibles [revue dans (Graba et al. 1997)]. Un modèle de prévalence postérieure a été proposé suite à plusieurs analyses d'inactivation de gènes autant chez la drosophile [modèle de suppression phénotypique, (Gonzalez-reyes et al. 1990)] que chez les vertébrés, afin d'expliquer le mode d'action des facteurs Hox à l'intérieur d'un même segment. Ce modèle suggère que l'identité d'un segment est principalement spécifiée par les facteurs Hox qui ont des limites d'expression postérieure, comparativement à ceux qui ont des limites d'expression plus antérieure à l'intérieur d'un même segment (Duboule, 1991). Pour toutes ces raisons, une modification spatiale ou temporelle de l'expression d'un gène homéotique entraîne toujours des altérations morphologiques au cours du développement.

Ainsi, les propriétés de colinéarité, la présence de plusieurs facteurs, de promoteurs communs, de région régulatrice intergénique, de même que la conservation au cours de l'évolution de l'organisation des complexes Hox suggèrent une interdépendance organisationnelle essentielle à une régulation appropriée de l'expression des membres d'un complexe Hox (Krumlauf, 1994; Bürglin, 1993; van der Hoeven et al. 1996). Cette interdépendance a été confirmée par des expériences de transposition de gènes Hox.

Les gènes Hox sont impliqués dans le développement de plusieurs régions du corps, principalement du tronc et des parties postérieures. En effet, les gènes Hox sont exprimés à partir de la région la plus postérieure de l'organisme jusqu'au cerveau postérieur (hindbrain) (Hunt et al. 1991). Ils ne sont toutefois pas exprimés dans les structures antérieures de la tête, c'est-à-dire dans le mésencéphale et le télencéphale. Ce phénomène est aussi observé chez la drosophile où trois gènes à boîte homéo, *Empty spiracles* [*ems*, (Dalton et al. 1989; Walldorf et al. 1992)], *Orthodenticle* [*otd*, (Finkelstein et al. 1990)], et *Distalless* [*dll*, (Cohen et al. 1990)] exprimés spécifiquement dans les régions antérieures de la tête mais aussi impliqués dans le développement de cette structure ont été identifiés. Leurs homologues, *Emx1*, *Emx2*, *Otx1*, *Otx2*, *Dlx1* et *Dlx2* ont par la suite été rapidement identifiés chez les vertébrés (Simeone et al. 1992b; Simeone et al. 1993; Simeone et al. 1992a; Ang et al. 1996; Acampora et al. 1995; Matsuo et al. 1995; Finkelstein et al. 1994; Price et al. 1991; Acampora et al. 1997; Porteus et al. 1991). Ces six gènes, de même que d'autres exprimés dans les structures antérieures [*Nkx-2.1/TTF-1*, *Nkx-2.2*, *Lim1/Lhx1* and *Ptx1* (Lazzaro et al. 1991; Kimura et al. 1996; Price et al. 1992; Shawlot et al. 1995; Lanctôt et al. 1997)], ne sont pas regroupés dans les complexes Hox mais plutôt dispersés dans le génome. Leurs patrons d'expression au cours du développement des structures antérieures coïncident toutefois avec des "points de repère anatomiques", appelés neuromères, décrits par certains neurobiologistes (Puelles et al. 1993; Rubenstein et al. 1994). Il est alors possible que le développement des structures antérieures soit aussi contrôlé par une combinaison spécifique de certains facteurs à boîte homéo à l'intérieur des neuromères, de la même façon qu'agissent les gènes Hox pour le développement segmenté du reste du corps.

### ***Relations fonctionnelles entre les homéoprotéines Hox, Pbx et Meis1***

Plusieurs homéoprotéines Hox reconnaissent des séquences d'ADN similaires *in vitro*, ce qui contraste avec leurs fonctions spécifiques *in vivo* (Ekker et al. 1994; Gehring et al. 1994; Bürglin, 1993). *In vivo*, des interactions avec certaines homéoprotéines atypiques de la classe PBC [revue dans (Mann et al. 1996)] assurent et modulent l'affinité et la spécificité pour l'ADN des homéoprotéines Hox. La famille PBC comprend chez les vertébrés les facteurs Pbx1, 2 et 3 (Kamps et al. 1990; Nourse et al. 1990; Monica et al. 1991), Exd chez la drosophile (Flegel et al. 1993; Rauskolb et al. 1993), et ceh-20 chez *C. elegans* (Bürglin et al. 1992). Ils sont dits atypiques car ils possèdent 3 acides aminés supplémentaires dans la boucle entre les hélices 1 et 2 (Bürglin, 1993). De plus, ils partagent deux répétitions d'un motif, de fonction inconnue, appelé la boîte PBC localisés immédiatement en amont de l'homéodomaine (Bürglin, 1993). La fonction des membres de cette classe d'homéoprotéines est maintenant bien caractérisée. Ils se lient à l'ADN de façon coopérative (Mann et al. 1996) ou non (Pinsonneault et al. 1997) avec les facteurs Hox [revue dans (Mann et al. 1996)] et avec des homéoprotéines non-Hox telles Engrailed (Peltenburg et al. 1996) et Pdx1 (Peers et al. 1995) modulant ainsi leur propriété de liaison à l'ADN *in vivo* et *in vitro* (Neuteboom et al. 1997). Les propriétés de liaison à l'ADN du dimère Pbx/Hox ne sont pas simplement un hybride des propriétés biochimiques de chacune des protéines. Les facteurs Pbx/Hox interagissent en absence d'ADN *in vitro*, induisant un changement de conformation qui pourrait être à l'origine de la modification de la spécificité de reconnaissance des séquences cibles sur l'ADN et de l'annulation de l'activité répressive de certaines protéines Hox (Sanchez et al. 1997; Chan et al. 1996). Un autre changement de conformation se produit lorsque le dimère se lie à l'ADN (Sanchez et al. 1997). La liaison à l'ADN du complexe Pbx/Hox requiert un site de liaison de Pbx contigu à celui du facteur Hox [revue dans (Mann et al. 1996)].

Les domaines des différentes protéines requis pour la liaison coopérative à l'ADN et pour l'interaction physique ont été localisés. Dans le cas des facteurs Hox, il s'agit d'un hexapeptide situé immédiatement en amont du bras N-terminal (Shanmugam et al. 1997; Chang et al. 1995; Knoepfler et al. 1995; Neuteboom et al. 1995; Phelan et al. 1995; Phelan et al. 1997). Dans l'homéoprotéine non-Hox Engrailed, un domaine similaire appelé EH2 est requis pour l'interaction avec Pbx/Exd (Peltenburg et al. 1996). De plus, l'homéodomaine des facteurs Hox et Engrailed est aussi important pour la liaison coopérative à l'ADN avec les facteurs Pbx (Neuteboom et al. 1995; Peltenburg et al. 1996). Les domaines de Pbx requis pour l'interaction avec les facteurs Hox ou Engrailed ont aussi été identifiés. Il s'agit de résidus localisés dans l'homéodomaine et dans la région C-terminale adjacente à l'homéodomaine (Chang et al. 1995; Lu et al. 1996). Une étude récente a mis en évidence les différents résidus de l'homéodomaine de Pbx responsables de l'interaction avec Hox ou Engrailed (Peltenburg et al. 1997).

Tel que mentionné à la section 1.3.3.2.2.3, Exd est souvent localisé dans le cytoplasme au cours du développement (Mann et al. 1996; Aspland et al. 1997) et il est transloqué vers le noyau en réponse à deux molécules de signalisation, Wg et Dpp (Mann et al. 1996). Il semble toutefois que cette translocation fasse intervenir une autre homéoprotéine atypique, appelée homothorax (HTH), dont la mutation produit des transformations homéotiques chez la drosophile similaires à celles observées lors de la mutation de Exd (Rieckhof et al. 1997; Pai et al. 1998). En absence de HTH, Exd est non-fonctionnelle et demeure dans le cytoplasme (Rieckhof et al. 1997). Il s'avère que HTH est en fait l'homologue du facteur Meis1/Prep1 chez les vertébrés. Meis1/Prep1 s'associe *in vivo* avec Pbx (Kurant et al. 1998), suggérant que Meis1 module l'activité de Pbx, et par conséquent des facteurs Hox (Chang et al. 1997; Berthelsen et al. 1998a; Berthelsen et al. 1998b; Kroon et al. 1998). Ainsi, toutes ces données ont mis

en évidence un nouveau mécanisme multi-factoriel impliqué dans le contrôle de l'activité *in vivo* des facteurs homéotiques Hox.

#### 1.3.3.2.3.2.2 Les gènes à boîte homéo dispersés dans le génome

Ces gènes sont certes plus nombreux que les gènes Hox et sont séparés en classes et familles grâce à certains motifs conservés. Ainsi, la classe à motif POU a été définie sur la base de 4 facteurs: Pit1, Oct-1 et Oct-2 et unc-86, qui possèdent tous un motif commun d'environ 75 acides aminés, appelé le domaine POU, situé en amont de l'homéodomaine (Bodner et al. 1988; Mangalam et al. 1989; Herr et al. 1988; Finney et al. 1988). Environ 40 facteurs POU ont été identifiés à ce jour et classés en 6 familles [revue dans (Ryan et al. 1997)]. La fonction *in vivo* de plusieurs facteurs POU a été étudiée par des approches d'inactivation génique (knock-out) ou de gain de fonction (expression ectopique). Ces études ont révélé que les facteurs POU sont d'importants régulateurs de plusieurs processus développementaux tels l'embryogenèse, l'oogenèse, le développement du système nerveux et la différenciation cellulaire. Le domaine POU peut se lier seul à l'ADN mais avec une faible affinité. Une liaison spécifique et de haute affinité requiert le domaine POU et l'homéodomaine (Sturm et al. 1988; Ingraham et al. 1990). En fait, ces deux sous-domaines se lient à l'ADN de façon coopérative (Klemm et al. 1996).

Une autre classe, les gènes *Msx*, comprend le gène *Msh* de la drosophile et deux homologues, *Msx1* et *Msx2*, chez les vertébrés. Les facteurs codés par ces gènes ont un homéodomaine conservé entre eux mais il est relativement divergent de celui des autres homéoprotéines (Mann et al. 1996). Les homéoprotéines *Msx* sont principalement exprimés dans des zones de prolifération cellulaire active, comme par exemple dans la zone de progression du mésoderme des bourgeons des membres (limb

buds) et des arches maxillaires, mais aussi au cours du développement cardiaque [revue dans (Davidson, 1995)]. La délétion ou encore des mutations de *Msx1* ou *Msx2* provoquent, entre autres, des malformations craniofaciales (Satokata et al. 1994; Jabs et al. 1993), supportant une fois de plus l'importance des gènes à boîte homéo au cours du développement.

La classe *Engrailed* est principalement caractérisée par une série de courts domaines conservés, nommés EH1, EH2, EH3, EH4 qui est l'homéodomaine et EH5 (Bürglin, 1993). Il semble que ces homéoprotéines agissent principalement comme répresseurs transcriptionnels (Jaynes et al. 1991). La région responsable de cette répression a été identifiée et elle est aussi conservée dans les homéoprotéines des classes *engrailed*, *NK-1*, *NK-2* et *Msx* (Smith et al. 1996).

Une autre classe est caractérisée par des protéines contenant un motif de 80 acides aminés appelé le domaine *Cut*. Il semble que ce domaine soit impliqué dans la reconnaissance de l'ADN, tout comme le domaine *POU* (Neufeld et al. 1992). Le facteur *Cut* de la drosophile possède trois copies de ce motif situées en amont de l'homéodomaine (Blochlinger et al. 1988). A ce jour, seulement deux autres membres de cette classe ont été identifiés chez les vertébrés, *CDP* (Neufeld et al. 1992) et *Clox* (Andres et al. 1992).

La classe *Nkx-2* est caractérisée par une tyrosine à la position 54 de l'homéodomaine alors que cette position est généralement occupée par une méthionine. Ce changement pourrait être responsable de la divergence des sites de reconnaissance à l'ADN par les membres de cette classe. De plus, toutes les homéoprotéines *Nkx-2* possèdent une région de 17 acides aminés située en aval de l'homéodomaine, appelée motif *CP* (conserved peptide) (Price et al. 1992). Chez les vertébrés, cette classe comprend les facteurs *Nkx-2.1* à *Nkx-2.6* (Guazzi et al. 1990; Price et al. 1992; Lints et al. 1993; Evans et al. 1995). Le rôle du *CP* n'est pas bien défini mais il pourrait être



impliqué dans des interactions protéines-protéines, ou agirait comme domaine répresseur de la transcription puisque sa délétion augmente le potentiel de transactivation des facteurs Nkx-2 (Defelice et al. 1995). La plupart des membres de cette classe sont impliqués dans l'expression des gènes et le développement de différents organes tels les poumons, la thyroïde et l'hypophyse dans le cas de Nkx-2.1 (Kimura et al. 1996; Bohinski et al. 1994), alors que Nkx-2.5 est requis lors de la morphogénèse et de l'expression de gènes cardiaques (Lyons et al. 1995; Durocher et al. 1996; Durocher et al. 1997).

Des homéoprotéines à doigts de zinc (ZnF) ont été identifiés. Un mélange plutôt surprenant puisque certains facteurs appartenant à cette classe possèdent 9 ZnF et 1 HD (zfh-1), 16 ZnF et 3 HD (zfh-2) (Lai et al. 1991), et même 17 ZnF et 4 HD (ATBF1) (Morinaga et al. 1991; Ido et al. 1994). Ces gènes sont activés lors de la différenciation neuronale et agissent comme activateurs transcriptionnels (Morinaga et al. 1991; Lundell et al. 1992). L'utilité de plusieurs homéodomains et doigts de zinc dans une même protéine demeurent toutefois obscure. On peut cependant penser que les doigts de zinc sont impliqués dans la liaison à l'ADN ou encore, dans des interactions protéines-protéines. Similairement, les homéodomains, dont la séquence primaire diffère parfois, pourraient ainsi reconnaître des séquences cibles différentes.

La classe *paired* de gène à boîte homéo est d'abord caractérisée par la présence d'une sérine en position 50 de l'homéodomaine. De plus, toutes les homéoprotéines de cette classe possèdent un motif de 128 acides aminés, le domaine paired (PD) (Bopp et al. 1986). Certaines homéoprotéines paired ne contiennent d'ailleurs que ce domaine (Bopp et al. 1989; Chalepakis et al. 1991). Des données structurales ont montré que le PD se replie en deux sous-domaines: PAI en N-terminal, et RED en C-terminal (Xu et al. 1995). Chacun des sous-domaines forme un motif hélice-tour-hélice (HTH) et reconnaît des séquences d'ADN différentes (Jun et al. 1996; Treisman et al. 1991;

Czerny et al. 1993; Epstein et al. 1993; Epstein et al. 1991). De plus, le PD et le HD agissent coopérativement pour se lier à l'ADN et les deux sont requis pour la fonction *in vivo* du gène *paired* de la drosophile (Jun et al. 1996; Bertuccioli et al. 1996; Miskiewicz et al. 1996). Les protéines *paired* se lient à une séquence palindromique (deux demi-sites) d'ADN sous forme homo- ou hétérodimérique et toute l'information nécessaire à la dimérisation est contenue dans le HD (Wilson et al. 1993). Les facteurs *paired* sont séparés dans 6 familles: les mieux caractérisés étant les gènes Pax1 à Pax9 (Stuart et al. 1995; Gruss et al. 1992). Comme d'autres homéoprotéines, ces facteurs sont essentiels au développement de différents organes tel que mis en évidence par des mutations ou réarrangements dans leurs gènes, autant chez la souris que chez l'humain. Une mutation du gène *Pax3* est responsable du syndrome de Waardenburg chez l'humain et *spotch* chez la souris (Tassabehji et al. 1992; Baldwin et al. 1992; Epstein et al. 1991; Goulding et al. 1993). Similairement, la mutation du gène *Pax6* affecte le développement de l'oeil et est responsable du syndrome *Small eye* chez la souris (Hill et al. 1991), *Aniridia* chez l'humain (Glaser et al. 1992; Hanson et al. 1994; Jordan et al. 1992), et *Eyeless* chez la drosophile (Quiring et al. 1994). En fait, chez la drosophile, le gène *eyeless* (*Pax6*) s'avère être le gène responsable de la spécification de la morphogenèse de l'oeil (master control gene) et agit comme activateur transcriptionnel du gène codant pour la rhodopsine 1, une composante des photorécepteurs (Halder et al. 1995; Sheng et al. 1997). Enfin, Macchia et al. ont récemment identifié des mutations dans le gène *Pax8* chez des patients atteints d'hypothyroïdisme congénital permanent (Macchia et al. 1998). Ces données démontrent ainsi un rôle pour le facteur Pax8 dans la fonction thyroïdienne, ce qui est en accord avec la récente publication de l'inactivation de ce gène chez la souris (Mansouri et al. 1998). Finalement, certaines protéines Pax ont un potentiel oncogénique et

peuvent transformer des cellules en cultures (Chalepakis et al. 1991; Maulbecker et al. 1993).

Il existe plusieurs gènes avec un homéodomaine similaire à celui de la classe paired (55-75% d'identité). Toutefois, ces gènes ne codent pas pour le PD et ne possèdent pas la sérine en position 50. Ils ont plutôt une glutamine (Mhox/Phox1) ou une lysine (Otx1, Otx2, Gsc, Crx, Six1 à Six3, Ptx1 à Ptx3). Par conséquent, ils forment la classe paired-like des facteurs à boîte homéo. Les homéoprotéines possédant une lysine en position 50 forment une sous-classe, dite du "type bicoïde" (Bürglin, 1993). *Bicoïde* (Bcd) est un facteur de la drosophile essentiel au développement des structures antérieures (Berleth et al. 1988; Driever et al. 1988; Frohnhofer et al. 1986). *Bicoïde* est exprimé en gradient dans l'axe antéro-postérieur dès les premiers stades du développement de la drosophile. Sa concentration dans les différents segments constitue ainsi un signal pour l'activation de gènes contenant des éléments de liaison d'affinité variable pour Bcd qui constitue par conséquent un morphogène (Brand-Saberi et al. 1995; Driever et al. 1989a; Driever et al. 1989b; Struhl et al. 1989; Sauer et al. 1995a; Ma et al. 1996; Simpson-Brose et al. 1994). En plus d'activer la transcription, Bcd peut se lier à une séquence dans la région 3' non-traduite d'ARNm, le BRE (bicoid-response element), et ainsi bloquer la traduction du facteur Caudal (Dubnau et al. 1996; Rivera-Pomar et al. 1996; Chan et al. 1997), révélant ainsi un rôle jusqu'à maintenant insoupçonné pour les homéoprotéines.

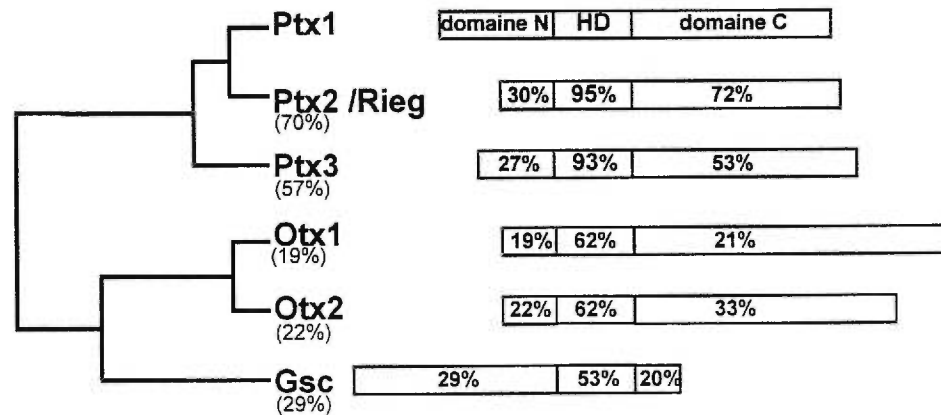
Aucun homologue de Bcd n'a été retrouvé chez les vertébrés, et ce malgré les nombreux efforts de plusieurs groupes. Il existe cependant chez les vertébrés quelques homéoprotéines possédant la Lys<sub>50</sub>. Ces gènes sont tous exprimés dans les structures antérieures et impliqués dans différents aspects de leurs développements. Les facteurs Otx1 et Otx2 (Simeone et al. 1993) sont impliqués dans le développement et les fonctions du cerveau (Acampora et al. 1995; Matsuo et al. 1995; Ang et al. 1996;

Acampora et al. 1996), de même que dans la fonction hypophysaire post-natale [(Acampora et al. 1998) et annexe II]. Un autre facteur possédant une  $Lys_{50}$ , le facteur Goosecoïde (Gsc) (Blum et al. 1992), est requis lors du développement des côtes et des structures craniofaciales (Rivera-Perez et al. 1995; Yamada et al. 1995). Le facteur Crx possède aussi la  $Lys_{50}$  et il a été identifié comme le gène causal de la dystrophie des cônes-bâtonnets chez l'humain, caractérisée par une perte progressive de la vision (Chen et al. 1997; Furukawa et al. 1997; Freund et al. 1997). Crx est en fait essentiel à la différenciation et au maintien des photorécepteurs de même qu'à l'expression de gènes spécifiques à ces cellules. Les facteurs de la famille Six (Oliver et al. 1995) contiennent aussi une  $Lys_{50}$  et sont exprimés tôt dans les membres en développement (Six1 et Six2) et dans le développement de la plaque neurale (Six3). Il semble que ce dernier soit impliqué dans le contrôle de l'information positionnelle nécessaire au développement de la région antérieure de l'embryon (Oliver et al. 1995). Enfin, la plus récente famille des facteurs apparentés à bicoïde, la famille Ptx, comprends trois membres, Ptx1, Ptx2 et Ptx3. Leurs propriétés sont décrites à la section suivante.

#### 1.3.3.2.3.2.3 La famille Ptx

Tel qu'illustré à la Fig. 1-3, les trois facteurs Ptx forment une nouvelle famille d'homéoprotéine du type bicoïde. Ces trois facteurs peuvent toutefois être classés en deux sous-famille distinctes, Ptx1 et Ptx2 versus Ptx3, selon leur séquence peptidique et leur patron d'expression (voir plus bas). Ils possèdent un homéodomaine quasi-identique (58/60 acides aminés) de même qu'une région très conservée de 14 acides aminés localisée en C-terminal et appelé le motif FACE (Semina et al. 1996). Ce motif, de fonction inconnue, est présent dans plusieurs homéoprotéines exprimées dans les structures craniofaciales au cours du développement. Il n'est pas impossible que ce

motif soit impliqué dans des interactions protéine-protéine, où dans la modulation de l'activité de liaison à l'ADN ou des propriétés transcriptionnelles de ces facteurs. Cependant, aucune donnée obtenue jusqu'à maintenant ne confirme une telle fonction.



**Fig. 1-3.** Comparaison des facteurs à homéodomaine de mammifères apparentés à bicoïde.

Toutes les séquences comparées sont d'origine murine à l'exception de Ptx3 qui a été isolé chez le rat. L'identité de séquences (en pourcentage) est donnée en comparaison avec la séquence en acides aminés de Ptx1.

### ***Ptx1***

Ptx1, le prototype de cette famille, a été isolé grâce à ses propriétés de liaison et de transactivation du promoteur POMC [(Lamonerie et al. 1996) et annexe I]. Ptx1, aussi appelé P-Otx, Otx1 et Backfoot, a été cloné chez les vertébrés (Szeto et al. 1996; Mucchielli et al. 1996; Shang et al. 1997), mais aussi chez la drosophile (Vorbruggen et al. 1997), supportant l'hypothèse de l'implication de Ptx1 au cours du développement et de l'expression génique aussi bien chez la mouche que chez l'humain. Ptx1 est principalement exprimé dans deux régions au cours du développement. Chez la souris, Ptx1 est présent dès le jour e6.5 dans le mésoderme extra-embryonnaire et dans le

mésoderme latéral postérieur. Son expression est maintenue dans tous les dérivés du mésoderme latéral de la moitié postérieure du corps, dont le mésenchyme des membres postérieurs mais non dans les membres antérieurs (Lanctôt et al. 1997; Shang et al. 1997). Ces données ont suggérées un rôle critique pour Ptx1 dans la spécification des membres postérieurs, ce qui a de fait été récemment mis en évidence dans une étude de Logan et al. (Logan et al. 1998a). D'autre part, Ptx1 est fortement exprimé dans le stomodeum à partir du jour e7 chez la souris. Cette structure constitue la partie la plus antérieure de l'embryon au cours du développement; elle dérive de la plaque neurale antérieure. Le stomodeum est donc l'épithélium dérivée de l'ectoderme formant l'ébauche des structures pharyngiennes. L'expression de Ptx1 est maintenue dans tous les dérivés du stomodeum dont les épithéliums olfactif, oraux et dentaire, le nasopharynx et la poche de Rathke, cette dernière étant l'ébauche de l'hypophyse (voir section 1.2.3) (Lanctôt et al. 1997). L'expression de Ptx1 s'étend ensuite dans les placodes olfactives jusqu'à la première arche branchiale, de même que dans le mésenchyme de cette dernière (Lanctôt et al. 1997). Ce second patron d'expression suppose certes un rôle pour Ptx1 dans le développement des structures craniofaciales, incluant l'hypophyse. Le gène *PTX1* humain a été localisé sur le chromosome 5q31-35, près du locus responsable du syndrome de Treacher-Collins-Franceschetti (TOCF) (Crawford et al. 1997). Ce syndrome est caractérisé par des malformations craniofaciales qui affectent le maxillaire inférieur, ce qui est en accord avec le patron d'expression de Ptx1 au cours du développement (Lanctôt et al. 1997).

Ptx1 reconnaît spécifiquement les éléments TAATCC-like présents dans plusieurs promoteurs hypophysaires. Ainsi, Ptx1 est défini comme un activateur pan-hypophysaire de la transcription puisque mes travaux ont montré qu'il transactive plusieurs promoteurs hypophysaires (voir chapitre II). Toutefois, il semble que Ptx1

contribue à l'expression cellule-spécifique des gènes hypophysaires par des interactions avec d'autres facteurs restreints à ces cellules. En effet, Ptx1 agit en synergie avec l'hétérodimère bHLH NeuroD1/Pan1 sur le promoteur POMC dans les cellules corticotropes (Poulin et al. 1997), de même qu'avec d'autres facteurs tels le récepteur nucléaire orphelin SF-1, le facteur de réponse immédiate précoce Egr-1, et le facteur POU Pit1, identifiés durant mes travaux et présentés en détails aux chapitres IV et V. Il semble donc que Ptx1 soit recruté avec ces autres facteurs pour définir le code requis pour assurer l'expression histo-spécifique des gènes hypophysaires.

### ***Ptx2***

Ce deuxième membre de la famille Ptx a d'abord été isolé par clonage positionnel chez l'humain comme le gène responsable du syndrome de Rieger et nommé RIEG. Tout comme le syndrome TOCF, ce syndrome est aussi caractérisé, entre autres, par des malformation craniofaciale (Semina et al. 1996; Kulak et al. 1998). Deux autres groupes ont par la suite clonés Ptx2 par une approche de PCR dégénérée [Ptx2 (Gage et al. 1997), et Otx2 (Mucchielli et al. 1996)]. Plus récemment, le gène *Ptx2* (alors appelé *ARP1*) a aussi été cloné comme un gène dont l'expression est diminuée dans des cellules souches dont le gène *ALL1* (l'homologue humain du gène *trithorax* de la drosophile) a été inactivé (Arakawa et al. 1998). Le gène *ALL1* est fréquemment réarrangé dans différents types de leucémies. Le patron d'expression de Ptx2 au cours du développement est similaire à celui de Ptx1 puisqu'il est aussi exprimé dans le stomodeum et ses dérivés, incluant l'hypophyse (Mucchielli et al. 1996). Peu de données sont toutefois disponibles concernant l'expression de la protéine Ptx2. Une différence dans l'expression de Ptx1 et Ptx2 concerne la différenciation de l'épithélium buccal où l'expression de Ptx2 se restreint au niveau de la plaque dentaire, ce qui est consistant avec un rôle pour Ptx2 dans l'odontogenèse (Mucchielli et al. 1996;

Mucchielli et al. 1997). De plus, des différences d'expression entre Ptx1 et Ptx2 sont aussi observées au niveau du mésenchyme du maxillaire (Lanctôt et al. 1997; Mucchielli et al. 1997) et du mésoderme. En effet, Ptx2 est exprimé uniquement dans le mésoderme du côté gauche lors du développement. Ainsi, de récentes études démontrent que Ptx2 est un effecteur essentiel dans l'asymétrie droite-gauche lors du développement de dérivés médodermiques tels le coeur et l'estomac (Ryan et al. 1998; Yoshioka et al. 1998; Logan et al. 1998b; Piedra et al. 1998). Finalement, Ptx2 est aussi exprimé dans la moëlle épinière (Arakawa et al. 1998). Son expression dans ce tissu de même que la diminution de l'expression de Ptx2 dans des cellules *ALL1<sup>-/-</sup>*, suggèrent un rôle pour ce facteur dans la différenciation des cellules hématopoïétiques. Ainsi, l'ensemble de ces données supportent plusieurs rôles fondamentaux pour Ptx2 au cours de l'embryogenèse. Aucun gène cible n'a cependant été identifié pour Ptx2 et ses propriétés étaient jusqu'à récemment méconnues. Les propriétés transcriptionnelles et de liaison à l'ADN de Ptx2 seront présentés au chapitre III.

### ***Ptx3***

Le gène *Ptx3* a été cloné par homologie avec les deux premiers. *Ptx3* a un patron d'expression complètement différent de *Ptx1* et *Ptx2*. Il est exprimé principalement dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale à partir du jour e11.5 chez la souris (Smidt et al. 1997). La dégénérescence de ces neurones est responsable de la maladie de Parkinson. L'expression de *Ptx3* est abolie par la destruction des neurones dopaminergiques par la 6-hydroxydopamine et elle est diminuée dans la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson (Smidt et al. 1997). A la lumière des rôles des autres membres de la famille, il n'est pas inconcevable que *Ptx3* soit impliqué dans la différenciation et/ou la fonction des neurones dopaminergiques. D'autre part, *Ptx3* est aussi exprimé à partir du jour e11 au



cours du développement de l'oeil, particulièrement de la lentille. Au jour e15, Ptx3 est aussi détecté dans les muscles de l'oeil et de la paupière (Semina et al. 1997). Ptx3 est localisé sur le chromosome 19 près du locus *aphakia* (*ak*). Les souris homozygotes pour la mutation *aphakia* ont de petits yeux, sans lentille et les paupières fermées. En accord avec un rôle pour Ptx3 dans le développement de l'oeil, des mutations du gène *PTX3* humain ont été identifiées dans des familles souffrant de cataractes et de dysgenèse du mésenchyme des segments antérieurs (ASDM) (Semina et al. 1998). Tout comme pour Ptx2, aucun gène cible n'a été identifié pour Ptx3. Cependant, il se lie spécifiquement à une séquence TAATCC-like et peut activer la transcription sur un promoteur simple possédant trois copies de ce site de liaison de même que sur une série de promoteurs hypophysaires naturels (annexe III).

#### **1.3.3.2.3.3 Les récepteurs nucléaires**

La superfamille des récepteurs nucléaires compte quelques centaines de protéines différentes dont le rôle est de transformer une grande quantité de signaux extracellulaires en réponse transcriptionnelle. Certains récepteurs nucléaires lient des molécules de signalisation ou hormones qui, grâce à leur petite taille et leur caractère lipophile, diffusent aisément dans la cellule. A l'opposé des récepteurs membranaires, les récepteurs nucléaires sont intracellulaires et fonctionnent en contrôlant directement l'activité transcriptionnelle. La superfamille des récepteurs nucléaires peut être séparée en deux familles: les récepteurs stéroïdiens tels GR, ER, PR, MR, AR, et les récepteurs non-stéroïdiens VDR, RAR, RXR, TR, PPAR pour n'en nommer que quelques uns. La famille des récepteurs non-stéroïdiens peut aussi être divisée en deux sous-familles: les récepteurs avec ligand, et les récepteurs orphelins, c'est-à-dire pour lesquels aucun ligand n'a encore été identifié comme tels SF-1 et Nur77.

### 1.3.3.2.3.3.1 Structure des récepteurs nucléaires

Tous les récepteurs nucléaires partagent une structure similaire [revue dans (Mangelsdorf et al. 1995)]. Le domaine A/B N-terminal contient le domaine d'activation autonome AF-1 (activating function 1) qui est indépendant du ligand. Ce domaine A/B est variable et n'est pas conservé dans toutes les sous-familles de récepteurs nucléaires. La région C correspond au domaine de liaison à l'ADN en doigts de zinc et est suivie d'un motif CTE (carboxy-terminal extension). Ce motif, aussi appelé boîte A, contribue, dans quelques cas, à la spécificité de reconnaissance du site de liaison, principalement dans le cas des récepteurs qui se lient à l'ADN en monomère. Le domaine D est une région charnière alors que le domaine E est le domaine de liaison du ligand (LBD) et de dimérisation. Dans certains cas, le LBD agit comme répresseur car en se repliant, il camoufle le domaine d'activation N-terminal. La liaison du ligand ou la délétion du LBD induit l'activation du AF-1 du récepteur ( Picard et al. 1988; Shen et al. 1994). Une petite région, AF-2, qui forme une structure en hélice  $\alpha$  (hélice 12 du LBD) située en C-terminal du domaine E constitue un autre domaine d'activation (activating function 2) qui dépend, pour son activation, de la liaison du ligand (Webster et al. 1988). La liaison du ligand induit un changement de conformation dans cette hélice qui ensuite se replie sur le LBD pour générer une interface d'interaction protéine-protéine (Bourguet et al. 1995; Renaud et al. 1995; Wagner et al. 1995). Enfin, tous les récepteurs ont un domaine variable F en C-terminal.

### 1.3.3.2.3.3.2 Propriétés de liaison à l'ADN

Certains récepteurs nucléaires ne se lient pas à l'ADN et sont classés dans une famille séparée. Puisqu'ils ne possèdent pas de DBD, ils agissent principalement en formant des dimères avec d'autres récepteurs modulant ainsi leurs activités comme, par exemple, les membres de la famille SHP (small heterodimer partner) (Seol et al. 1996)

et Dax-1 (Zanaria et al. 1994). Une récente étude a toutefois démontré que Dax-1 peut se lier à des régions en épingle à cheveux dans l'ADN et réprimer la transcription (Zazopoulos et al. 1997). Quoiqu'il en soit, la vaste majorité des récepteurs nucléaires se lient spécifiquement à l'ADN et peuvent être séparés en trois groupes selon leur liaison à l'élément de réponse aux hormones (HRE): ceux qui se lient en homodimères uniquement, ceux qui forment des hétérodimères et ceux qui se lient en monomère.

### ***Liaison homodimérique***

Les récepteurs stéroïdiens se classent dans cette catégories puisqu'ils se lient toujours en homodimères à la séquence palindromique AGAACA (GR, MR, PR et AR) ou AGGTCA (ER) invariablement séparée par trois nucléotides (Glass, 1994). Tel que mentionné à la section 1.3.3.2.2.5, en absence du ligand ces récepteurs sont associés avec des chaperones dans un large complexe multi-protéique (Pratt, 1993). Le rôle de ce complexe n'est pas seulement de prévenir la liaison des récepteurs à l'ADN mais aussi de maintenir le domaine de liaison du ligand (LBD) dans une structure facilement accessible aux hormones en plus de participer au repliement du récepteur dans sa structure transcriptionnellement active. Ainsi, la liaison de l'hormone induit un changement de conformation qui expose un domaine de transactivation localisé dans la partie C-terminale de la protéine. D'autres récepteurs peuvent aussi se lier à l'ADN sous forme dimérique. Il s'agit principalement de certains récepteurs nucléaires orphelins. Le facteur nucléaire hépatocytaire HNF4 (hepatocyte nuclear factor) se lie en homodimère à une répétition directe d'un HRE séparée par 1 nucléotide (DR1) et est un puissant activateur transcriptionnel (Jiang et al. 1995). Similairement, de récents résultats ont montré que le récepteur orphelin Nur77 (NGFI-B) se lie préférentiellement sous forme homodimérique à un élément de réponse du promoteur POMC (Philips et al. 1997a) (voir section 1.4.1), et ce malgré le fait qu'il puisse aussi se lier en monomère ou

en hétérodimère avec RXR mais avec une affinité réduite (Murphy et al. 1996). Finalement, le récepteur nucléaire RXR forme principalement des hétérodimères avec d'autres récepteurs, mais peut aussi se lier sous forme homodimérique à un DR1 (Kurokawa et al. 1994).

### ***Liaison monomérique***

Cette catégorie comprend plusieurs récepteurs nucléaires orphelins tels SF-1, ROR et Nur77. Plusieurs sont continuellement actifs, c'est-à-dire que leur liaison à l'ADN est suffisante en soit pour activer la transcription. On ne peut toutefois pas exclure la possibilité qu'un ligand encore non-identifié soit présent dans les cellules lors des essais de transactivation. Un même récepteur peut être actif sur un promoteur mais inactif sur un autre, ou encore son activité peut être stimulée par un co-facteur ou un ligand (hypothétique). Tel est le cas du récepteur SF-1 qui se lie et active plusieurs promoteurs d'enzymes stéroïdogéniques. Cependant, dans les cellules de Sertoli des testicules, SF-1 se lie au promoteur de l'hormone anti-Müllerienne (MIS) sans en activer l'expression. Par contre, la délétion de son LBD le rend actif, suggérant l'existence d'un ligand ou d'un co-facteur impliqué dans l'activation de SF-1 dans les cellules de Sertoli. Cette hypothèse a récemment été confirmée avec l'identification du facteur de transcription WT-1 (Wilms' tumor 1) comme co-facteur pour SF-1 dans ces cellules (Nachtigal et al. 1998). Consistant avec l'existence de co-facteurs pour SF-1, j'ai identifié Ptx1 comme étant un co-facteur puissant pour ce récepteur impliqué dans l'expression du gène LH $\beta$  dans l'hypophyse (chapitre IV).

Les récepteurs de cette classe reconnaissent tous un demi-site AGGTCA prolongé en 5' puisque quelques nucléotides flanquants participent à la spécificité de reconnaissance qui est unique à chaque récepteur (McBroom et al. 1995; Wilson et al. 1993; Harding et al. 1993). Ainsi, en plus du DBD qui contacte le demi-site, le CTE

adjacent au DBD contacte spécifiquement les trois nucléotides immédiatement en 5' du demi-site (McBroom et al. 1995; Wilson et al. 1993). Les différences au niveau de la séquence primaire du CTE des nombreux récepteurs déterminent le site de liaison monomérique.

### ***Liaison hétérodimérique***

Bien que certains récepteurs non-stéroïdiens, dont TR, peuvent former des homodimères, ils ne se lient ainsi à l'ADN qu'avec une faible affinité (Forman et al. 1989; Wahlström et al. 1992). Ils forment plutôt des hétérodimères avec RXR, qui demeure encore aujourd'hui le seul facteur à avoir cette fonction de partenaire pour tous les récepteurs nucléaires de type VDR, RAR, TR et PPAR (Kliwer et al. 1992). Le site de reconnaissance varie selon le partenaire de dimérisation et est généralement une répétition directe ( $\rightarrow n \rightarrow$ ) du demi-site AGGTCA séparé par 1 à 5 nucléotides (DR1 à DR5), mais peut aussi être une répétition inversée (IR;  $\rightarrow n \leftarrow$ ) ou opposée (ER;  $\leftarrow n \rightarrow$ ). Ainsi, la spécificité de reconnaissance dépend de la distance entre les deux demi-sites de même que de leur orientation. De plus, des différences dans la séquence du demi-site de même que dans la région immédiate 5' peuvent aussi affecter dramatiquement l'activité des récepteurs (Mader et al. 1993). Ainsi, RXR occupe généralement le demi-site 5' de la répétition directe alors que le partenaire, VDR sur un DR3, TR sur un DR4 et RAR sur un DR5, se lie au demi-site 3' (Perlmann et al. 1993; Kurokawa et al. 1993; Zechel et al. 1994). Sur un DR1, RXR peut se lier en homodimère ainsi qu'en hétérodimère avec RAR. Cependant, dû à la proximité des deux demi-sites, la polarité de l'hétérodimère RXR/RAR est renversée (Kurokawa et al. 1994). La conséquence de cette polarité inversée est que l'hétérodimère RXR/RAR, qui est un puissant répresseur transcriptionnel en absence du ligand, ne peut être activé

puisque le co-répresseur reste fixé malgré la liaison du ligand. Ce cas constitue une exception puisque la liaison du ligand au récepteur associé à RXR active généralement l'hétérodimère en déplaçant le co-répresseur ce qui permet la liaison du co-activateur sur le partenaire de RXR. Lorsque RXR est en hétérodimère, son ligand, l'acide rétinoïque *9-cis*, ne peut activer le complexe. Seul la liaison du ligand du partenaire, l'hormone thyroïdienne pour le TR, la vitamine D<sub>3</sub> pour le VDR et l'acide rétinoïque tout *trans* pour RAR, peut induire l'activation du complexe (Kurokawa et al. 1994; Forman et al. 1995).

Une récente étude a toutefois identifié un ligand synthétique pour RXR, le LG100754, qui reconnaît spécifiquement RXR lorsqu'en hétérodimère avec RAR ou PPAR résultant en une activation de l'hétérodimère (Lala et al. 1996). Ce ligand ne s'associe pas à RXR si le partenaire est TR, VDR, LXR ou NGFI-B. Curieusement, cette activation ne passe pas par RXR mais plutôt par le partenaire (RAR ou PPAR) qui subit un changement de conformation suite à la liaison du LG100754 au RXR; ce changement de conformation est similaire à celui induit par la liaison de l'acide rétinoïque tout *trans* au RAR (Schulman et al. 1997). Il s'en suit la dissociation de RAR d'avec le co-répresseur et son association avec un co-activateur (Schulman et al. 1997). Ce phénomène de changement de conformation et d'activation du récepteur en absence de son ligand mais cependant induit par la liaison du ligand au partenaire a été appelé "l'effet du ligand fantôme" (Schulman et al. 1997). Cette découverte suggère que les changements allostériques requis pour l'activation d'un récepteur nucléaire peuvent être induits sans la liaison directe du ligand. Ce modèle est supporté par la mise en évidence d'un changement de conformation et de l'activation du récepteur nucléaire orphelin OR1 lors de sa dimérisation avec RXR (Wiebel et al. 1997). Similairement, je montre au chapitre IV que le récepteur nucléaire orphelin SF-1 est activé par une interaction directe avec l'homéoprotéine Ptx1. Dans d'autres cas, comme

celui de l'hétérodimère RXR/PPAR, le complexe peut être activé par l'une ou l'autre des hormones, et la présence des deux hormones active de façon synergique l'hétérodimère (Kliwer et al. 1992; Kliwer et al. 1992). Des complexes hétérodimériques sont aussi formés entre RXR et certains récepteurs nucléaires tels LXR, FXR, et Nur77. Ainsi, RXR est une composante critique dans la formation d'hétérodimères, assurant par le fait même une diversité de réponse aux hormones.

### **1.3.4 Régulation post-transcriptionnelle**

Quoique la régulation transcriptionnelle constitue un mécanisme clé de l'expression des gènes, d'autres étapes, telles la dégradation de l'ARNm et le contrôle de l'initiation de la traduction, sont tout aussi importantes. Tout comme la transcription, ces étapes post-transcriptionnelles de l'expression des gènes sont aussi étroitement régulées. De nombreuses études suggèrent que les mécanismes de contrôle de la dégradation et de la traduction de l'ARNm sont inter-reliés [revue dans (Jacobson et al. 1996)].

#### **1.3.4.1 Stabilité versus dégradation de l'ARNm**

La durée de vie d'un ARNm peut varier de quelques minutes à plusieurs heures dans une cellule (Peltz et al. 1991). Cette énorme variabilité de la stabilité de l'ARNm est principalement dictée par les séquences intrinsèques à la molécule d'ARNm. Par exemple, la présence de la coiffe et la longueur de la queue de poly(A) contribuent à stabiliser l'ARNm (Sachs, 1990; Jacobson et al. 1996), alors que d'autres séquences (voir plus bas) sont responsables de sa dégradation. De façon inhérente, l'ARNm est stable dans la cellule. La rapidité avec laquelle il sera dégradé est dépendante de la puissance des séquences dites déstabilisantes. Ces séquences se retrouvent principalement dans la région 3' non-traduite, mais peuvent aussi être présentes dans la

région 5' non-traduite ou même dans la région codante (Beelman et al. 1995). Ces séquences, aussi appelées ARE (AU-rich element), sont riches en nucléotides AU et peuvent être répétées plusieurs fois (AUUUA)<sub>n</sub> (Shaw et al. 1986). Certains ARNm, comme ceux des gènes de réponse immédiate précoce, possèdent plusieurs ARE, expliquant ainsi leur courte durée de vie (Shyu et al. 1991). Ces séquences sont transférables puisqu'elles peuvent induire une dégradation rapide d'un ARNm normalement stable (Jacobson et al. 1996).

Trois types de signaux peuvent induire la dégradation d'un ARNm: le raccourcissement de la queue de poly(A), l'arrêt prématuré de la traduction à un codon non-sens, et le clivage endonucléotidique. Le processus se poursuit ensuite avec l'enlèvement de la coiffe et la dégradation exonucléotidique (5' → 3' et/ou 3' → 5'). Les facteurs responsables de ces étapes commencent à être identifiés de même que leur mode d'action (Cui et al. 1995; Ruiz-Echevarria et al. 1996; Cui et al. 1995; Czaplinski et al. 1995; Applequist et al. 1997).

#### **1.3.4.2 Contrôle de la traduction**

La première étape de la traduction est la reconnaissance de la coiffe de l'ARNm par la sous-unité eIF4E du complexe eIF4F, un complexe composé de trois sous-unités: eIF4E, eIF4A et eIF4G (eukaryotic initiation factor) (Mader et al. 1995; Lewis et al. 1997). Cette étape de la traduction est limitante chez les eucaryotes et elle constitue aussi l'étape principale du contrôle de l'efficacité de la traduction. La sous-unité eIF4G stimule la liaison de eIF4E à la coiffe (Haghighat et al. 1997) alors que la sous-unité eIF4A est une ARN hélicase (Rozen et al. 1990). Deux facteurs inhibiteurs de l'initiation de la traduction ont été identifiés: 4E-BP1 et 4E-BP2. Ces facteurs inhibent la traduction en se liant à eIF4E, empêchant son interaction avec la coiffe et eIF4G. D'autres complexes multiprotéiques d'initiation de la traduction (eIF2 et eIF3) se joignent au



complexe d'initiation. eIF3 stabilise le complexe eIF2-GTP-ARNt(Met) et stimule la liaison à l'ARNm de la sous-unité ribosomale 40S qui glisse sur la séquence 5' non-traduite de l'ARNm à la recherche du codon AUG initiateur. Une fois ce codon identifié, la formation du complexe ribosomal se poursuit et la traduction commence. Il est important de mentionner que la séquence du codon initiateur peut aussi grandement influencer l'efficacité de la traduction (Kozak, 1984).

#### **1.3.4.3 Contrôle post-traductionnel**

Toutes les modifications post-traductionnelles des protéines, telles la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation et l'ADP-ribosylation, constituent des étapes importantes de la régulation de l'activité des protéines. Tous ces processus sont sujets à une régulation serrée. La demi-vie des protéines est aussi une façon de contrôler leur activité. Tout comme pour les ARNm, la stabilité des protéines est essentiellement dictée par leur séquence primaire; par exemple les séquences PEST (segment de la protéine riche en résidus proline, glutamate, sérine et tyrosine) stimuleraient la dégradation des protéines. Cette dégradation des protéines est initiée par l'ajout, aux résidus lysine de la protéine, de petites protéines appelées ubiquitines. Les protéines ainsi modifiées sont dégradées au niveau d'un complexe protéolytique, les protéosomes (Ciechanover, 1994).

### **1.4 Régulation de l'expression des gènes hypophysaires**

L'hypophyse, de par sa structure, constitue un excellent modèle pour l'étude de la régulation de l'expression de gènes au cours du développement et de la différenciation cellulaire. Plusieurs facteurs de transcription importants au développement de cet organe ont été identifiés par l'étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression des gènes codant pour les hormones

hypophysaires. Certains sont spécifiques à un promoteur en particulier, comme l'hétérodimère NeuroD1/Pan1, alors que d'autres agissent sur plus d'un promoteur tel Pit1. Tel que déjà mentionné, je montre dans cette thèse que le facteur Ptx1 est impliqué dans l'activation de tous les promoteurs des gènes codants pour les hormones hypophysaires (chapitre II). L'étude de l'expression des gènes des hormones hypophysaires a été grandement facilitée par la disponibilité de plusieurs modèles de cellules en culture représentant les différents types cellulaires de l'hypophyse (Windle et al. 1990; Lew et al. 1992; Alarid et al. 1996).

#### **1.4.1 Régulation de l'expression de la POMC**

L'expression de la POMC est régulée différenciellement dans les cellules mélanotropes et corticotropes de l'hypophyse (Jacobson et al. 1994). L'absence de modèle de cellules en culture représentant les mélanotropes est grandement responsable du peu d'information concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression de la POMC dans ces cellules. Par contre, l'étude des éléments de contrôle de l'expression de la POMC dans les cellules corticotropes a été facilitée par la disponibilité d'un modèle cellulaire, les cellules AtT-20. Des approches de souris transgéniques ont aussi été utilisées pour confirmer l'importance de ces éléments de régulation *in vivo*. A l'aide de ces deux approches, on a pu démontrer que la région 5' jusqu'à -480 pb est suffisante pour conférer de haut niveau d'expression de même que la réponse hormonale aux glucocorticoïdes et à la CRH (Jeannotte et al. 1987; Therrien et al. 1991; Tremblay et al. 1988). Plus de 10 éléments de régulation à l'intérieur de cette région contribuent à l'activité du promoteur POMC, mettant ainsi en évidence la complexité de ce promoteur comparativement à d'autres comme GH ou PRL (voir section 1.4.2). Plusieurs de ces éléments sont reconnus par des protéines ubiquitaires, comme Sp1 ou AP-1, qui ne peuvent, par conséquent, pas être responsable de la

spécificité d'expression de POMC dans les corticotropes. Cependant, deux éléments présentent une activité spécifique aux cellules corticotropes: l'élément CE3 (central element 3) situé entre -322 et -287 pb, et l'élément DE2 (distal element 2) localisé entre -412 et -387 pb (Therrien et al. 1991; Therrien et al. 1993; Lamonerie et al. 1996). L'activité dépend essentiellement de l'élément CE3, l'élément DE2 isolé étant inactif. Cependant, l'élément DE2 agit en synergie avec l'élément CE3 pour assurer les hauts niveaux d'activité du promoteur POMC dans les cellules AtT-20 (Therrien et al. 1993). En fait, ces deux éléments sont aussi actifs que le promoteur complet dans des cellules en culture (Therrien et al. 1991; Therrien et al. 1993; Lamonerie et al. 1996). Le facteur se liant à l'élément CE3 a été isolé par notre groupe et il s'agit du facteur de transcription à boîte homéo de type bicoïde Ptx1 (Lamonerie et al. 1996). Ptx1 reconnaît et active le promoteur POMC via un sous-domaine de l'élément CE3, le site de liaison de Ptx (Ptx binding site), contenant la séquence TAAGCC, séquence spécifiquement reconnu par les homéoprotéines appartenant à la famille bicoïde (voir section 1.3.3.2.3.2).

L'élément DE2 peut être divisé en trois sous-domaines DE2A, B et C. Le sous-domaine DE2C est responsable de l'activité de l'élément DE2 (Therrien et al. 1993). DE2A et DE2B sont inactifs en absence de DE2C, mais leur présence est essentielle à la pleine activité de l'élément DE2. Le sous-domaine DE2C contient la séquence CANNTG reconnue par un hétérodimère de facteurs de la famille bHLH. Cet hétérodimère est composé d'une bHLH ubiquitaire (Pan1) et d'une bHLH spécifique aux cellules corticotropes (Therrien et al. 1993). Une récente étude par Poulin et al. a révélé l'identité du facteur bHLH corticotropique: il s'agit du facteur NeuroD1 (Poulin et al. 1997). L'hétérodimère NeuroD1/Pan1 se lie spécifiquement à l'élément DE2C et agit en synergie avec Ptx1 lié à l'élément CE3, reconstituant ainsi la spécificité de l'activité du promoteur POMC dans les cellules corticotropes (Poulin et al. 1997).

De récentes données ont montré que l'activation de la transcription de la POMC par la CRH et la répression transcriptionnelle par les glucocorticoïdes convergent sur un facteur de transcription commun, le récepteur nucléaire orphelin Nur77 (Philips et al. 1997b). L'expression de ce récepteur, un membre de famille des gènes de réponse immédiate précoce, est rapidement et transitoirement induite par la CRH dans les cellules AtT-20. Le facteur Nur77 ainsi produit se lie, sous forme homodimérique (Philips et al. 1997a), à son élément de réponse appelé NurRE (Nur response element) localisé entre les éléments DE2A et DE2B du promoteur POMC. Il s'ensuit une impressionnante activation du promoteur POMC (Philips et al. 1997b). De plus, l'action répressive des glucocorticoïdes s'effectue aussi au niveau du NurRE. Les glucocorticoïdes se lient à leur récepteur (GR) ce qui mène à un blocage de l'activation de l'expression de Nur77 induite par la CRH. De plus, le GR interagit aussi directement avec Nur77 prévenant ainsi sa liaison au NurRE (Philips et al. 1997b).

#### **1.4.2 Régulation de l'expression de la GH et de la PRL**

Tout comme pour le promoteur POMC, l'étude de ces deux promoteurs a été grandement facilitée par plusieurs modèles de cellules en cultures, GH3, GC et MMQ. A la différence du promoteur POMC, les promoteurs GH et PRL sont essentiellement activés par un seul facteur commun, Pit1 (Nelson et al. 1988; Ingraham et al. 1988; Mangalam et al. 1989; Lefebvre et al. 1987; Bodner et al. 1988; Fox et al. 1990). Une mutation dans le gène Pit1 abolit non seulement l'expression des gènes GH et PRL (et TSH $\beta$  – voir plus bas), mais aussi empêche la différenciation des lignées somatotropes, lactotropes et thyrotropes (voir section 1.2.4) (Li et al. 1990). Un fragment de promoteur GH jusqu'à -320 pb, qui contient entre autres deux sites pour le facteur Pit1, est suffisant pour conférer l'expression au type cellulaire approprié *in vivo*. L'expression du gène PRL *in vivo* requiert la région promotrice jusqu'à -422 pb qui contient, selon

l'espèce, 4 ou 5 sites de liaison de Pit1, mais aussi une région enhancer localisée entre -1831 et -1530 pb (Crenshaw et al. 1989). Cette région enhancer contient 4 sites de liaison du facteur Pit1. Pit1 ne peut cependant pas être l'unique responsable de l'expression spécifique des gènes GH et PRL dans leur lignée cellulaire respective. Trois mécanismes sont impliqués dans cette spécificité d'expression: (1) des éléments silenciers dans le promoteur PRL sont requis pour éteindre son expression dans les cellules non-lactotropes (Crenshaw et al. 1989), (2) la coopération de Pit1 avec d'autres facteurs, et (3) l'existence d'isoforme de Pit1 qui ont des activités différentielles sur les promoteurs GH et PRL. Au niveau du promoteur GH, Pit1 agit en synergie avec le facteur Zn-15, un facteur contenant 15 doigts de zinc (Lipkin et al. 1993). Ce facteur se lie à un élément localisé entre les deux sites de reconnaissance du facteur Pit1. De plus, Pit1 coopère aussi avec le récepteur nucléaire TR (Glass et al. 1987; Norman et al. 1989). Similairement, Pit1 agit en synergie avec le récepteur stéroïdien ER dont le site de liaison est localisé sur le enhancer du gène PRL (Maurer et al. 1987; Day et al. 1990). D'autre part, Pit1 interagit avec l'homéoprotéine Ptx1 pour activer de façon synergique les promoteurs GH et PRL [chapitre II et (Szeto et al. 1996)]. Finalement, il existe 4 isoformes de Pit1, dont une, Pit1 $\Delta$ 4, réprime l'expression de la PRL (Day et al. 1994; Voss et al. 1993).

#### **1.4.3 Régulation de l'expression de la TSH $\beta$**

L'absence d'une lignée cellulaire exprimant la TSH $\beta$  a compliqué l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant l'expression de ce gène. Les études du promoteur  $\alpha$ GSU ont été réalisées dans les cellules tumorales TtT-97. Toutefois, le développement récent d'une lignée thyrotrope, les cellules  $\alpha$ TSH, devrait faciliter l'étude de ce promoteur (Akerblom et al. 1990). L'étude de mutations du facteur Pit1 a montré

que ce facteur est important pour l'expression du gène codant pour la sous-unité TSH $\beta$  de l'hormone TSH (Simmons et al. 1990; Lin et al. 1994). Tout comme dans le cas des gènes GH et PRL, Pit1 agit en association avec d'autres facteurs afin de conférer l'expression thyrotrope-spécifique du gène TSH $\beta$  (Haugen et al. 1993). Pit1 coopère avec le complexe AP-1 (Kim et al. 1993), avec le facteur à doigts de zinc GATA-2 (Gordon et al. 1997) de même qu'avec le facteur Lim3/Lhx3 (Bach et al. 1995). Ce dernier est cependant inactif seul mais amplifie l'activation par Pit1. De plus, il existe une isoforme de Pit1, Pit1T, exprimée spécifiquement dans les cellules thyrotropes. Pit1T est un activateur plus efficace du promoteur TSH $\beta$  que l'isoforme Pit1 (Haugen et al. 1993). Ces deux isoformes de Pit1 agissent de façon synergique spécifiquement au niveau du promoteur TSH $\beta$  (Haugen et al. 1994). Toutes ces coopérations entre facteurs de transcription semblent responsables de la spécificité d'expression du gène TSH $\beta$ .

#### **1.4.4 Régulation de l'expression de l' $\alpha$ GSU**

La sous-unité  $\alpha$  est commune aux gonadotropines (LH et FSH) et à la thyrostimuline (TSH). Ce gène doit être exprimé dans les cellules gonadotropes et thyrotropes, suggérant l'existence de facteurs communs à ces deux types cellulaires. Cependant, le gène  $\alpha$ GSU répond à des stimuli spécifiques à chacun des types cellulaires (comme TRH dans les thyrotropes et GnRH dans les gonadotropes) favorisant l'existence de facteurs spécifiques. La plupart des études ont été effectuées dans la tumeur thyrotropique TtT-97, dans des souris transgéniques, mais principalement à l'aide de modèles cellulaires: les cellules  $\alpha$ T3-1 comme modèle de gonadotropes immatures (expriment le récepteur GnRH et la sous-unité  $\alpha$  mais aucune des sous-unités  $\beta$ ) (Windle et al. 1990) et les  $\alpha$ TSH représentant les thyrotropes

(Akerblom et al. 1990). Il semble que la région promotrice jusqu'à -480 pb soit suffisante pour l'expression spécifique dans les deux types cellulaires, quoiqu'à de faibles niveaux (Kendall et al. 1994). Une expression soutenue requiert un élément enhancer de 859 pb localisé entre -4.6 et -3.7 kpb (Kendall et al. 1994; Brinkmeier et al. 1998). Le séquençage de cet enhancer a révélé la présence de sites de liaison de plusieurs facteurs, dont Ptx1 et Lim3/Lhx3, impliqués dans l'activité du fragment de -480 pb (Brinkmeier et al. 1998). Plusieurs facteurs impliqués dans l'expression des gènes gonadotropes et thyrotropes sont communs à ces deux types cellulaires tels GATA-2/3 (Steger et al. 1994), un facteur de la famille LIM (LH-2/Lhx2 ou Lim3/Lhx3) (Roberson et al. 1994; Bach et al. 1995), des dimères de facteurs bHLH-ZIP (Jackson et al. 1995), et maintenant Ptx1 (voir chapitre II).

Par contre, les facteurs responsables de l'expression spécifique aux cellules gonadotropes ou thyrotropes sont cependant moins bien caractérisés, bien que certains éléments distincts aient été identifiés [(Hamernik et al. 1992) et revue dans (Aylwin et al. 1995)]. Il semble que le récepteur nucléaire orphelin SF-1 soit impliqué dans l'expression de la  $\alpha$ GSU dans les gonadotropes (Barnhart et al. 1994), de même que certains autres facteurs ( $\alpha$ BE1 et  $\alpha$ BE2) non encore caractérisés (Schoderbek et al. 1993; Heckert et al. 1996). Suite à la mutation des sites de liaison de ces facteurs, on observe une diminution de l'activité du promoteur  $\alpha$ GSU dans les gonadotropes. De plus, deux éléments de réponse à la GnRH ont été localisés: le premier entre -409 et -399 pb et le second entre -337 et -330 pb (Kay et al. 1992; Schoderbek et al. 1993). Il semble toutefois que seulement celui situé entre -409 et -399 pb puisse conférer la réponse au GnRH lorsque fusionné à un autre promoteur et pour cette raison a été nommé le GnRH-RE (Schoderbek et al. 1993). Une récente étude a révélé que la stimulation du promoteur  $\alpha$ GSU par la GnRH passe par la voie de signalisation

impliquant l'augmentation du  $Ca^{++}$  intracellulaire alors que la stimulation de l'expression des sous-unités  $\beta$  implique la voie de la protéine kinase C (Saunders et al. 1998; Holdstock et al. 1996). De plus, Robertson et al. ont montré que le facteur Ets-2 peut se lier au GnRH-RE et qu'un dominant négatif de Ets-2 atténue la stimulation en réponse à la GnRH (Robertson et al. 1995). Cependant, une étude effectuée par un autre groupe ne supporte pas cette hypothèse (Sundaresan et al. 1996). Des études plus approfondies seront donc nécessaires afin d'identifier le facteur responsable de la stimulation du promoteur  $\alpha$ GSU en réponse à la GnRH. Les stéroïdes gonadiques (estrogènes et androgènes) répriment la transcription de  $\alpha$ GSU; cet effet ne semble pas requérir la liaison à l'ADN de leur récepteurs activés (ER et AR) et résulterait probablement de la séquestration d'un autre facteur (Keri et al. 1991; Heckert et al. 1997).

Aucun facteur associé à l'expression de  $\alpha$ GSU dans les cellules thyrotropes n'a clairement été identifié, quoique le facteur à boîte homéo Msx1 ait été proposé comme un de ces facteurs (Sarapura et al. 1997). Plusieurs éléments ont toutefois été identifiés dont le principal semble localisé entre -474 et -419 pb (Ocran et al. 1990). Dans les cellules thyrotropes, l'expression du gène  $\alpha$ GSU est activé par la TRH. L'élément responsable de l'activation a été localisé entre -346 et -280 pb mais le facteur de transcription se liant à cet élément demeure inconnu (Pennathur et al. 1993). Le promoteur  $\alpha$ GSU est cependant réprimé par les hormones thyroïdiennes via la liaison de leur récepteur (TR) à un élément situé dans la région promotrice proximale (Chatterjee et al. 1989; Jameson et al. 1992; Yarwood et al. 1993; Sarapura et al. 1990).



#### 1.4.5 Régulation de l'expression de la LH $\beta$ et de la FSH $\beta$

Très peu de données sont disponibles concernant la régulation de l'activité du promoteur FSH $\beta$  dans les cellules gonadotropes. Ceci est principalement dû à l'absence de modèle cellulaire qui exprime ce gène. Néanmoins, des analyses de transgénèse ont montré qu'un fragment de 10 kpb du promoteur FSH $\beta$  est suffisant pour conférer l'expression dans les cellules gonadotropes de même que la réponse hormonale (Kumar et al. 1992). Trois sites de liaison du récepteur de la progestérone (PR) ont été localisés dans la région entre -250 et -137 pb. Ces éléments sont reconnus par le PR activé menant à une augmentation de l'activité du promoteur FSH $\beta$  (Webster et al. 1995). L'élément responsable de la répression de la transcription de FSH $\beta$  par les estrogènes a été localisé entre -105 et -72 pb. Le récepteur des estrogènes (ER) activé par l'hormone ne peut toutefois se lier à cette séquence (Miller et al. 1996). Ceci suggère que l'inhibition transcriptionnelle s'effectue plutôt par l'entremise d'interactions protéine-protéine, prévenant la liaison d'un facteur activateur à cet élément. En fait, le facteur AP-1 (Fos/Jun) se lie à cet élément et active la transcription du gène FSH $\beta$  (Strahl et al. 1997). Quoique non-démonstré dans le cas du promoteur FSH $\beta$ , la répression par ER pourrait être due à la séquestration du complexe AP-1. Le blocage de la liaison du complexe AP-1 à son élément par ER a de fait déjà été observé dans un autre promoteur (Schmitt et al. 1995). Bien que la GnRH augmente la transcription de FSH $\beta$ , l'élément de régulation et le facteur responsable de cette stimulation n'ont pas encore été identifiés.

Il y a quelques années à peine, peu de données étaient disponibles concernant la transcription de la sous-unité LH $\beta$ . Plusieurs groupes ont indépendamment utilisé une approche de transgénèse afin de localiser la région requise pour la spécificité d'expression et pour la réponse aux hormones hypothalamique (GnRH) et gonadique

(testostérone et estrogène) (Brown et al. 1993; McNeilly et al. 1996; Fallest et al. 1995; Keri et al. 1994). Ces études ont révélé qu'un fragment de promoteur jusqu'à -776 pb est suffisant pour conférer ces propriétés (Keri et al. 1994). Deux facteurs de transcription, soit SF-1 et Egr-1, sont connus comme régulateurs la transcription du gène LH $\beta$ . Le premier identifié a été le récepteur nucléaire orphelin SF-1. Cette découverte est survenue par hasard lors de l'analyse des souris dont le gène codant pour SF-1 avait été inactivé (knock-out). SF-1 avait déjà été impliqué dans l'expression de plusieurs gènes des tissus stéroïdogéniques (surrénales et gonades) [revue dans (Parker et al. 1997)]. Ainsi, il ne fût pas surprenant de constater que les gonades et les surrénales de ces souris étaient hypoplasiques, voire même absentes. Étonnamment, ces souris n'expriment pas le gène LH $\beta$  (Ingraham et al. 1994; Sadovsky et al. 1995; Shinoda et al. 1995). Des études *in vivo* et *in vitro* subséquentes ont confirmé la liaison de SF-1 à un élément localisé à -120 pb induisant l'activation du promoteur LH $\beta$  (Halvorson et al. 1996; Keri et al. 1996). Le facteur de réponse immédiate précoce Egr-1 a été le deuxième facteur identifié comme étant impliqué dans la transcription du gène LH $\beta$ . Tout comme SF-1, il a été identifié par hasard lors de l'analyse du phénotype causé par son inactivation: ces souris n'expriment pas le gène LH $\beta$  (Lee et al. 1996a; Topilko et al. 1998). Egr-1 peut se lier à un élément localisé à -45 pb et activer le promoteur LH $\beta$  seul et en synergie avec SF-1 (Lee et al. 1996a).

### 1.5 Hypothèse de travail

Plusieurs facteurs impliqués dans le développement de l'hypophyse de même que dans l'expression des gènes hypophysaires ont été identifiés au cours des dernières années. L'homéoprotéine Ptx1 a été clonée comme facteur clé pour l'expression du gène de la POMC dans les cellules corticotropes (Lamonerie et al.

1996). Ptx1 est le prototype d'une nouvelle famille d'homéoprotéines qui comprend aujourd'hui Ptx2 et Ptx3. De récentes données concernant la localisation cellulaire de Ptx1, son expression au cours du développement et son rôle potentiel dans certaines maladies suggèrent que ce facteur à boîte homéo joue un rôle général dans l'hypophyse et qu'il soit un régulateur important pour l'expression des gènes hypophysaires. Cependant, très peu est connu jusqu'à présent concernant le rôle de Ptx1 dans la fonction de l'hypophyse et dans l'expression des gènes hypophysaires. Ainsi, mon projet de thèse vise à élucider le mécanisme d'action de Ptx1 dans l'expression des gènes hypophysaire. Le chapitre II décrira dans une première étape l'expression de Ptx1 dans les différents types cellulaires qui composent l'hypophyse et la compare avec celle des autres membres de la famille Ptx. Dans une deuxième étape, le rôle de Ptx1 et l'existence d'un code pour la transcription spécifique de plusieurs gènes hypophysaires seront mis en évidence. Finalement, la position de Ptx1 dans la cascade de régulateurs du développement hypophysaire sera défini. Le chapitre III décrira l'isolement et la caractérisation d'une isoforme du facteur Ptx1, de même que la comparaison des propriétés de liaison à l'ADN et des propriétés transcriptionnelles des isoformes des facteurs Ptx1 et Ptx2. Le chapitre IV décrira une analyse de la structure-fonction de Ptx1 et démontrera aussi l'activation du récepteur nucléaire orphelin SF-1 par une interaction directe avec l'homéoprotéine Ptx1. Le chapitre V identifiera le facteur Egr-1 comme médiateur transcriptionnel de la stimulation de l'expression du gène LH $\beta$  induite par la GnRH. De plus, dans ce chapitre, le mode d'action de Egr-1 en association avec les facteurs Ptx1 et SF-1 pour la transcription du gène LH $\beta$  sera décrit. Enfin, au chapitre VI je présenterai une analyse critique des résultats présentés aux chapitres II, III, IV et V, pour ensuite intégrer leurs implications dans le développement et la fonction de l'hypophyse.

Le chapitre II est publié dans *Molecular Endocrinology*. Les chapitres III, IV et V sont soumis pour publication.

Tous les résultats présentés dans cette thèse ont été obtenus par le candidat sauf ce qui concerne: (1) les expériences d'immunohistochimie dont les résultats sont présentées à la Fig. 2-6 qui ont été effectuées par Christian Lanctôt; (2) la construction et les transfections du rapporteur contenant le promoteur Ptx1b qui ont été effectuées en collaboration avec Cynthia Goodyer et dont les données sont présentées à la Fig. 3-2B; (3) la préparation des protéines de fusion MBP-SF-1 et MBP-SF-1 $\Delta$ LBD utilisées dans les essais d'interaction protéine-protéine *in vitro* (chapitres IV et V) qui ont été effectuées avec l'aide de Yves Gauthier, technicien au laboratoire.

## CHAPITRE II

### **The pan-Pituitary Activator of Transcription, Ptx1 (Pituitary Homeobox 1), Acts in Synergy with SF-1 and Pit1, and Is an Upstream Regulator of the Lim-Homeodomain Gene Lim3/Lhx3**

Jacques J. Tremblay, Christian Lanctôt and Jacques Drouin

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

*Molecular Endocrinology* (1998) 12:428-441.

## INTRODUCTION AU CHAPITRE

Le facteur de transcription à homéodomaine Ptx1 (pituitary homeobox 1) a été cloné en tant qu'activateur du promoteur POMC. Toutefois, Ptx1 est présent dans toutes les cellules hypophysaires, ce qui a suggéré que Ptx1 puisse être un facteur potentiel pour l'expression des gènes hypophysaires. Très peu est connu jusqu'à ce jour concernant le rôle de ce facteur dans la fonction hypophysaire. Donc, cet article décrit l'analyse de l'expression des membres de la famille Ptx, soit Ptx1, Ptx2 et Ptx3, dans les différents types cellulaires qui composent l'hypophyse et définit le rôle du facteur Ptx1 dans l'expression des gènes hypophysaires et le développement de cette glande.

## RÉSUMÉ

Ptx1 et Ptx2, mais non Ptx3, sont exprimés dans la plupart des lignées cellulaires en culture correspondant aux différents types cellulaires de l'hypophyse. Tout comme pour l'expression de son ARNm, la protéine Ptx1 est présente dans toutes ces lignées cellulaires. Cependant, Ptx1 semble être la seule protéine Ptx présente dans les cellules corticotropes et elle est prédominante dans les cellules gonadotropes. Ptx1 active la plupart des promoteurs hypophysaires, le définissant ainsi comme un régulateur général de la transcription spécifique à l'hypophyse. Ptx1 agit de façon synergique avec d'autres facteurs de transcription d'expression restreinte à certaines cellules, menant à une transcription qui est promoteur- et cellule-spécifique. En fait, dans les lignées somatolactotropes, Ptx1 coopère avec le facteur POU Pit1 au niveau des promoteurs PRL et GH. De plus, il s'associe au récepteur nucléaire orphelin SF-1 dans les cellules gonadotropes pour activer spécifiquement le promoteur du gène  $\beta$ LH mais non ceux des gènes  $\alpha$ GSU (sous-unité  $\alpha$  des hormones glycoprotéiques) et  $\beta$ FSH. La synergie entre une homéoprotéine, Ptx1, et un récepteur nucléaire, SF-1, est évocatrice de l'interaction entre les produits des gènes *Ftz-F1* (l'homologue de SF-1) et *Ftz* (codant pour l'homéoprotéine Fushi tarazu) chez la drosophile.

Des expériences de surexpression d'ARN antisens de Ptx1 effectuées dans les cellules  $\alpha$ T3-1, un modèle de cellules gonadotropes exprimant  $\alpha$ GSU, ont révélé que l'expression endogène du gène  $\alpha$ GSU est étroitement dépendante de Ptx1 alors que l'expression de plusieurs autres gènes n'est pas affectée par l'absence de Ptx1. Par ailleurs, l'expression d'un seul autre gène, celui codant pour le facteur de transcription Lim3/Lhx3, est aussi étroitement dépendante de Ptx1. Le facteur Lim3/Lhx3 est essentiel au développement normal de l'hypophyse. Les résultats de ces expériences placent Ptx1 en amont de Lim3/Lhx3 dans une cascade de régulateurs qui agissent

ensemble selon une sorte de code pour conférer une transcription hypophyse-, cellule-, et promoteur-spécifique.



## ABSTRACT

The Ptx1 (pituitary homeobox 1) homeobox transcription factor was isolated as a transcription factor of the pituitary POMC gene. In corticotrope cells that express POMC, cell-specific transcription is conferred in part by the synergistic action of Ptx1 with the bHLH factor NeuroD1. Since Ptx1 expression precedes pituitary development and differentiation, we investigated its expression and function in other pituitary lineages. Ptx1 is expressed in most pituitary-derived cell lines and so is the related Ptx2 (Rieger) gene. However, Ptx1 appears to be the only Ptx protein in corticotropes and the predominant one in gonadotrope cells. Most pituitary hormone-coding gene promoters are activated by Ptx1. Thus, Ptx1 appears to be a general regulator of pituitary-specific transcription. In addition, Ptx1 action is synergized by cell-restricted transcription factors to confer promoter-specific expression. Indeed, in the somatolactotrope lineage, synergism between Ptx1 and Pit1 is observed on the prolactin promoter, and strong synergism between Ptx1 and SF-1 is observed in gonadotrope cells, on the  $\beta$ LH promoter but not on the  $\alpha$ GSU (glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene) and  $\beta$ FSH promoters. Synergism between these two classes of factors is reminiscent of the interaction between the products of the *drosophila* genes Ftz and Ftz-F1. Antisense RNA experiments performed in  $\alpha$ T3-1 cells that express the  $\alpha$ GSU gene showed that expression of endogenous  $\alpha$ GSU is highly dependent on Ptx1 whereas many other genes are not affected. Interestingly, the only other gene found to be highly dependent on Ptx1 for expression was the gene for the Lim3/Lhx3 transcription factor. Thus, these experiments place Ptx1 upstream of Lim3/Lhx3 in a cascade of regulators that appear to work in a combinatorial code to direct pituitary-, lineage-, and promoter-specific transcription.

## INTRODUCTION

The pituitary gland has been a fruitful model with which to identify factors involved in cell-specific transcription and in the regulation of cell fate during development. The mature pituitary is composed of six different cell types, five in the anterior lobe and one in the intermediate lobe, that arise sequentially during development and are easily distinguishable by the hormone they secrete (1). The glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene ( $\alpha$ GSU) is the first hormone subunit to be expressed in the developing mouse pituitary on embryonic day 11.5 (e11.5), followed by anterior pituitary POMC on e12, TSH on e14, intermediate lobe POMC for MSH synthesis on e14.5, GH and PRL on e15.5, LH on e16.5 and FSH on e17.5 (2-5).

During early development, the pituitary anlage, Rathke's pouch, develops from a placode of the stomodeum which itself is derived from the cephalic ectoderm of the anterior neural ridge (6, 7). Rathke's pouch is first identified in mouse at e8.5 as an invagination of the oral epithelium that is in contact with the floor of the diencephalon (8). The posterior lobe of the pituitary arises simultaneously from a downward evagination of the diencephalic neuroectoderm, the infundibulum (8). Contact between Rathke's pouch and the ventral diencephalon is crucial for further pituitary development (9-12). For example, the TTF-1 (Nkx2.1, T/ebp) gene is essential for pituitary development although not expressed in Rathke's pouch (12). Rather, TTF-1 is expressed in the neuroepithelium that will later give rise to the hypothalamus and to the infundibulum (12). Mice lacking this gene not only fail to develop the posterior lobe but also the anterior and intermediate pituitary lobes (12), confirming the importance of the interaction between diencephalon and Rathke's pouch for proper pituitary development. Around e12.5, Rathke's pouch pinches off from the oral ectoderm and intense cell proliferation (e12.5-e14) triggers the formation of the anterior pituitary gland (8, 13).

The factors involved in the early events of pituitary development are just beginning to be identified. We previously cloned a homeoprotein, Ptx1 (Pituitary Homeobox 1), through its ability to bind and activate the POMC gene (14). Ptx1 expression precedes Rathke's pouch formation as it is expressed in the stomodeum from its first appearance (15) and later maintained in all stomodeal derivatives, including Rathke's pouch and the pituitary. Another recently reported Ptx family member, Ptx2 (Rieg) (16-18) is also expressed at this early stage of pituitary development (18). Thus, Ptx1 and Ptx2 represent the earliest known genetic markers for pituitary development.

The homeobox gene Rpx (Hesx1) is transiently expressed in the developing pituitary from e9 to e14.5 (19, 20). The precise function of Rpx remains unknown since no target gene has yet been identified (19). However, Rpx can heterodimerize with Prop-1 (see below) and thus interfere with Prop-1-dependent activation of the Pit1 gene (21). Transgenic mice continuously expressing Rpx have hypoplastic pituitaries suggesting that the extinction of Rpx is essential for proper pituitary development (K.Mahon, personal communication). Lim3/Lhx3, a lim-homeodomain protein, which is expressed from e9.5 onward (22, 23) has recently been shown to be required for normal pituitary development since targeted ablation of its gene results in blockade of cell proliferation or survival at the Rathke's pouch stage and prevents subsequent lineage specification (24). In these animals, Rpx gene expression is prematurely decreased implying that Lim3/Lhx3 is required for maintenance of Rpx gene expression (24). The Lim3/Lhx3 transcription factor may also take part in expression of pituitary hormone-coding genes (22).

Prop-1 is a recently identified homeoprotein that is transiently expressed during pituitary development (e10-10,5 to e14.5) where it stimulates the Pit1 gene, a member of the POU family of transcription factors (21). Insufficient Pit1 gene expression, caused by a mutation in the Prop-1 gene, is responsible for the Ames dwarf phenotype in which

there is severe depletion of three Pit1-dependent lineages: the somatotropes, lactotropes and thyrotropes (25). Moreover, Prop-1 seems to be required for extinction of the Rpx gene since Rpx expression persists through e18.5 in Prop-1-deficient mice (21, 26). Pit1 is first detected at e14 in the developing mouse pituitary (27). As indicated above, it is required for differentiation and maintenance of thyrotrope, somatotrope and lactotrope cell lineages (28-30). Pit1 is an important transcription factor required for the expression of the GH,  $\beta$ TSH and PRL genes, and it also activates its own expression (29, 31-34).

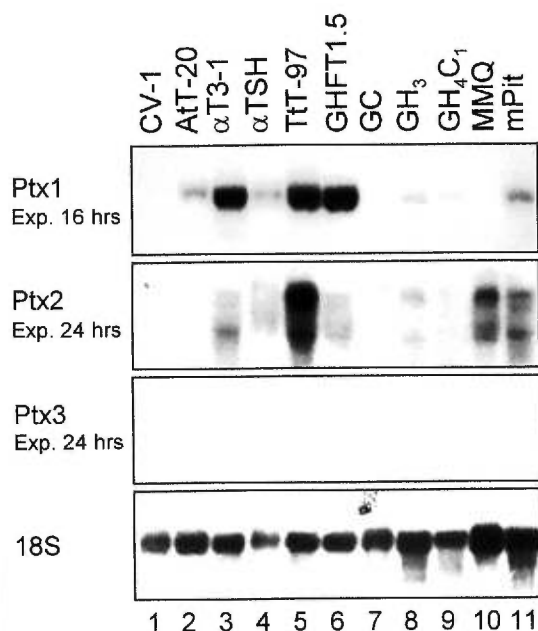
In the present study, we have defined the role of Ptx1 in pituitary-specific transcription and its position in the regulatory cascade of genes that direct pituitary development. Indeed, we show that Ptx1 is essential for expression of the  $\alpha$ GSU and Lim3/Lhx3 genes, thus identifying Ptx1 as the earliest regulator of pituitary transcription.

## RESULTS

### **Ptx1 Is Expressed in All Pituitary Cell Types**

We showed previously that Ptx1 is expressed in corticotrope cells of the pituitary where it activates the POMC gene. *In situ* hybridization analysis had suggested that Ptx1 mRNA was also present in other pituitary cell lineages (14). To investigate the expression pattern of Ptx1, we performed northern blot analysis on RNA obtained from a panel of cell lines. As shown in Fig. 2-1, a single Ptx1 RNA band of about 2.5 kb was revealed in AtT-20 cells, a corticotrope cell line that expresses POMC and from which we had cloned Ptx1 (14). Ptx1 mRNA was also detected in several pituitary-derived cell lines including  $\alpha$ T3-1 (gonadotrope precursor),  $\alpha$ TSH (thyrotrope precursor), GHFT1.5 (somatolactotrope precursor), GH<sub>3</sub> and GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> (somatolactotropes), as well as in the thyrotrope tumor TtT-97 and in adult mouse pituitary (mPit). Interestingly, Ptx1 mRNA levels

were much higher in  $\alpha$ T3-1,  $\alpha$ TSH and GHFT1.5 than in AtT-20 cells. These results confirm the presence of Ptx1 mRNA in cells other than corticotropes.

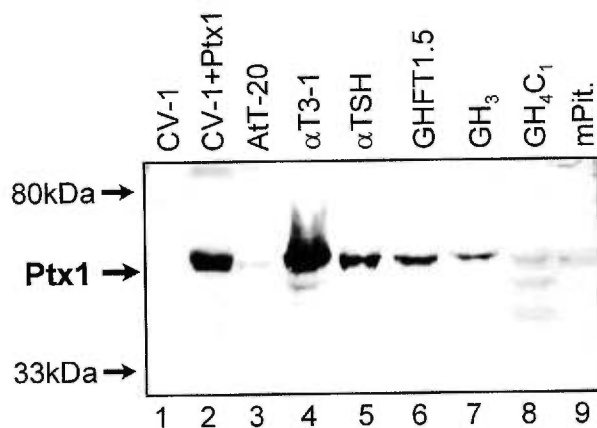


**Fig. 2-1.** Ptx1 and Ptx2, but Not Ptx3, Are Expressed in Several Pituitary-Derived Cell Lines.

Northern blot analysis of 20  $\mu$ g total RNA from multiple pituitary-derived cell lines and mouse pituitary was used to determine the expression pattern of the three Ptx family members. The blots were subsequently probed with an 18S ribosomal RNA probe to insure integrity and loading of the RNA. Note the difference in exposure time for the three blots.

Two Ptx1-related cDNAs have been identified recently: they are Ptx2 (RIEG) (16-18), hereafter referred to as Ptx2, and Ptx3 (35). Ptx2 was shown to be expressed in the pituitary by RT-PCR and *in situ* hybridization (16, 18). However, no data are presently available concerning its expression relative to Ptx1. Thus, we compared the expression of Ptx1, 2 and 3 in pituitary-derived cell lines by northern blot analysis using gene-specific probes. As shown in Fig. 2-1, the Ptx1 and Ptx2 genes are abundantly transcribed in pituitary cells whereas Ptx3 is not. In some cell lines, such as AtT-20,  $\alpha$ T3-1, and GHFT1.5, Ptx1 is the major mRNA species whereas in others such as GC and MMQ, Ptx2 mRNA predominates (Fig. 2-1).

The presence of Ptx1 mRNA does not necessarily imply synthesis of Ptx1 protein, as for example Pit1 mRNA is detectable in more pituitary cells than those that express the protein (3, 27). To determine whether Ptx1 protein was present in all pituitary-derived cell lines, we performed western blot analysis with a specific antiserum raised against Ptx1 amino acids 24-56. As shown in Fig. 2-2, all cell lines tested, as well as the adult mouse pituitary, contain Ptx1 protein. Overall, there is a good correlation between the level of mRNA and amount of protein (Figs. 2-1 and 2-2), although some discrepancies are noted and discussed below.



**Fig. 2-2.** The Ptx1 Protein Is Present in Several Pituitary-Derived Cell Lines.

The level of Ptx1 protein was assessed by western blot analysis. Aliquots of 40  $\mu$ g whole cell extracts (overexpressing cells, lane 2) or 80  $\mu$ g nuclear extracts (cell lines and adult mouse pituitary) were subjected to immunoblotting using a Ptx1-specific antiserum as described in *Materials and Methods*. Protein molecular size standards are indicated on the *left*.

### Ptx1 Activates Several Pituitary-Specific Promoters

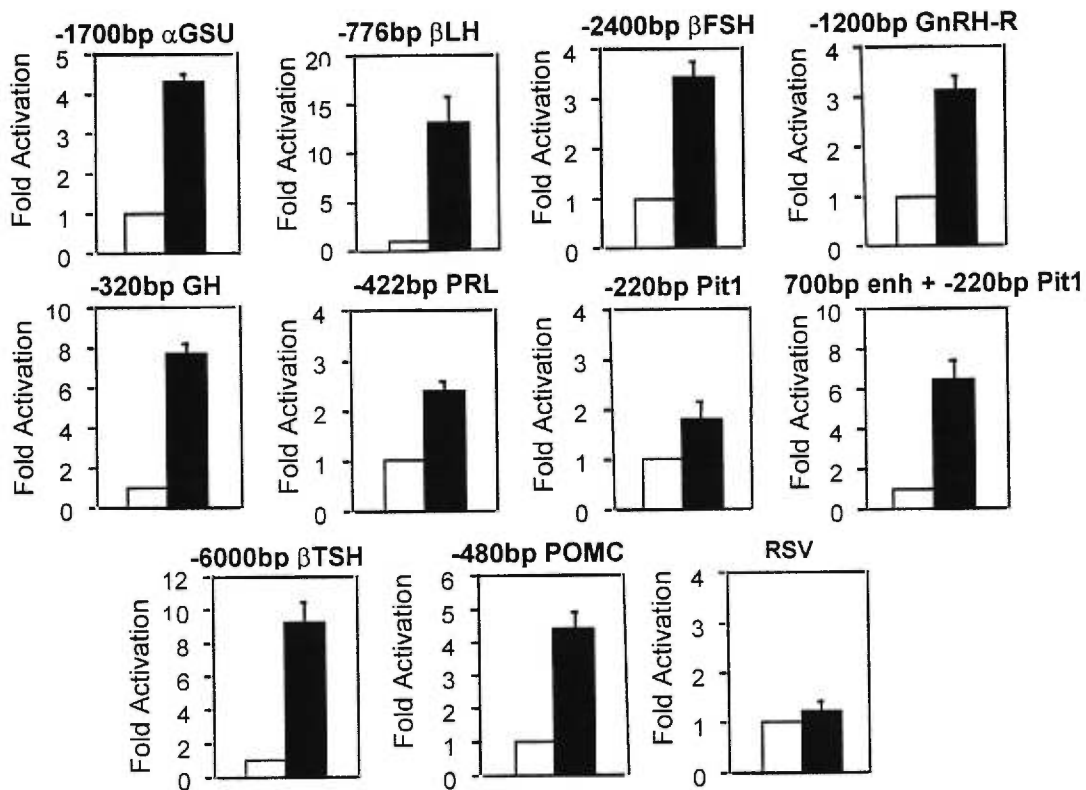
We previously showed that Ptx1 is an important determinant for expression of the POMC gene in AtT-20 cells (14). Ptx1 may play a similar role for other pituitary genes. As shown in Table 2-1, several pituitary-specific promoters or enhancers contain at least one putative Ptx1 binding site. These sites were identified by comparison to the Ptx1-binding site of the CE3 element of the POMC promoter and by comparison to binding studies with *bicoid*-related homeoproteins (36-38). To test the ability of Ptx1 to activate pituitary-specific promoters, a Ptx1 expression vector was transfected along with various

**Table 2-1. Putative Ptx1 Binding Sites Present in Pituitary-Specific Promoters**

Consensus		TAATCC CT G T C		
Rat POMC	-302	TAAGCC		m,r,h
Mouse $\alpha$ GSU	-1620	TAAGCT		m
	-1485	TAATCC		m
	-605	TAATCC	Rev	m
	-389	TAATCC		m
	-368	TTATCC		m
	-220	TAAGCT		m,r,b,h
	-70	TAAGCT	Rev	m;r,h=TAAGCC, b
Bovine $\beta$ LH	-628	TAAGCT	Rev	b,s,p
	-233	CAATCC	Rev	b,s,p
	-92	TAATCT	Rev	b,s,p;h=TAATCC
Bovine $\beta$ FSH	-1534	TTATCC	Rev	b,
	-1513	TTATCC		b,s
	-1437	CAATCC		b,s
	-1426	TAATCT		b,s
	-1409	TAAGCC	Rev	b,s
	-1233	TTATCC		b,s
	-1209	TAATCC		b,s
	-1197	TCATCC		b,s=TTATCC
	-1165	TCATCC		b,s
	-710	TAATCC	Rev	b,s
Mouse $\beta$ TSH	-216	TAATCT		b,s
	-52	TAAACC	Rev	b,s
	-42	TTATCC		m,r,h
Rat GH	-217	TAAACC		m,r,h,p,b
	-124	TTATCC		m,r,h,b,p
Rat PRL	-27	TAAACC	Rev	r,h,b
Rat Pit1 Promoter		none		
Mouse Pit1 Enhancer (700bp)	94	TAATCT		m,f
	99	TAATCC		m;r=TAATCT
	616	TAATCT		m,r,h
Mouse GnRH-R	-1425	CAATCC		m
	-939	TAAACC		m
	-846	TAATCT		m
	-702	TAATCC	Rev	m
	-253	TCATCC	Rev	m
	-105	TAATCT	Rev	m
Mouse SF-1		none		

These sites (summarized under Consensus) were identified by comparison with the Ptx1-binding site of the POMC promoter (14) and according to DNA-binding studies performed using *bicoid*-related homeoproteins (36-38). Searches were performed on -480 bp POMC, -1.7 kb  $\alpha$ GSU, -776 bp  $\beta$ LH, -2.4 kb  $\beta$ FSH, -1.2 kb  $\beta$ TSH, -320 bp GH, -422 bp PRL, -220 bp Pit1, 700 bp Pit1 enhancer, -1.5 kb GnRH-R, -733 bp SF-1. Promoter sequences for Lim3/Lhx3, LH-2 and Six3 were not available in the database. Sites conserved among species are indicated in the left column: r, rat, m, mouse, h, human, b, bovine, s, sheep, p, pig. *Strikethrough letters* mean that the site is not conserved in that species. Sites present in reverse orientation are indicated (Rev).

reporter constructs in CV-1 cells. As shown in Fig. 2-3, Ptx1 significantly activates several pituitary promoters, including those for  $\alpha$ GSU and the beta subunits of LH ( $\beta$ LH), FSH ( $\beta$ FSH) and TSH ( $\beta$ TSH), GnRH receptor (GnRH-R), GH, the Pit1 enhancer but not its promoter, as well as the POMC promoter (14). The rous sarcoma virus (RSV) promoter, which was used as a negative control, was not activated by Ptx1. Similarly, the thymidine kinase promoter was insensitive to Ptx1 (data not shown).



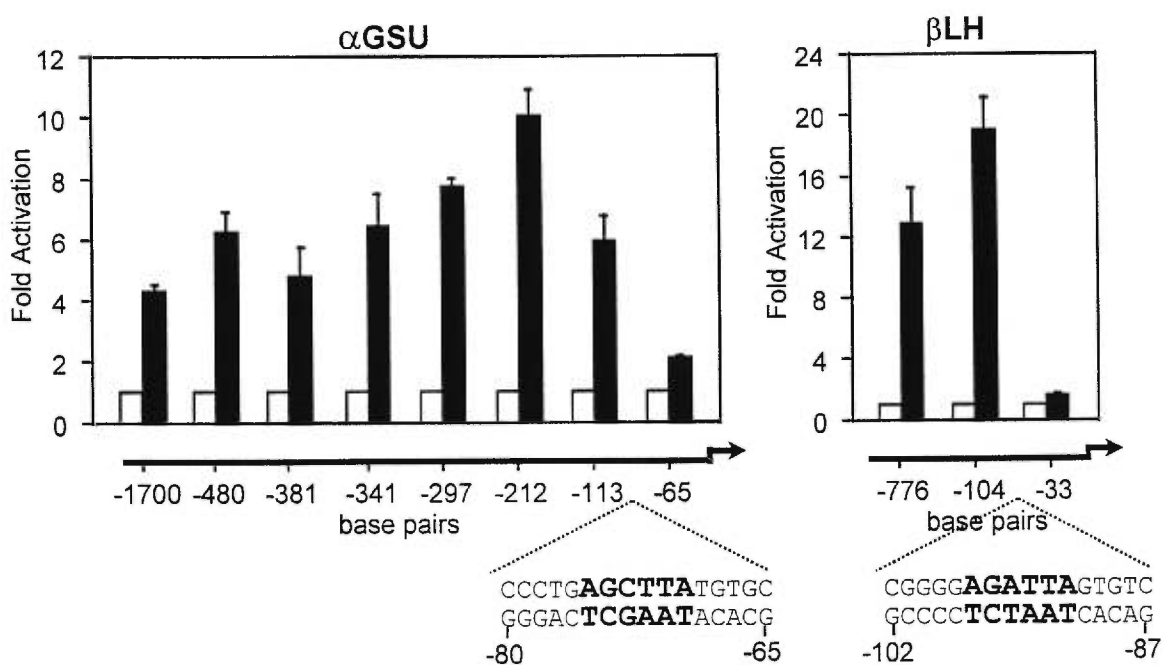
**Fig. 2-3.** Ptx1 Transactivates Several Pituitary-Specific Promoters.

The effect of Ptx1 was tested on various pituitary promoters including -1700 bp  $\alpha$ GSU, -776 bp  $\beta$ LH, -2400 bp  $\beta$ FSH, -1200 bp GnRH-R, -320 bp GH, -422 bp PRL, -220 bp Pit1, -220 bp Pit1+700 bp enhancer, -6000 bp  $\beta$ TSH and -480 bp POMC. Each construct was cotransfected in CV-1 cells with a control plasmid (empty RSV expression vector, *open bars*) or a RSV-Ptx1 expression (14) vector (*solid bars*). A viral promoter, RSV, was used as negative control. Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM).



### Mapping of Ptx1-Responsive Elements in the $\alpha$ GSU and $\beta$ LH Promoters

In view of the large effect of Ptx1 on the  $\alpha$ GSU and  $\beta$ LH promoters and of its high expression in  $\alpha$ GSU cells (Fig. 2-2 and below), we performed deletion analyses on the  $\alpha$ GSU as well as on the  $\beta$ LH promoters in order to identify Ptx1-responsive sequences. As shown in Table 2-1, the  $\alpha$ GSU and  $\beta$ LH promoters contain several putative Ptx1-binding sites. A short (-120 bp)  $\alpha$ GSU promoter that contains only one putative Ptx1-binding site was still activated by Ptx1, whereas a deletion to -65 bp, that removes this site, was no longer significantly activated (Fig. 2-4). Similar results were obtained with the  $\beta$ LH promoter (Fig. 2-4) where removal of the most proximal putative Ptx1-binding site led to a loss of Ptx1 activation (Fig. 2-4). Taken together, these data suggest that



**Fig. 2-4.** Mapping of Ptx1-Responsive Elements in the  $\alpha$ GSU and  $\beta$ LH Promoters.

CV-1 cells were cotransfected with various 5'-deletion constructs of the  $\alpha$ GSU (*left panel*) and  $\beta$ LH (*right panel*) promoters with either a control vector (*open bars*) or a Ptx1 expression vector (*solid bars*). Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM). The sequence of the putative Ptx1-responsive element is shown *under the graph* for each promoter.

transactivation of both the  $\alpha$ GSU and  $\beta$ LH promoters by Ptx1 is likely to be mediated by the most proximal Ptx1-binding site. These sites are conserved across many species (Table 2-1). We cannot exclude the possibility that more distal sites may also contribute to promoter activity in an *in vivo* context or in association with other transcription factors.

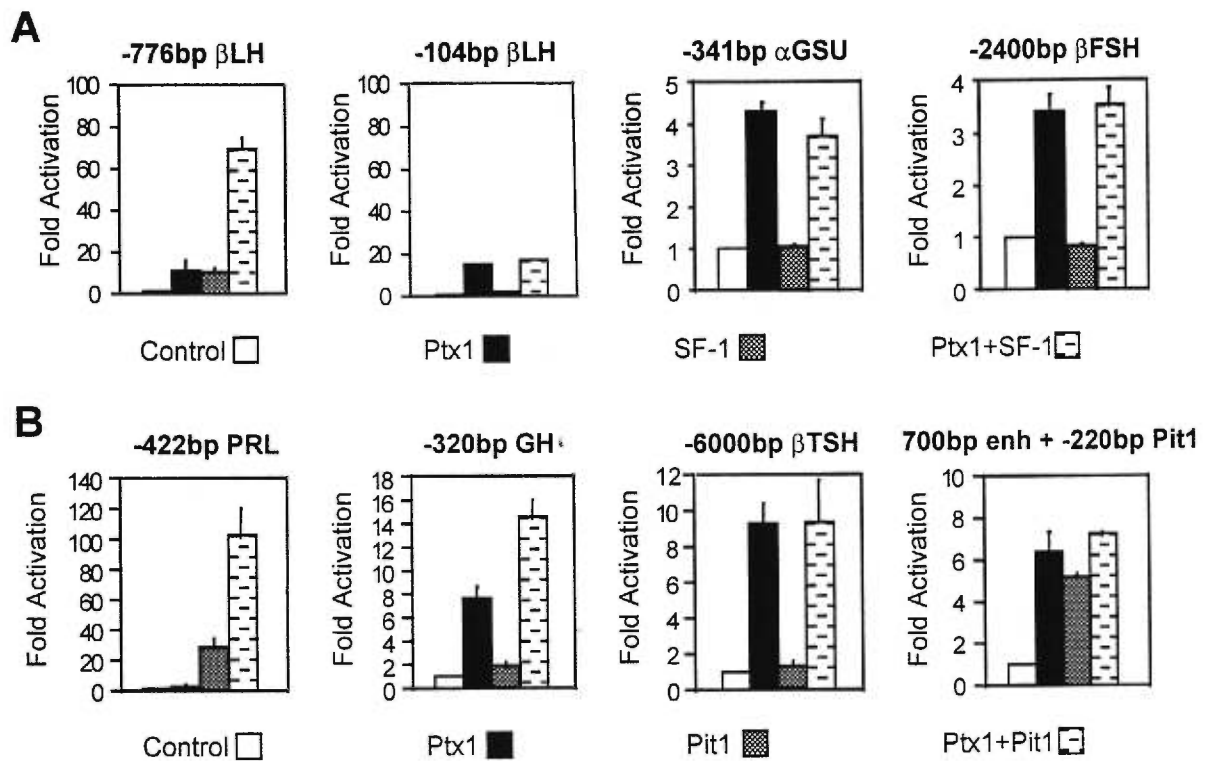
### **Ptx1 Acts in Synergy with SF-1 and Pit1**

To define the role of Ptx1 in lineage- and/or promoter-specific expression, we tested its ability to stimulate promoter activity in synergy with cell-type restricted transcription factors. Consistent with this hypothesis, we have shown that Ptx1 specifically synergizes with basic helix-loop-helix (bHLH) heterodimers containing NeuroD1 for activation of POMC transcription (39).

Previous studies have reported the role of the orphan nuclear receptor SF-1 in activation of the  $\beta$ LH promoter (40, 41). In the pituitary, this nuclear receptor is only expressed in gonadotrope cells (Refs. 42 and 43 and data not shown). As shown in Fig. 2-5A, SF-1 and Ptx1 can each individually activate the  $\beta$ LH promoter. Coexpression of both factors resulted in a strong synergistic activation of the  $\beta$ LH (-776 bp) promoter (Fig. 2-5A). The SF-1/Ptx1 synergism was lost when the SF-1-binding site (located at -120 bp) was deleted from the promoter as in the -104 bp  $\beta$ LH promoter construct (Fig. 2-5A); the SF-1- and Ptx1-binding sites are 20 bp apart in the promoter. It was also suggested that SF-1 might be implicated in expression of the  $\alpha$ GSU and  $\beta$ FSH genes (42, 44) and Ptx1 can activate both promoters (Fig. 2-3). No synergy, however, was observed between Ptx1 and SF-1 on these two promoters (Fig. 2-5A). The combination of Ptx1, SF-1 and Lim3/Lhx3 did not result in a stronger synergy on the  $\beta$ LH promoter (data not shown).

Ptx1 can also synergistically activate transcription with another cell-specific factor, Pit1 (45). The PRL promoter, which was only slightly activated by Ptx1 (Fig. 2-3),

can be synergistically activated by Ptx1 and Pit1 (Fig. 2-5B). The same was true for the GH promoter although to a lesser extent (Fig. 2-5B). This interaction between Ptx1 and Pit1 was not observed on all Pit1-dependent promoters since the  $\beta$ TSH promoter and Pit1 promoter/enhancer were not synergistically activated by the two factors (Fig. 2-5B). Taken together, these results indicate that Ptx1 exerts promoter-specific effects by synergism with cell type-restricted transcription factors.

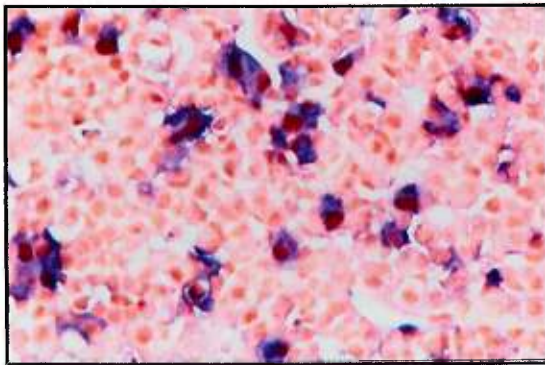


**Fig. 2-5.** Ptx1 Can Synergise with SF-1 and Pit1.

A, Synergistic transactivation by Ptx1 and SF-1. The effect of Ptx1 and SF-1 alone or in combination was tested on the -776 bp and -104 bp  $\beta$ LH, -2400 bp  $\beta$ FSH and -341 bp  $\alpha$ GSU promoters. The -104 bp  $\beta$ LH promoter no longer contains the SF-1-binding site present at -120 bp (40, 41). B, Ptx1 synergises with Pit1. Transactivation by either Ptx1, Pit1, or both was tested on four Pit1-dependent promoters: -422 bp PRL, -320 bp GH, -6000 bp  $\beta$ TSH and the Pit1 promoter/enhancer. Promoter constructs were cotransfected with the indicated expression plasmids in CV-1 cells. Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM).

### Ptx1 Protein Is Expressed at High Level in $\alpha$ GSU-Expressing Cells

To correlate Ptx1 expression in cell lines derived from various pituitary lineages (Figs. 2-1 and 2-2) with normal pituitary cells, we used double-labeling immunohistochemistry to analyze Ptx1 expression in the adult pituitary gland. As shown in Fig. 2-6, the Ptx1 protein can be detected in the nuclei of all pituitary cells. The nuclear signal was not detected with pre-immune serum, and it was competed by addition of maltose-binding protein (MBP)-Ptx1 but not with MBP- $\beta$ Gal (data not shown). Interestingly, all cells do not express Ptx1 at the same level, as was observed previously for Ptx1 mRNA (14). Many strongly positive cells for Ptx1 were identified as  $\alpha$ GSU-expressing cells by double-labeling immunohistochemistry (Fig. 2-6). This result correlates with expression in pituitary-derived cell lines (Fig. 2-2). In addition, high Ptx1 expression colocalized with  $\alpha$ GSU-expressing cells from the onset of  $\alpha$ GSU expression during pituitary development (C. Lanctôt and J. Drouin, in preparation).



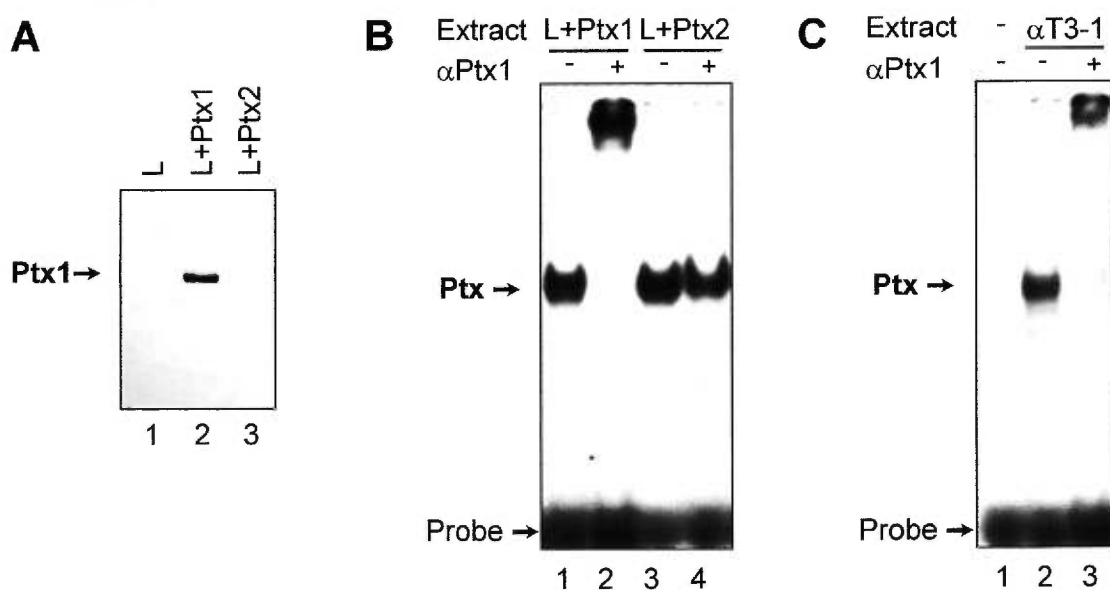
**Fig. 2-6.** Ptx1 Is Strongly Expressed in  $\alpha$ GSU-Expressing Cells.

Immunohistochemistry was used to detect  $\alpha$ GSU and Ptx1 expression in adult mouse pituitary. To detect  $\alpha$ GSU positive cells (*blue* cytoplasm), a monoclonal antibody coupled with an alkaline phosphatase reaction was used while Ptx1-expressing cells (*brown* nuclear staining) were detected with a Ptx1 polyclonal affinity-purified antiserum and peroxidase-coupled anti-rabbit IgG.

### Ptx1 Is the Major Ptx Protein Expressed in $\alpha$ GSU-Expressing $\alpha$ T3-1 Cells

As shown in the present study (Figs. 2-2 and 2-6),  $\alpha$ T3-1 cells as well as mouse pituitary  $\alpha$ GSU-positive cells contain high levels of Ptx1 protein. Ptx2 mRNA was also detected

in the developing pituitary and in some pituitary-derived cell lines including  $\alpha$ T3-1 cells (Fig. 2-1 and Ref. 16). We do not yet know whether these cells contain Ptx2 protein. To determine the relative importance of Ptx1 protein in  $\alpha$ T3-1 cells, we performed supershift experiments using nuclear extracts from  $\alpha$ T3-1 cells. The Ptx1 antibody used in our experiments (Fig. 2-2) is specific for Ptx1 since it did not recognize Ptx2 in western blot (Fig. 2-7A, lane 3) or in gel shift assays (Fig. 2-7B, lane 4). The Ptx-binding activity present in  $\alpha$ T3-1 nuclear extracts (Fig. 2-7C, lane 2) was almost completely supershifted by saturating amounts of the Ptx1-specific antibody (Fig. 2-7C, lane 3). Taken together, these data clearly demonstrate that Ptx1 is by far the most abundant member of the Ptx family in  $\alpha$ T3-1 cells.

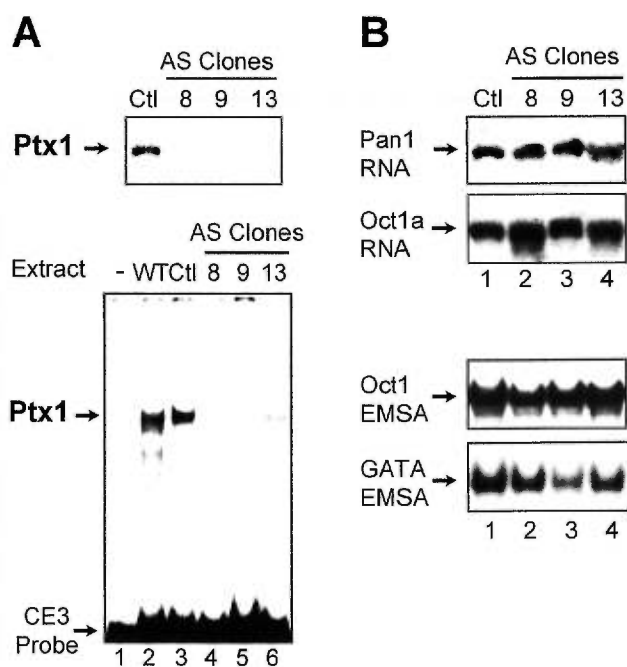


**Fig. 2-7.**  $\alpha$ T3-1 Cells Contain Almost Exclusively Ptx1.

A, Western blot analysis of extracts from L cells overexpressing Ptx1 or Ptx2 using a Ptx1-directed antiserum. B, Gel retardation assay using the CE3 element of the POMC gene (14) as probe and extracts from L cells transfected with either Ptx1 or Ptx2. A supershift is only observed with the Ptx1-binding activity when using a Ptx1-specific antibody ( $\alpha$ Ptx1). C, Gel retardation assay using the CE3 element as probe and extracts from  $\alpha$ T3-1 cells. The binding activity is almost completely supershifted by the Ptx1-specific antiserum.

### Ptx1 Is Essential for $\alpha$ GSU and Lim3/Lhx3 Gene Expression

$\alpha$ T3-1 cells have been considered as a model of gonadotrope precursors because they express the  $\alpha$ GSU and GnRH-R genes but none of the  $\beta$ -subunit genes (46). This cell line contains the highest level of Ptx1 mRNA and protein (Figs. 2-1, 2-2 and 2-7). Moreover, Ptx1 strongly activated the  $\alpha$ GSU promoter (Figs. 2-4 and 2-5). To further confirm the role of Ptx1 in  $\alpha$ GSU gene expression, we generated Ptx1 knockdown cell lines by stably transfecting a Ptx1 antisense RNA expression vector in  $\alpha$ T3-1 cells. Three independent neomycin-resistant clones expressing the Ptx1 antisense RNA were analyzed. As control, clones stably transfected with the same vector without the Ptx1 cDNA (empty vector) were generated and one was chosen as negative control (cloneCtl)



**Fig. 2-8.** Endogenous Ptx1 Activity Is Decreased in Ptx1 Antisense Clones.

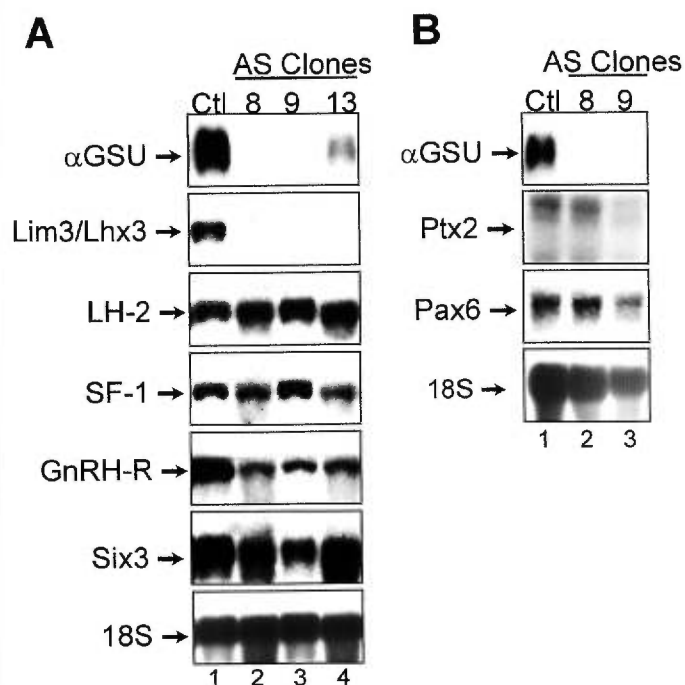
$\alpha$ T3-1 cells were stably transfected with a Ptx1 antisense RNA expression vector as described in *Materials and Methods*. A, Levels of Ptx1 mRNA (*upper panel*) and protein (*lower panel*) in wild-type  $\alpha$ T3-1 cells (WT), one control clone (Ctl), and three independent antisense clones (8,9 and 13) were monitored by northern blot analysis and gel retardation assay, respectively. B, Other transcription factors are not affected in the Ptx1 antisense clones. The northern blot

used in A was successively rehybridized with Pan1 and Oct1a probes (*upper panel*) and the quality of the nuclear extracts was tested by gel retardation assay for Oct1- and GATA-binding activity (*lower panel*).

along with the wild-type  $\alpha$ T3-1 cells (WT). In the three Ptx1 antisense clones (8, 9 and 13), endogenous Ptx1 mRNA (Fig. 2-8A, *upper panel*) and protein as assessed by DNA-binding assay (Fig. 2-8A, *lower panel*) were markedly decreased, whereas other transcription factors such as Pan1 and Oct1 were not significantly affected, neither at the mRNA (Fig. 2-8B, *upper panel*) nor at the protein (DNA binding in electrophoretic mobility shift assay) levels (Fig. 2-8B, *lower panel*). GATA DNA-binding activity might be slightly decreased (Fig. 2-8B). The fact that Ptx DNA-binding activity was almost undetectable in the antisense clones (Fig. 2-8A) also suggests that the Ptx2 gene product was not up-regulated in response to the decrease in Ptx1. These Ptx1 null cell lines were then used to analyze the level of  $\alpha$ GSU gene expression. As shown in Fig. 2-9A (*top panel*), no or little  $\alpha$ GSU mRNA was detected in the antisense clones. This clearly indicates that the endogenous  $\alpha$ GSU gene was almost silent in these cells. Further, the activity of a transfected  $\alpha$ GSU-luciferase reporter is considerably lower in the antisense clones than in control cells (data not shown). Thus, Ptx1 is essential for  $\alpha$ GSU gene expression.

Using the Ptx1 knockdown cell lines, we investigated expression of other genes normally expressed in  $\alpha$ T3-1 cells. The GnRH-R, another differentiation marker of the gonadotrope lineage, was also decreased in these cells although much less so than  $\alpha$ GSU. There might be a very small decrease of Six3 mRNA levels in the antisense clones compared with the control, but the fold reduction was even less than for the GnRH-R. The gonadotrope-restricted transcription factor SF-1 and the lim factor LH-2 were not affected in the Ptx1-antisense clones (Fig. 2-9A). Similarly, neither the low-level Ptx2 expression nor Pax6 (47) mRNA levels were altered in the antisense clones (Fig. 2-9B). These data do not support any cross-regulation between Ptx1 and Ptx2 gene expression. The Rathke's pouch marker Rpx was not detected in the antisense or





**Fig. 2-9.** Ptx1 Knockdown Cells Fail to Express the  $\alpha$ GSU and Lim3/Lhx3 Genes.

A, Northern blot analysis of several genes normally expressed in  $\alpha$ T3-1 cells using RNA from the control clone (Ctl) and three independent Ptx1-antisense clones (8, 9 and 13). Blots were successively hybridized with probes for  $\alpha$ GSU, Lim3/Lhx3, LH-2, SF-1, GnRH-R and Six3. A ribosomal 18S RNA probe was used to verify RNA loading. B, Similar blot hybridized with  $\alpha$ GSU, Ptx2, Pax6, and 18S RNA probes.

control cells (data not shown). Strikingly, the Lim3/Lhx3 mRNA was basically undetectable in the antisense clones, suggesting that, as for the  $\alpha$ GSU gene, Ptx1 is essential for Lim3/Lhx3 gene expression. These experiments clearly indicate an essential role of Ptx1 in control of Lim3/Lhx3 transcription and place Ptx1 upstream of Lim3/Lhx3 in the regulatory cascade for pituitary development (Fig. 2-10).

## DISCUSSION

The present work supports the model that Ptx1 is a pan-pituitary regulator of transcription and that it contributes to promoter-specific transcription by synergism with cell-restricted factors such as NeuroD1, SF-1, and Pit1. This broad regulatory function is consistent with the early activation of Ptx1 in the stomodeum, the ectodermal epithelium from which Rathke's pouch develops. Further, Ptx1 appears to be an upstream regulator in a cascade of transcription factors that control pituitary-specific transcription.



Indeed, Ptx1 is required for Lim3/Lhx3 gene expression in at least one pituitary cell model. This regulatory hierarchy may also operate *in vivo* during pituitary organogenesis.

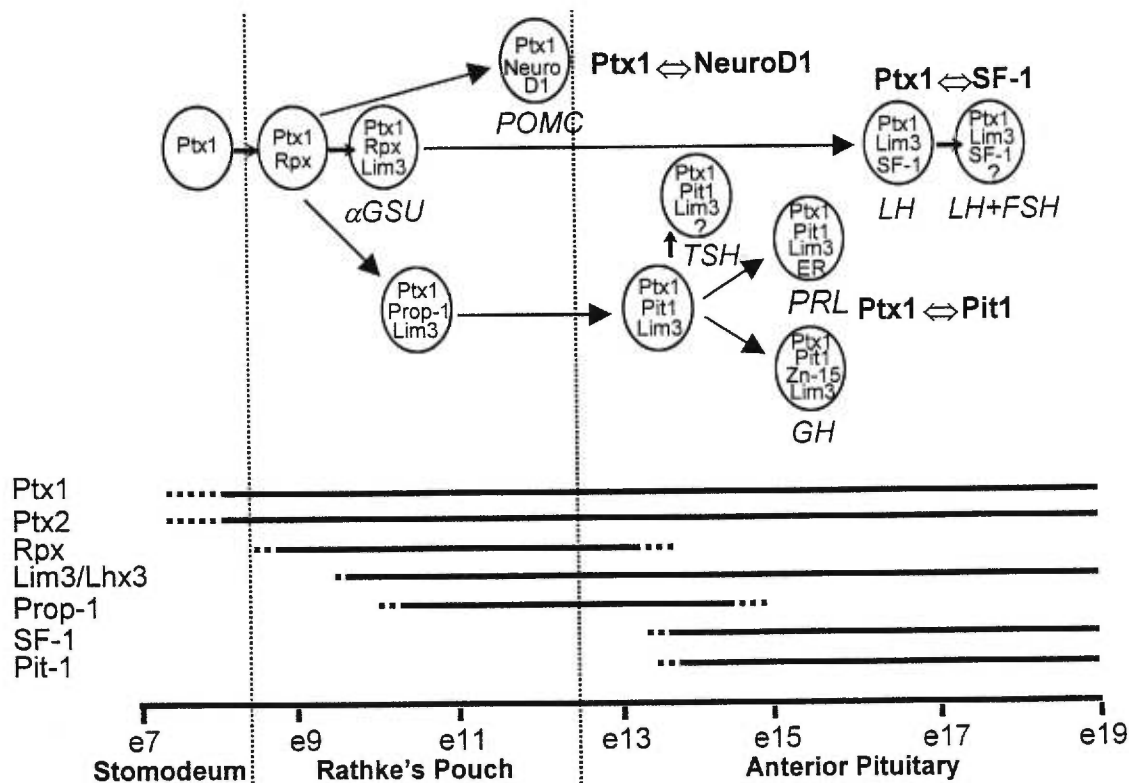
### **Differential Expression of Ptx1 and Ptx2 in Pituitary Lineages**

The Ptx1 and Ptx2 genes have an overlapping pattern of expression in the stomodeum and in some of its derivatives with differences of expression in craniofacial mesenchyme (15, 17, 18). Both are also expressed in the pituitary primordium, Rathke's pouch, and we have shown in the present work that both are expressed in the adult mouse pituitary gland as well as in a panel of pituitary-derived cell lines. Taken together, these lines are representative of many pituitary lineages captured at specific moments of their differentiation pathway (48). We have shown that all these cell lines but one, the POMC-expressing AtT-20 cell, expressed both Ptx1 and Ptx2 mRNA (Figs. 2-1 and 2-2). Although, in general, there is good correlation between Ptx1 mRNA and protein levels, one exception is GHFT1.5 cells in which Ptx1 mRNA levels are similar to those of  $\alpha$ T3-1 cells, whereas protein levels are much lower (compare Figs. 2-1 and 2-2). Another discrepancy may exist in  $\alpha$ T3-1 cells that have both Ptx1 and Ptx2 mRNA but the bulk of Ptx protein appears to be Ptx1 (Fig. 2-7). The remainder of the Ptx-related DNA-binding activity in those cells may be a N-terminal variant of Ptx1, Ptx1b, that is not recognized by the antiserum used in these experiments (J. J. Tremblay and J. Drouin, in preparation). This discrepancy in mRNA and protein levels may be explained by posttranscriptional regulation. At present, we do not know of any other Ptx family member expressed in the pituitary and, as shown, the Ptx3 gene (35), which has an almost identical homeodomain, is not expressed in this tissue (Fig. 2-1 and data not

shown). Thus, Ptx1 appears to be the only Ptx family member expressed in corticotropes and the predominant one in gonadotropes.

### A pan-Pituitary Regulator of Transcription

As a marker of the stomodeum (15), the most anterior segment of the body plan, Ptx1 may be recruited as a tissue-specific regulator of transcription in many epithelial derivatives of the stomodeum, as has been shown in the present work for the pituitary. This recruitment would be consistent with a combinatorial model for cell-specific gene expression (Fig. 2-10) in which genes encoding transcription factors are activated at



**Fig. 2-10.** Regulatory Factors during Pituitary Development.

Summary of expression patterns for transcription factors involved in pituitary gene expression and development. *Top*, Representation of putative cellular intermediates during pituitary differentiation indicating transcription factors expressed at each stage. For terminally differentiated cells, factors shown previously or in the present work to activate transcription synergistically with Ptx1 are shown in *bold*. *Bottom*, Timing of onset and extinction (where appropriate) for pituitary transcription factors. References for the data are provided in the text.

specific times and places during development to control organogenesis, cell differentiation, and gene transcription. All the pituitary-specific promoters found to be activated by Ptx1 in the present work (Fig. 2-3) have putative Ptx1-binding sites (Table 2-1) except the Pit1 gene, which does not have a site in its promoter but does in its enhancer. Only one Ptx1-binding site appears to be necessary for transcriptional activation as we have shown for POMC (14),  $\beta$ TSH (Table 2-1 and Fig. 2-3),  $\beta$ LH and  $\alpha$ GSU (Fig. 2-4). These sites appear to bind Ptx1 monomers (14), and their sequence is consistent with the documented DNA-binding specificity of *bicoid*-related homeoproteins (36-38).

Despite their great conservation in DNA-binding specificity, the various *bicoid*-related homeoproteins have different transcriptional properties (35). The homeobox transcription factors most closely related to Ptx1 are the Otx1 and Otx2, which are specifically expressed in the brain (49), but not at all in the pituitary (Otx2) or at very low levels postnatally (Otx1) (D. Acampora, S. Mazan, F. Tuorto, V. Avantaggiato, J. J. Tremblay, D. Lazzaro, A. di Carlo, A. Mariano, P. E. Macchia, V. Macchia, J. Drouin, P. Brûlet and A. Simeone, in preparation). In striking contrast to Ptx1, Otx1 has no effect on POMC and it does not synergize with SF-1 on the  $\beta$ LH promoter (data not shown). Thus, in addition to their complementary expression patterns during development of head structures, the ability of these homeobox factors to synergize with specific partners for control of transcription may account for the specificity of their roles during development.

### **Promoter-Specific Synergism**

While Ptx1 may contribute to mechanisms for pituitary-specific transcription as we had originally showed for POMC (14), it is clearly not the sole determinant for lineage-specific transcription of either POMC or any other pituitary hormone-coding gene. For

this reason, the transcriptional interaction with other transcription factors for cell-specific activity is of great significance. Prior work has shown the importance of the bHLH factor NeuroD1 for corticotrope-specific transcription of POMC (39, 50), thus defining one partner of Ptx1 in a code for cell- and promoter-specific control of transcription. Another Ptx1 partner is Pit1, which specifically acts in synergy with Ptx1 to stimulate PRL gene expression, and less so on the GH promoter (Fig. 2-5 and Ref. 45).

The current work has extended the model by showing marked synergism between Ptx1 and SF-1, an orphan nuclear receptor transcription factor (Fig. 2-5) This synergism is specifically exerted on the  $\beta$ LH promoter but not on the promoters of other genes specific to the gonadotrope lineage such as  $\alpha$ GSU,  $\beta$ FSH or GnRH-R (Fig. 2-5 and data not shown). Both  $\beta$ LH (40, 41) and  $\alpha$ GSU (44) promoters contain SF-1-binding sites. The SF-1 binding site of the  $\beta$ LH promoter was shown to be essential for promoter activity (Refs. 40 and 41 and Fig. 2-5) but less data support the role of SF-1 in  $\alpha$ GSU promoter activity. The only supporting data rested on the activity of oligomerized synthetic  $\alpha$ GSU SF-1-binding sites inserted upstream of the thymidine kinase promoter (44). Inactivation of the SF-1 gene also suggested a predominant role in  $\beta$ LH expression. Indeed, both  $\beta$ LH and  $\beta$ FSH transcripts were undetectable in SF-1<sup>-/-</sup> mice while  $\alpha$ GSU transcripts were only decreased (42), and expression of both  $\beta$ -subunits genes was restored by injection of GnRH (51). However, in their discussion, Ikeda *et al.* indicate that one third of the SF-1<sup>-/-</sup> mice had detectable  $\beta$ FSH mRNA by *in situ* hybridization but never  $\beta$ LH or GnRH-R, and they suggested that transcription of  $\beta$ FSH may be under more indirect SF-1 control than  $\beta$ LH (51). Our observation (Fig. 2-5) of SF-1 synergism on the  $\beta$ LH, but not on the  $\beta$ FSH, promoter is entirely consistent with their hypothesis. It is noteworthy that  $\alpha$ T3-1 cells which express Ptx1 and SF-1 (Fig. 2-9) do not express the  $\beta$ LH gene (46): it is therefore likely that other factor(s) are

involved in further differentiation of the gonadotrope lineage and activation or derepression of the  $\beta$ LH gene.

The *drosophila* homolog of SF-1, Ftz-F1, was recently shown to interact directly with an homeodomain transcription factor, fushi tarazu (Ftz) to activate transcription synergistically (52, 53). Our observations (Fig. 2-5) constitute the first example of similar synergism between a mammalian nuclear receptor and a homeobox factor. The domain of Ftz that interacts with Ftz-F1 (53) is not conserved in Ptx1 such that it is not possible, at the molecular level, to extend the comparison with the synergism between Ptx1 and SF-1. Nonetheless, it appears that synergism between these classes of transcription factor may be a conserved mechanism for tissue specificity during development.

The promoter-specific action of factors that synergize with Ptx1 correlates with their cell-restricted pattern of expression. Indeed, NeuroD1 appears to be predominantly expressed in corticotrope cells (39). Pit1 is expressed in GH, PRL and TSH cells and its synergism with Ptx1 is observed on the PRL and less so on the GH promoters. Similarly, SF-1 is specifically expressed in the gonadotrope lineage (42, 43) and its Ptx1 synergism is restricted to only one promoter which is specific to this lineage. Taken together, these data are consistent with a model in which progressive differentiation of the different pituitary lineages is accomplished by the sequential activation of regulatory genes during organogenesis (Fig. 2-10).

### **Regulatory Cascade during Pituitary Development**

The hierarchy of action of different factors involved in pituitary development could be inferred from the timing of their initial expression during development. As summarized in Fig. 2-10, Ptx1 appears to be the earliest factor in this cascade as it is already expressed in the stomodeum prior to Rathke's pouch development (15). It is followed by Rpx at the early pouch stage (19) and by Lim3/Lhx3 soon after (22, 23). As Rpx is

expressed transiently in the pituitary, it may be involved in activation of downstream genes but certainly not in their maintenance (19, 24). In contrast, Ptx1 and Lim3/Lhx3 expression is maintained throughout development, in adult pituitary and in pituitary-derived cell lines. The availability of these cells has allowed us to demonstrate a strict dependence on Ptx1 for Lim3/Lhx3 expression (Fig. 2-9) in at least one cellular model: this contrasts with other regulators of the gonadotrope function like LH-2 and SF-1. If extrapolated to development *in vivo*, this dependence would be consistent with a model in which activation of the Lim3/Lhx3 gene by Ptx1 is required for differentiation of all pituitary lineages, except for corticotropes, as indicated in Fig. 2-10. The absence of Lim3/Lhx3 expression in AtT-20 cells is consistent with this as is the presence of POMC-positive cells in the Lim3/Lhx3<sup>-/-</sup> mice (24).

The results of our knockdown experiments suggest that Ptx1 is essential for the sustained expression of Lim3/Lhx3 and  $\alpha$ GSU (Fig. 2-9A). Although Ptx1 directly activates the  $\alpha$ GSU promoter (Figs. 2-3 and 2-4), we cannot exclude that part of the Ptx1 knockdown effect on  $\alpha$ GSU might also be mediated through depletion of Lim3/Lhx3. Indeed, it was suggested that Lim3/Lhx3 might stimulate  $\alpha$ GSU promoter activity directly (22), but we have been unable to reproduce this finding (data not shown). Ptx1, and consequently Lim3/Lhx3, appear to be dispensable for expression of other gonadotrope marker genes such as SF-1 and, thus, not all gonadotrope-specific functions require the continued expression of Ptx1 and/or Lim3/Lhx3.

In summary, we have shown the importance of Ptx1 expression for the maintenance of cell-specific transcription in two pituitary lineages that either express Ptx1 exclusively (corticotropes) or predominantly (gonadotropes). Indeed, we have previously documented the importance of Ptx1 for POMC expression (14), and in the current work, we show the importance of Ptx1 for Lim3/Lhx3 and  $\alpha$ GSU expression (Fig.

2-9). Thus, Ptx1 may be the most upstream factor in the cascade of regulators for pituitary gene expression. Its recruitment for pituitary-specific transcription of most hormone-coding genes is consistent with this role. Towards the establishment of a lineage- and promoter-specific code for transcription, Ptx1 synergizes with cell-restricted factors such as NeuroD1 in corticotropes (POMC) (39), Pit1 in somatolactotropes (PRL, GH) (Fig. 2-5 and Ref. 45) and with SF-1 in gonadotropes ( $\beta$ LH, Fig. 2-5).

## MATERIALS AND METHODS

### RNA Extraction and Analysis

Total RNA was extracted by the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (54) and analyzed by northern blot analysis (55). Ten or twenty micrograms of RNA were separated by agarose-formaldehyde gel electrophoresis and then transferred to nylon membrane (Hybond-N, Amersham Canada, Oakville, Ontario, Canada). Membrane hybridizations with <sup>32</sup>P-labeled cDNA probes were done in 1 M NaCl, 1% SDS, 10% dextran sulfate and 200 µg/ml of denatured salmon sperm DNA at 65°C. Blots were washed under stringent conditions: 1X saline sodium citrate, 0.1% SDS for 30 min at 65°C and 0.1X saline sodium citrate, 0.1% SDS for 30 min at 65°C. DNA probes were cDNA fragments specific for Ptx1 (14), Six3 (56), Ptx2 (16), Rpx (19), Ptx3 (35), Pax6 (57), Pan1 (58), LH-2 (59), SF-1 (60), Lim3/Lhx3 (23), GnRH-R (61), Oct1a (62), and αGSU (63). As a loading control, all northern blots were stripped and rehybridized with a <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide (5'-ACGGTATCTGATCGTCTTCGAACC-3') specific for 18S ribosomal RNA.

### Nuclear Extracts and Gel Retardation Assays

Nuclear microextracts from cell lines used in the present study were prepared as described previously (50). Ptx1 gel retardation assays and supershift experiments were performed as outlined by Lamonerie *et al.* (14) whereas GATA gel retardation assays were done according to Grépin *et al.* (64).

### Cell Culture and Transfection Assays

Murine αT3-1, αTSH, AtT-20, GHFT1.5, MMQ (lactotropes), L, and rat GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>, GH<sub>3</sub>, GC (somatotropes), and African green monkey kidney CV-1 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum. CV-1 and L



cells were transfected by the calcium phosphate method as described previously (14).  $\alpha$ T3-1 cells were transfected using the LipofectAMINE Reagent, as described (65). Data are presented as the means  $\pm$  SEM of three to eight experiments each performed in duplicate.

For stably transfected  $\alpha$ T3-1 cells, the evening before transfection, cells were seeded at 400,000/90-mm petri dishes and transfected the next morning with 10  $\mu$ g of control vector (pCDNA3, InVitrogen, San Diego, CA) or antisense Ptx1 vector (containing the full-length Ptx1 cDNA in reverse orientation) mixed with 600  $\mu$ l of serum-free DMEM and added to a solution containing 27  $\mu$ l of LipofectAMINE Reagent and 600  $\mu$ l of serum-free DMEM, incubated for 30-45 min, and applied on cells for 5 h before rinsing with FCS-supplemented DMEM. Stable transfectants were selected 24 h later for resistance to neomycin (300  $\mu$ g/ml), and individual clones were picked and subsequently cultured in medium containing 50  $\mu$ g/ml neomycin.

### **Western Blot Analysis**

Thirty microgram whole cell extracts from transfected CV-1 cells and 60  $\mu$ g nuclear extracts from AtT-20,  $\alpha$ T3-1,  $\alpha$ TSH, GHFT1.5, GH<sub>3</sub>, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells and adult mouse pituitary were denatured before electrophoresis by boiling the samples for 3 min in loading buffer containing 1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 1%  $\beta$ -mercaptoethanol and 100 mM dithiothreitol. Samples were loaded on denaturing 12% polyacrylamide gel containing 0,1% SDS. The gel was migrated at 200 V for 75 min at room temperature using the Bio-Rad Mini-Protean II electrophoresis apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA). Proteins were transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Amersham Canada) by electroblotting at 100 mA for 2 h at 4°C in transfer buffer [25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% methanol (vol/vol), pH 8.4] using the Bio-Rad Mini Trans-Blot apparatus. Polyvinylidene fluoride membranes were blocked for 16 h at 4°C and then for 30 min at room temperature in 20 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl (wt/vol) (TBS) and 15% powdered milk

(wt/vol). Membranes were incubated in TBS containing 0.2% Tween-20 (vol/vol) (TBST) and 5% powdered milk (wt/vol) and a 1:20 dilution of an affinity-purified Ptx1-specific antiserum for 90 min at RT. The rabbit antiserum was raised against a MBP-Ptx1 fusion protein containing amino acids 24-56 of Ptx1. After the incubation, membranes were washed three times for 5 min each in TBST at room temperature and then incubated for 1 h at room temperature in TBST containing a 1:2000 dilution of a biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Meanwhile, an avidin-biotin complex was prepared using a 1:500 dilution of Avidin-D and a 1:1000 dilution of biotinylated-horseradish peroxidase (Vector Laboratories) and kept on ice for 1 h. The membranes were washed as described above and incubated with the avidin-biotin complex for 1 h at RT. Finally, the membranes were washed and immune complexes were visualized using 0.8 mM diaminobenzamine as substrate in the presence of 0.3 mM nickel chloride and 0.009% hydrogen peroxide at RT for 10 min (66).

### **Plasmids and Oligonucleotides**

The SF-1 expression vector was generously provided by Dr. Keith L. Parker. Mouse -6 kb  $\beta$ TSH-luciferase and  $\alpha$ GSU-luciferase (-1.7 kb, -0.48 kb, -0.381 kb and -0.297 kb) reporter plasmids were kindly provided by Dr. David F. Gordon.  $\alpha$ GSU promoter deletions to -0.212 kb, -0.113 kb and -0.065 kb were generated by PCR. Bovine -0.776 kb  $\beta$ LH-luciferase was kindly provided by Dr. John Nilson. Deletion to -0.104 kb  $\beta$ LH-luciferase was obtained by cutting the -0.776 kb plasmid with *Sma*I and religating, and to -0.033 kb by cutting the -0.776 kb plasmid with *Xho*I and *Pst*I, blunting both extremities with T<sub>4</sub> DNA polymerase, and religating. Ptx1 expression vector was constructed by cloning a *Nco*I-*Kpn*I fragment of Ptx1 cDNA in the corresponding sites of a RSV-driven expression vector. This vector was derived from RSV-Luc reporter by replacing the *Hind*III-*Kpn*I luciferase fragment by the multiple cloning site of Bluescript KS- and by

changing the pBR322 backbone to Bluescript SK+ to increase copy number in bacteria. The Ptx1 antisense expression vector was made by subcloning the full-length Ptx1 cDNA in reverse orientation in the *Xba*I-*Hind*III sites of the pRC/CMV vector (InVitrogen). The Ptx2 cDNA was obtained by RT-PCR from mouse pituitary first-strand cDNA using forward (5'-TCCTCTAGACGATAACCGGGAATGGAG-3') and reverse (5'-CAGGATCCTCAGTCTTTCTGGGGCAGA-3') primers and subsequently subcloned in Bluescript KS- and the RSV expression vector. Wild-type (WT) and mutant (M1) Ptx1 oligonucleotides, as well as DE2A and GATA probes used in the gel retardation assays, were described previously (14, 64). Oligonucleotides were synthesized with an Applied Biosystem (Foster City, CA) synthesizer.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pamela Mellon for her pituitary-derived cell lines and for the GnRH-R-Luc reporter, to David Gordon ( $\alpha$ GSU,  $\beta$ TSH), Michael Karin (GH), Kathy Mahon (Pit1 promoter and enhancer), Richard Maurer ( $\beta$ FSH), John Nilson ( $\beta$ LH) and Michael Rosenfeld (PRL) for their reporter constructs. We also thank Keith Parker and Michael Karin for the SF-1 and Pit1 expression vectors, respectively. Pan-1, Oct1, Lim3, Rpx, LH-2, GnRH-R, Pax6 and Six3 probes were provided by Chris Nelson, Hans Schöler, Nabil Seidah, Kathy Mahon, Richard Maurer, Kevin Catt, Tom Glaser and Peter Gruss, respectively. We thank Michel Chamberland for oligonucleotide synthesis. The efficient secretarial assistance of Lise Laroche was much appreciated.

Received October 2, 1997. Revision received November 14, 1997. Accepted December 8, 1997.

Address request for reprints to: Dr. Jacques Drouin, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 des Pins Ouest, Montréal Québec Canada H2W 1R7. e-mail: drouinj@ircm.umontreal.ca.

J. J. Tremblay was recipient of a studentship from the Cancer Research Society Inc. and C. Lanctôt was a Research Student of the National Cancer Institute of Canada. This work was funded by the National Cancer Institute of Canada supported with funds provided by the Canadian Cancer Society.

## REFERENCES

1. Voss JW, Rosenfeld MG 1992 Anterior pituitary development: short tales from dwarf mice. *Cell* 70:527-530
2. Elkabes S, Loh YP, Nieburgs A, Wray S 1989 Prenatal ontogenesis of proopiomelanocortin in the mouse central nervous system and pituitary gland: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Dev Brain Res* 46:85-95
3. Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG, Swanson LW 1990 Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev* 4:695-711
4. Japon MA, Rubinstein M, Low MJ 1994 In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117-1125
5. Jacobson, L. and Drouin, J. Regulation of proopiomelanocortin gene transcription. In: *The pituitary gland*, edited by Imura, H. New York: Raven Press, Ltd. 1994, p. 117-138.
6. Couly GF, Le Douarin NM 1985 Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol* 110:422-439
7. Couly GF, Le Douarin NM 1987 Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev Biol* 120:198-214
8. Schwind J 1928 The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Am J Anat* 41:295-319

9. Kawamura K, Kikuyama S 1995 Induction from posterior hypothalamus is essential for the development of the pituitary proopiomelanocortin (POMC) cells of the toad (*Bufo japonicus*). *Cell Tissue Res* 279:233-239
10. Le Douarin NM, Ferrand R, Le Douarin G 1967 La différenciation de l'ébauche épithéliale de l'hypophyse séparée du plancher encéphalique et placée dans les mésenchymes hétérologues. *C R Acad Sci* 264:3027-3029
11. Le Douarin NM, Ferrand R, Le Douarin G 1967 Evolution de l'ébauche de l'adénohypophyse isolée du plancher encéphalique aux jeunes stades du développement. *C R Soc Biol* 161:1807-1811
12. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ 1996 The *T/ebp* null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 10:60-69
13. Ikeda H, Yoshimoto T 1991 Developmental changes in proliferative activity of cells of the murine Rathke's pouch. *Cell Tissue Res* 263:41-47
14. Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J 1996 PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of proopiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev* 10:1284-1295
15. Lanctôt C, Lamolet B, Drouin J 1997 The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 124:2807-2817
16. Gage PJ, Camper SA 1997 Pituitary homeobox 2, a novel member of the *bicoid*-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum Mol Genet* 6:457-464
17. Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC 1996 Cloning and

- characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics* 14:392-399
18. Muccielli ML, Martinez S, Pattyn A, Goridis C, Brunet JF 1996 *Otx2*, an *Otx*-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol Cell Neurosci* 8:258-271
  19. Hermesz E, Mackem S, Mahon KA 1996 *Rpx*: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* 122:41-52
  20. Thomas PQ, Johnson BV, Rathjen J, Rathjen PD 1995 Sequence, genomic organization, and expression of the novel homeobox gene *hesx1*. *J Biol Chem* 270:3869-3875
  21. Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carriere C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG 1996 Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384:327-333
  22. Bach I, Rhodes SJ, Pearse RV, 2nd, Heinzl T, Gloss B, Scully KM, Sawchenko PE, Rosenfeld MG 1995 P-lim, a lim homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2720-2724
  23. Seidah NG, Barale JC, Marcinkiewicz M, Mattei MG, Day R, Chretien M 1994 The mouse homeoprotein *mlim-3* is expressed early in cells derived from the neuroepithelium and persists in adult pituitary. *DNA Cell Biol* 13:1163-1180
  24. Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H 1996 Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *LHX3*. *Science* 272:1004-1007

25. Gage PJ, Roller ML, Saunders TL, Scarlett LM, Camper SA 1996 Anterior pituitary cells defective in the cell-autonomous factor, *df*, undergo cell lineage specification but not expansion. *Development* 122:151-160
26. Gage PJ, Brinkmeier ML, Scarlett LM, Knapp LT, Camper SA, Mahon KA 1996 The ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of *rpx* transcription and initiation of lineage-specific cell proliferation. *Mol Endocrinol* 10:1570-1581
27. Dollé P, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M 1990 Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity. *Cell* 60:809-820
28. Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M 1988 The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55:505-518
29. Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG 1988 A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519-529
30. Li S, Crenshaw EBI, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG 1990 Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature* 347:528-533
31. Mangalam HJ, Albert VR, Ingraham HA, Kapiloff M, Wilson L, Nelson C, Elsholtz H, Rosenfeld MG 1989 A pituitary POU domain protein, *Pit-1*, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev* 3:946-958
32. Nelson C, Albert VR, Elsholtz HP, Lu LIW, Rosenfeld MG 1988 Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* 239:1400-1405



33. Rhodes SJ, Chen R, DiMattia GE, Scully KM, Kalla KA, Lin SC, Yu VC, Rosenfeld MG 1993 A tissue-specific enhancer confers Pit-1-dependent morphogen inducibility and autoregulation on the pit-1 gene. *Genes Dev* 7:913-932
34. Steinfelder HJ, Hauser P, Nakayama Y, Radovick S, McClaskey JH, Taylor T, Weintraub BD, Wondisford FE 1991 Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSHB expression: role of a pituitary-specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid hormone-inhibitory element. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3130-3134
35. Smidt M, van Schaick HSA, Lanctôt C, Tremblay JJ, Cox JJ, van der Kleij AAM, Wolterink G, Drouin J, Burbach PH 1997 A homeodomain gene *PTX3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13305-13310
36. Wilson DS, Sheng G, Jun S, Desplan C 1996 Conservation and diversification in homeodomain-DNA interactions: a comparative genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6886-6891
37. Driever W, Nusslein-Volhard C 1989 The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 337:138-143
38. Ma X, Yuan D, Diepold K, Scarborough T, Ma J 1996 The drosophila morphogenetic protein bicoid binds dna cooperatively. *Development* 122:1195-1206
39. Poulin G, Turgeon B, Drouin J 1997 NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol Cell Biol* 17:6673-6682
40. Keri RA, Nilson JH 1996 A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone beta subunit promoter in gonadotropes of transgenic mice. *J Biol Chem* 271:10782-10785

41. Halvorson LM, Kaiser UB, Chin WW 1996 Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1. *J Biol Chem* 271:6645-6650
42. Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL 1994 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8:2302-2312
43. Asa SL, Bamberger AM, Cao B, Wong M, Parker KL, Ezzat S 1996 The transcription activator steroidogenic factor-1 is preferentially expressed in the human pituitary gonadotroph. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2165-2170
44. Barnhart KM, Mellon PL 1994 The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol* 8:878-885
45. Szeto DP, Ryan AK, O'Connell SM, Rosenfeld MG 1996 P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7706-7710
46. Windle JJ, Weiner RI, Mellon PL 1990 Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 4:597-603
47. Walther C, Gruss P 1991 Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435-1449
48. Alarid ET, Windle JJ, Whyte DB, Mellon PL 1996 Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development* 122:3319-3329
49. Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E 1992 Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358:687-690

50. Therrien M, Drouin J 1993 Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 13:2342-2353
51. Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL 1995 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 9:478-486
52. Yu Y, Li W, Su K, Yussa M, Han W, Perrimon N, Pick L 1997 The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the *Drosophila* homeodomain protein Ftz. *Nature* 385:552-555
53. Guichet A, Copeland JW, Erdélyi M, Hlousek D, Závorszky P, Ho J, Brown S, Percival-Smith A, Krause HM, Ephrussi A 1997 The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature* 385:548-552
54. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform-extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
55. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982
56. Oliver G, Mailhos A, Wehr R, Copeland NG, Jenkins NA, Gruss P 1995 Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121:4045-4055
57. Glaser T, Walton DS, Maas RL 1992 Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human pax6 gene. *Nature Genetics* 2:232-239
58. Nelson C, Shen LP, Meister A, Fodor E, Rutter WJ 1990 Pan: a transcriptional regulator that binds chymotrypsin, insulin, and AP-4 enhancer motifs. *Genes Dev* 4:1035-1043

59. Roberson MS, Schoderbek WE, Tremml G, Maurer RA 1994 Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol Cell Biol* 14:2985-2993
60. Luo X, Ikeda Y, Schlosser DA, Parker KL 1995 Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse *ftz-f1* gene. *Mol Endocrinol* 9:1233-1239
61. Reinhart J, Mertz LM, Catt KJ 1992 Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 267:21281-21284
62. Suzuki N, Peter W, Ciesiolka T, Gruss P, Scholer HR 1993 Mouse Oct-1 contains a composite homeodomain of human oct-1 and oct-2. *Nucleic Acids Res* 21:245-252
63. Gordon DF, Wood WM, Ridgway EC 1988 Organization and nucleotide sequence of the mouse alpha-subunit gene of the pituitary glycoprotein hormones. *DNA* 7:679-690
64. Grépin C, Dagnino L, Robitaille L, Haberstroh L, Antakly T, Nemer M 1994 A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 14:3115-3129
65. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J 1997 Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17:5946-5951
66. Straus W 1982 Imidazole increases the sensitivity of the cytochemical reaction for peroxidase with diaminobenzidine at a neutral pH. *J Histochem Cytochem* 30:491-493

## **CHAPITRE III**

### **Transcriptional Properties of Pituitary Ptx1 and Ptx2 Isoforms**

Jacques J. Tremblay, Cynthia G. Goodyer and Jacques Drouin

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

Soumis.

## INTRODUCTION AU CHAPITRE

Le rôle du facteur de transcription Ptx1 dans l'expression de plusieurs gènes hypophysaires a été présenté au chapitre II. De nombreux facteurs de transcriptions sont exprimés sous plusieurs isoformes. Ces isoformes ont souvent des patrons d'expression et/ou des propriétés transcriptionnelles différentes ce qui suggère des rôles potentiellement différents pour ces isoformes. Des isoformes ont déjà été décrit pour le facteur Ptx2, un membre de la famille Ptx de facteur à boîte homéo. Cet article décrit le clonage et la caractérisation d'une nouvelle isoforme du facteur Ptx1 nommée Ptx1b. Il présente aussi une comparaison des propriétés de liaison à l'ADN et transcriptionnelles des isoformes Ptx1, Ptx1b, Ptx2 et Ptx2b.

## RÉSUMÉ

La famille Ptx de facteurs de transcription à boîte homéo comprend Ptx1, Ptx2, deux isoformes de Ptx2 (Ptx2b et Ptx2c) et Ptx3. Ptx1 et Ptx2 sont exprimés dans le stomodéum et ses dérivés, ainsi que dans les dérivés du mésoderme, tandis que Ptx3 est exprimé dans une lignée de neurones ainsi que dans les yeux. L'hypophyse compte de nombreux gènes cibles du facteur Ptx1 où il agit comme un activateur pan-hypophysaire de la transcription. Ptx1 contribue à l'expression cellule-spécifique de ces gènes en interagissant avec des facteurs restreints à ces cellules tels SF-1, Egr-1, Pit1 et l'hétérodimère NeuroD1/Pan1. Nous décrivons dans cet article le clonage à partir de cellules hypophysaires et la caractérisation d'une isoforme de Ptx1, Ptx1b, générée par l'utilisation d'un promoteur alternatif. Ces deux isoformes diffèrent uniquement par leurs régions N-terminales codées par des exons différents. L'ARNm de Ptx1b est co-présent avec celui de Ptx1 dans les différentes lignées hypophysaires. Cependant, la protéine Ptx1b semble absente de ces cellules suggérant une régulation serrée de l'expression de Ptx1b au niveau traductionnel. Les deux isoformes de Ptx1 de même que deux isoformes de Ptx2 ont des propriétés de liaison à l'ADN similaires *in vitro*, et tous activent la transcription à partir de plusieurs promoteurs hypophysaires tels POMC,  $\alpha$ GSU, LH $\beta$ , FSH $\beta$ , GnRH-R, TSH $\beta$ , PRL et GH. De plus, tout comme Ptx1, les facteurs de transcription Ptx1b, Ptx2 et Ptx2b interagissent avec les facteurs de structure différente SF-1, Egr-1, Pit1 et NeuroD1/Pan1, pour activer de façon synergique les promoteurs cibles. Les données présentées suggèrent que les activités transcriptionnelles connues à ce jour pour ces quatre facteurs Ptx (Ptx1, Ptx1b, Ptx2 et Ptx2b) sont indépendantes de leurs régions N-terminales variables.

## ABSTRACT

The Ptx family of homeobox transcription factors comprises Ptx1, Ptx2, two Ptx2 isoforms named Ptx2b, Ptx2c and Ptx3. Ptx1 and Ptx2 are expressed in the stomodeum and its derivatives, as well as in mesodermal derivatives, whereas Ptx3 is expressed in one neuronal lineage of the brain and in the eyes. A large set of downstream target genes have been identified for Ptx1 in the pituitary gland where it acts as a pan-pituitary regulator of transcription. In particular, Ptx1 contributes to promoter- and lineage-specific transcription by interaction with cell-restricted factors such as SF-1, Egr-1, Pit1, and the bHLH heterodimer NeuroD1/Pan1. We describe the cloning from pituitary cells and the characterization of a Ptx1 isoform, named Ptx1b, generated by alternative promoter usage. The two Ptx1 and the two Ptx2 isoforms have similar *in vitro* DNA-binding specificities and they all activate transcription driven by a panel of pituitary promoters, including those for POMC,  $\alpha$ GSU, LH $\beta$ , FSH $\beta$ , GnRH-R, TSH $\beta$ , PRL, and GH. Also like Ptx1, the Ptx1b, Ptx2 and Ptx2b transcription factors synergize with the structurally-unrelated factors SF-1, Egr-1, Pit1 and NeuroD1/Pan1 to activate promoter-specific transcription. In conclusion, the pituitary transcriptional activities of the four Ptx isoforms do not appear to be dependent on the variant N-termini of these factors..



## INTRODUCTION

Ptx1 was first identified as a transcription factor involved in pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression (21). Subsequent studies revealed that Ptx1 is present in all pituitary lineages and is a strong activator of several pituitary-specific promoters, thus defining Ptx1 as a pan-pituitary activator of transcription (48). Ptx1 achieves cell- and promoter-specific transcriptional activation by cooperation with lineage-restricted transcription factors. Indeed, Ptx1 cooperates physically and transcriptionally with Pit1, a POU domain transcription factor, on the prolactin (PRL) and growth hormone (GH) promoters (44,48); with the basic helix-loop-helix (bHLH) heterodimer NeuroD1/Pan1 on the POMC promoter [(35), G. Poulin and J. Drouin, in preparation]; and with the orphan nuclear receptor SF-1 (47,48) and the immediate early factor Egr-1 on the luteinizing  $\beta$ -subunit hormone (LH $\beta$ ) promoter (46).

Ptx1 is the prototypical member of a new family of homeobox genes (12,21) that includes Ptx2/Otlx2/Rieg/ARP1 (3,13,30,38) and Ptx3 (39,42). Ptx1 and Ptx2 share common expression sites in the developing mouse head as they are both expressed from embryonic day 8 (e8) in the stomodeum and then maintained in all stomodeal derivatives including the pituitary anlage, Rathke's pouch and the oral, dental and olfactory epithelia (23,30). Antisense RNA experiments suggested that Ptx1 is required for Lim3/Lhx3 gene expression (48), a gene essential for normal pituitary organogenesis (40), thus placing Ptx1 upstream of Lim3/Lhx3 in the cascade of regulators involved in pituitary development.

Both Ptx1 and Ptx2 also appear to have important roles for specification of mesoderm. Indeed, Ptx1 is expressed from e6.8 in extra-embryonic and posterior lateral plate mesoderm, thus differentiating mesoderm from the posterior (up to, but excluding the forelimbs) and anterior halves of the embryo (23). Ptx2 appears to play a major role

as effector of left-right asymmetry during development of mesodermal derivatives like heart and stomach; this function results from expression of Ptx2 in left side mesoderm only (24,34,36,51).

The expression pattern of Ptx3 has not been as thoroughly investigated, although it is clear that it is not expressed in the same tissues as Ptx1 and Ptx2. Its most striking expression is in the brain where it is only expressed in one neuronal lineage, the midbrain dopaminergic system (42). It is also expressed in the eyes (39). At present, no downstream target gene has been identified for Ptx3.

Ptx proteins are almost identical in the homeodomain region (58/60 amino acids) but diverge markedly in their N- and C-terminal domains (12). The Ptx homeodomain contains the lysine at position 50 that is the hallmark of the *bicoid*-related subfamily which also includes Otx1, Otx2 and gooseoid in vertebrates (5). This lysine residue is critical for recognition of the TAA(T/G)CC motif [(11,50), J.J. Tremblay and J. Drouin, unpublished] that is present in the promoter region of several target genes (1,21,48). All Ptx family members have a short, highly conserved, stretch of 14 amino acids in their C-terminal region, named the FACE domain (48). Although the role of this domain remains to be defined, it was suggested that it may be important for development of the head and face since this motif is present in many homeoproteins that are expressed in craniofacial structures (38).

Several transcription factors are produced as isoforms. These isoforms often have different expression patterns and/or transcriptional properties. For example, the pituitary POU transcription factor Pit1 has four different variants: Pit1 (4,16), Pit1 $\beta$  (19,28), Pit1T (14) and Pit1 $\Delta$ 4 (9,49). The Pit1 isoforms are generated by alternative splicing and, interestingly, have different transcriptional properties. More recently, Ptx2

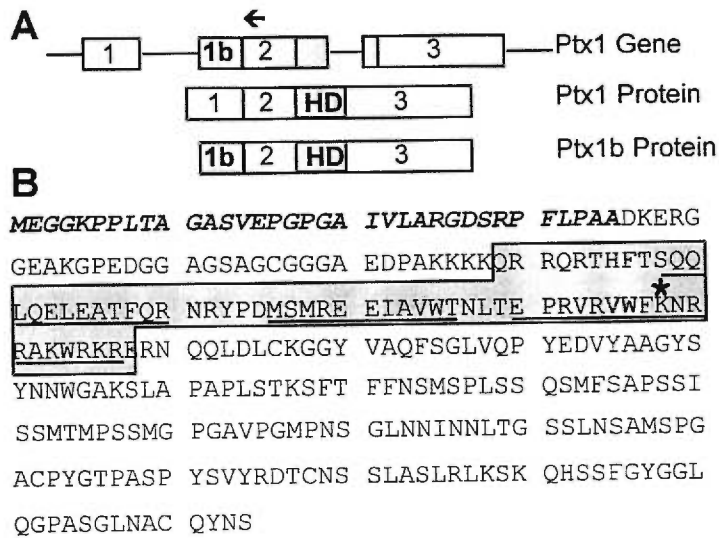
was also shown to be expressed as three splice variants, Ptx2, Ptx2b and Ptx2c (3,13). No functional differences, however, have yet been ascribed to these isoforms.

We now report the cloning of Ptx1b, a novel Ptx1 isoform, which, unlike the other transcription factor isoforms expressed in the pituitary, is apparently not produced by differential splicing but rather by alternative promoter usage. We also provide evidence that suggests translational control of Ptx1b mRNA and we compare the DNA-binding and transcriptional properties of Ptx1, Ptx1b, Ptx2 and Ptx2b on simple and natural pituitary promoters. The ability of all isoforms to synergize with other transcription factors was also assessed.

## RESULTS

### Cloning of a Ptx1 Isoform

The existence of isoforms for several transcription factors prompted us to look for Ptx1 variants. The screening of an  $\alpha$ T3-1 cDNA library using a Ptx1 homeodomain DNA probe yielded two classes of positive clones, one being similar to the Ptx1 cDNA. DNA sequencing identified a novel Ptx1 isoform that we have named Ptx1b (Fig. 3-1A). The 2259 bp Ptx1b cDNA contains a single 882 bp open reading frame starting from the first AUG: this region matches the Kozak consensus sequence (20). Consistent with this AUG being the initiator codon, several stop codons are present in all three potential reading frames upstream of the putative AUG. The open reading frame predicts a 294 amino acid Ptx1b protein. As shown in Fig. 3-1A, the two Ptx1 proteins differ solely in their N-terminal domains which may be encoded by different exons (Figs. 3-1A and 3-1B).



**Fig. 3-1.** Structure of Ptx1b.

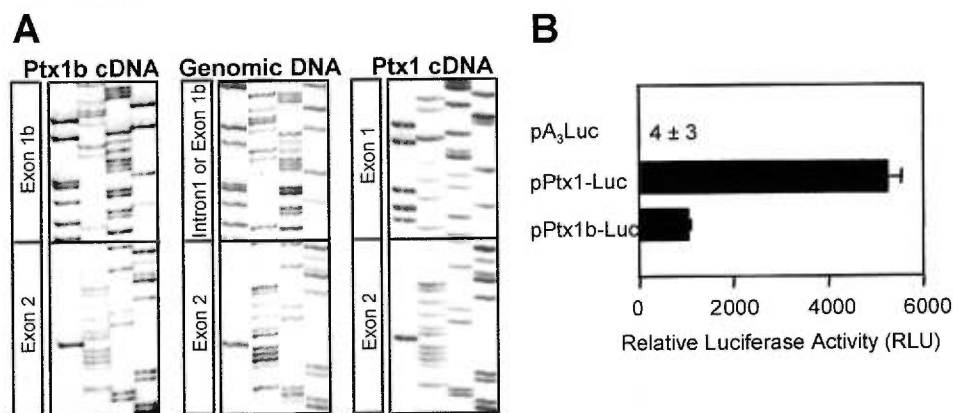
(A) Schematic organization of the mouse Ptx1 gene highlighting the structure of the Ptx1b and Ptx1 gene products. Boxes and lines represent exons and introns, respectively. The arrow indicates the position of the primer used to derive DNA sequences presented in Fig. 3-2A. (B) Deduced amino acid sequence of Ptx1b.

The Ptx1b-specific region is italicized and in boldface. The homeodomain is boxed and its three predicted  $\alpha$ -helices are underlined. The lysine residue at position 50 of the homeodomain is indicated by an asterisk.

### The Two Ptx1 Isoforms are Generated by Differential Promoter Usage

The relationship between genomic sequence encoding the Ptx1 and Ptx1b specific N-terminal sequences was established by hybridization of Southern blots containing restriction digests of cloned mouse Ptx1 genomic DNA. The experiments suggested that Ptx1b-specific sequences were located in the first intron of the gene close to exon 2 (not shown). In order to clarify this further, we used a primer in exon 2 of the Ptx1 gene, an exon common to both isoforms, to sequence in parallel the Ptx1 and Ptx1b cDNAs as well as genomic Ptx1 DNA (Fig. 3-2A). The Ptx1b-specific exon (Fig. 3-2A, left panel) is encoded by the first intron of the Ptx1 gene since its sequence was identical to that obtained with genomic DNA (Fig. 3-2A, middle panel). In contrast, the Ptx1 cDNA yielded a completely different sequence (Fig. 3-2A, right panel) indicating that Ptx1 exon 1 lies further upstream on the Ptx1 gene (Fig. 3-1A). The Ptx1 and Ptx1b isoforms do not share any overlapping sequence in their 5'-untranslated region. Although the Ptx1b cDNA is of the size expected for a full-length clone (by comparison to mRNA size in

northern blots), we wanted to ensure that we had obtained a near full-length cDNA. We screened cDNA libraries with 5'-specific probes and performed 5'-RACE PCR and we were unable to obtain any further 5' upstream sequences suggesting that Ptx1 and Ptx1b are not generated by alternative splicing of the same pre-mRNA but rather are produced by differential promoter usage. Consistent with our hypothesis, a 1.2 kb genomic fragment containing the putative Ptx1b promoter showed substantial promoter activity by comparison to the Ptx1 promoter (Fig. 3-2B).



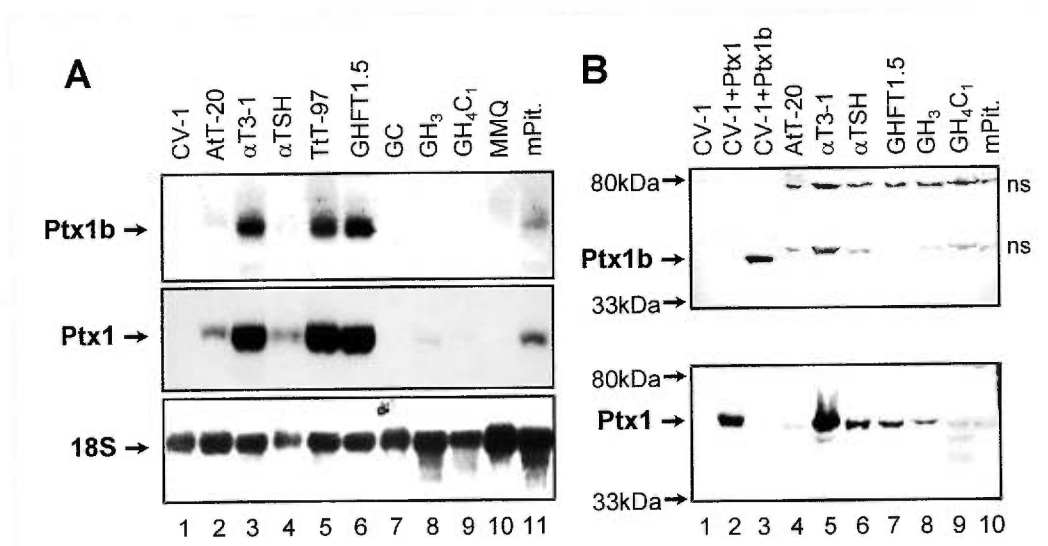
**Fig. 3-2.** Alternate Promoter for Ptx1b Expression.

(A) DNA sequence of mouse Ptx1b cDNA, Ptx1 genomic DNA, and Ptx1 cDNA obtained using the exon 2 primer that is common to both isoforms (shown in Fig. 3-1A). (B) Promoter activity of luciferase reporter constructs containing either a 4.2 kb fragment of Ptx1 promoter or a 1.2 kb fragment of the Ptx1b promoter. Their activity is compared to that of the promoterless plasmid (pA<sub>3</sub>Luc) after transfection in L cells.

### Relative Expression of Ptx1 and Ptx1b

We have previously shown that Ptx1 is expressed in all pituitary cell lineages, both at the mRNA and protein levels (22,48). In order to compare the relative expression levels of both Ptx1 isoforms, we performed northern blot analyses using 5'-specific probes and western blot analyses using antisera raised against the N-terminal-specific portions of each isoform. As shown in Figure 3-3A, the Ptx1 and Ptx1b mRNAs are both present in

pituitary-derived cell lines and in adult mouse pituitary. It is also apparent that Ptx1 mRNA is more abundant than that of Ptx1b. Although Ptx1 protein was detected in pituitary cells that contain Ptx1 mRNA (Fig. 3-3B, *lower panel*), no Ptx1b protein could be detected (Fig. 3-3B, *upper panel*). Both Ptx1 and Ptx1b antisera were affinity-purified, specific, and of similar sensitivity (Fig. 3-3B, lanes 1-3). These results indicate that despite the presence of its mRNA, Ptx1b protein is either below the level of detection or not present in these cells. Thus, translation of endogenous Ptx1b mRNA may be tightly regulated as forced expression from a Ptx1b-expressing vector led to synthesis of Ptx1b protein in mammalian cells (Fig. 3-3B, lane 3 of upper panel).

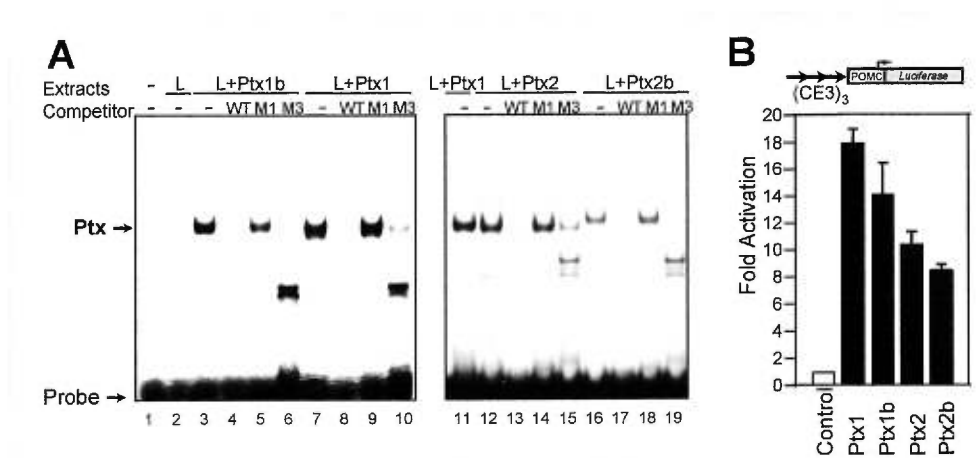


**Fig. 3-3.** Relative Expression of Ptx1 and Ptx1b.

(A) Ptx1b mRNA is present in several pituitary-derived cell lines. Northern blot analysis of 20 micrograms total RNA from multiple cell lines and mouse pituitary was used to reveal Ptx1b mRNA. A similar blot was hybridized with a Ptx1-specific probe of similar specific activity. Blots were subsequently reprobed with an 18S ribosomal RNA-specific oligonucleotide probe to insure integrity and loading of the RNA (the Ptx1 blot is shown here). The autoradiograms shown were exposed for the same period of time. (B) The level of Ptx1b protein was assessed by western blot analysis. Forty microgram aliquots of whole cell extracts (transfected cells, lanes 1-3) or 80 micrograms of nuclear extracts (cell lines and mouse pituitary) were subjected to immunoblotting using affinity-purified Ptx1b- (upper panel) or Ptx1- (lower panel) specific antisera. Protein molecular size standards are indicated on the left. ns: non-specific.

### DNA Binding Specificity of Ptx1, Ptx2 and their Isoforms

We have previously shown that Ptx1 and Ptx2 bind similar target DNA sequences in gel shift assays (48). We used a similar assay and recombinant Ptx1, Ptx1b, Ptx2, and Ptx2b to compare the DNA-binding properties of these isoforms. As shown in lanes 3, 7, 12 and 16 of Fig. 3-4A, all four isoforms are equally efficient at binding the consensus Ptx site of the POMC promoter (21). This binding is specific since it was competed by unlabelled wild-type probe (lanes 4, 8, 13 and 17) as well as by the active mutant M3 (lanes 6, 10, 15 and 19), but not by the mutant M1 oligonucleotide (lanes 5, 9, 14 and



**Fig. 3-4.** DNA-Binding Properties of Ptx1 and Ptx2 Isoforms.

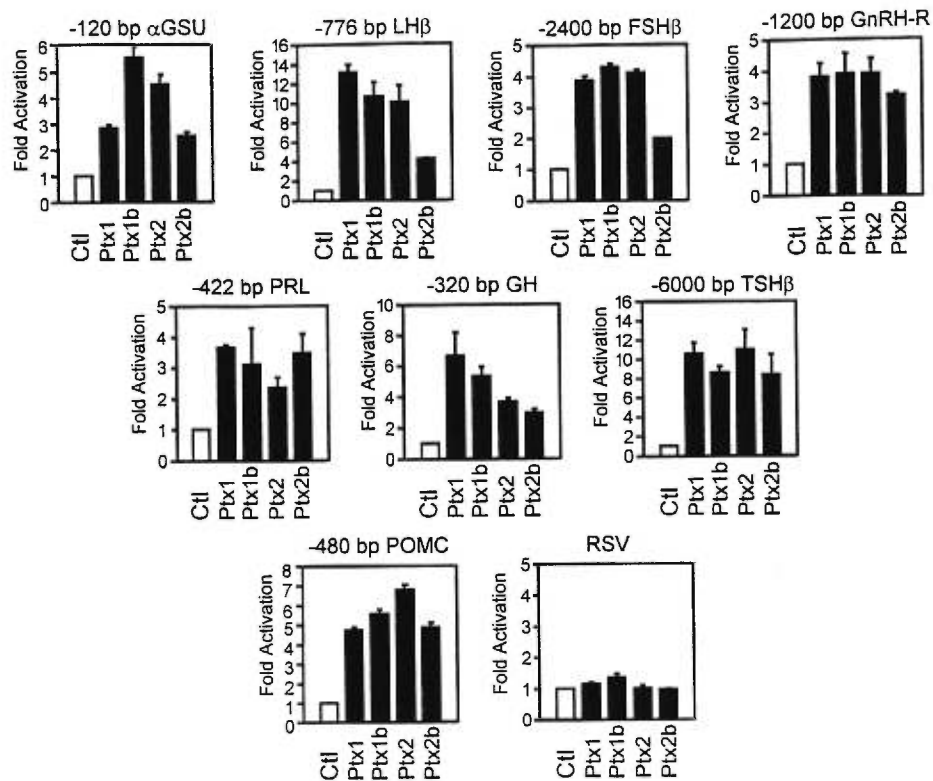
(A) Gel retardation assays using the Ptx binding site from the POMC gene as probe (21) and extracts from L cells mock-transfected (lane 2) or transfected with Ptx1b (lanes 3-6), Ptx1 (lanes 7-11), Ptx2 (lanes 12-15) or Ptx2b (lanes 16-19) expression vectors. Binding was challenged with 200-fold molar excesses of unlabelled oligonucleotides for wild-type (WT) sequence, for a mutant that destroys the Ptx-binding site (M1) or for a mutant outside the Ptx-binding site (M3) (21). (B) Transactivation of a luciferase reporter (21) containing three Ptx-binding sites upstream of a minimal promoter (POMC). Similar RSV-driven expression vectors were constructed for the four Ptx1 and Ptx2 isoforms: these yielded similar levels of Ptx protein expression as shown in A. Data are presented on fold activation  $\pm$  SEM relative to control samples that were transfected with the empty expression vector.

18), a mutant previously shown to be inactive (21). Taken together, these results demonstrate that Ptx1, Ptx2, and their respective isoforms share identical DNA binding properties. Since the homeodomain is highly conserved in Ptx1 and Ptx2, the experiments suggest that other regions of the proteins do not modulate DNA binding.

### **Transactivation Properties of Ptx1, Ptx2, and their Isoforms**

Structural differences between Ptx1, Ptx2, and their isoforms outside of the homeodomain region raised the possibility that these proteins may have different transcriptional properties. To test this possibility, we studied the transactivation properties of the four Ptx family members on a simple reporter plasmid containing oligomerized Ptx binding sites (Fig. 3-4B) and on a series of natural pituitary-specific promoters (Fig. 3-5). All four Ptx proteins showed similar transactivation when tested on the simple reporter (Fig. 3-4B). Similarly, they all activated several pituitary-specific promoters including those for  $\alpha$ GSU, LH $\beta$ , FSH $\beta$ , GnRH-R, PRL, GH, TSH $\beta$ , and POMC (Fig. 3-5). None of the factors, however, activated the RSV promoter, which was used as a negative control. DNA-binding assays (Fig. 3-4A) and western blot analysis (Fig. 3-3B) confirmed that the different Ptx proteins were expressed at comparable levels (Fig. 3-4A). However, the amplitude of activation was not the same for all pituitary promoters. Indeed, Ptx2b appeared to be a weaker activator of the LH $\beta$  and FSH $\beta$  promoters when compared to the other Ptx proteins (Fig. 3-5). Similarly, the Ptx2 isoforms were generally less efficient at activating the GH promoter than were the Ptx1 isoforms.





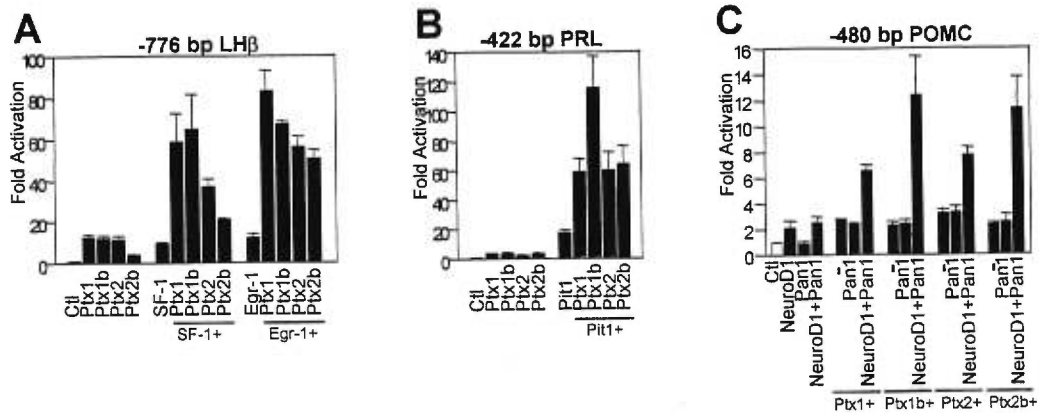
**Fig. 3-5.** Ptx Proteins Have Similar Transactivation Properties.

The transactivation potential of Ptx1, Ptx1b, Ptx2 and Ptx2b was tested on several pituitary promoters including -120 bp  $\alpha$ GSU, -776 bp LH $\beta$ , -2400 bp FSH $\beta$ , -1200 bp GnRH-R, -422 bp PRL, -320 bp GH, -6000 bp TSH $\beta$ , and -480 bp POMC. Each construct was cotransfected in CV-1 cells with the indicated expression vector. A viral promoter, RSV, was used as negative control. Results are shown as fold activation  $\pm$  SEM.

### The Ptx1 and Ptx2 Isoforms Synergize with SF-1, Egr-1, Pit1 and NeuroD1/Pan1

As previously mentioned, Ptx1 can activate a broad spectrum of pituitary-specific genes. We have previously shown that Ptx1 cooperates with the cell-restricted factors SF-1, Egr-1, Pit1 and NeuroD1/Pan1 to confer pituitary-, lineage-, and promoter-specific transcription to the LH $\beta$ , PRL, and POMC genes, respectively (35,44,46-48). To determine whether the Ptx isoforms are also capable of cooperating transcriptionally with these factors, we performed transfection experiments using Ptx1, Ptx1b, Ptx2, and Ptx2b alone or in combination with either SF-1, Egr-1, Pit1 or NeuroD1/Pan1 (Fig. 3-6).

Interestingly, all isoforms were able to interact synergistically with these structurally unrelated factors to enhance transcription.



**Fig. 3-6.** Ptx1, Ptx1b, Ptx2 and Ptx2b Synergize with the Cell Restricted Factors SF-1, Egr-1, Pit1, and NeuroD1/Pan1.

(A) Synergism between SF-1 or Egr-1 and different Ptx family members. Transactivation by different Ptx family members, SF-1, and Egr-1, either alone or in combination, was tested on the -776 bp LHβ reporter (46-48). (B) Synergy between the Ptx proteins and Pit1. The effect of each Ptx protein and Pit1, either alone or in combination, was tested on the -422 bp PRL reporter (44,48). (C) Ptx family members synergize with heterodimers containing NeuroD1/Pan1 on the -480 bp POMC promoter [(35) and G. Poulin and J. Drouin, in preparation]. Promoter constructs were cotransfected with the indicated expression vectors in CV-1 cells (A and B) or in AtT-20 cells (C). Results are shown as fold activation ± SEM.

## DISCUSSION

Ptx homeoproteins can be grouped into two distinct subfamilies, Ptx1 and 2 versus Ptx3, based on expression patterns and primary amino acid sequence data (13,21,30,38,39,42). Indeed, the Ptx1 and Ptx2 genes are co-expressed in the stomodeum and have overlapping expression patterns in stomodeal derivatives such as Rathke's pouch (23,30,48). In contrast, Ptx3 is not expressed in these tissues but rather it is present in mesencephalic dopaminergic neurons and the eyes (39,42). Recent studies have reported that Ptx2 is expressed as at least three isoforms, Ptx2, Ptx2b and Ptx2c, that are generated by differential splicing (3,13). Ptx2b contains an additional 46 amino acid exon inserted in the N-terminal region of the protein and is apparently less abundant than Ptx2 (13) whereas Ptx2c lacks the first 54 amino acids (3). In the present study, we report the isolation and characterization of Ptx1b, a novel isoform of Ptx1 that, unlike most other isoforms, appears to result from alternative promoter usage.

Ptx1 has been previously shown to bind TAATCC-like motifs present in the promoters of several genes such as POMC, ultimately leading to their activation (21,48). Since the Ptx1 and Ptx2 isoforms are highly conserved within the homeodomain, it was not surprising to find that they shared similar DNA-binding specificities (Fig. 3-4A). Other *bicoid*-related homeoproteins, such as Otx1, Otx2, and the *drosophila* homolog *Otd*, all have similar *in vitro* DNA-binding properties (1,11,26,50). It is not uncommon that transcription factors sharing a conserved DNA-binding domain have indistinguishable *in vitro* DNA-binding specificity: indeed, this has been observed for the six GATA factors (18) and, even more strikingly, for the 39 Hox factors (5,27). This similarity contrasts sharply with the highly specialized functions of these genes *in vivo*. For Hox genes, part of the *in vivo* specificity was shown to be imparted by interaction with another class of homeoproteins of the Pbx and/or Meis subfamily (6,7,17,25,31,32):

Hox/Pbx complexes serve to select subsets of target DNA sequences (27), leading to enhanced specificity of action. Clearly, the interactions described between Ptx1/Ptx2 and various transcription factors, like SF-1, Egr-1, Pit1 or Pan1, do not result in differential actions for the Ptx isoforms since they all exhibited similar transcriptional synergism (Fig. 3-6). Thus, specificity of action of Ptx family members may be imparted by yet unidentified co-factor(s) and/or by differential expression pattern.

We have previously shown that Ptx1 contains an activation domain (AD) located between amino acids 234-315 in the C-terminal region of the protein (47). Since Ptx1 and Ptx1b differ solely in their N-terminal region, this domain is conserved in Ptx1b. Thus, it was not surprising to observe that the Ptx1 isoforms had almost identical transactivation properties when tested on a simple reporter and on a panel of pituitary promoters (Figs. 3-4B and 3-5). Similarly, the two Ptx2 isoforms activated the reporters to the same extent by comparison with the Ptx1 isoforms. Again, this can be explained by the high conservation of sequence in the AD region between Ptx1 and Ptx2 isoforms (56/82 conserved residues). An AD also appears to be present in the N-terminal part of Ptx1 (47): the similar transcriptional activity of the two Ptx1 isoforms suggests that this domain is located between the point of Ptx1/Ptx1b divergence and the homeodomain, although it cannot be ruled out that both isoforms have equivalent AD in their variant N-termini.

The Ptx1 domain involved in the physical interaction with SF-1, Egr-1 and Pit1 has been recently mapped to a 37 amino acid region located just upstream of the C-terminal AD (44,46,47), whereas the region of Ptx1 involved in the synergistic interaction with bHLH dimers was mapped elsewhere (G. Poulin and J. Drouin, in preparation). These regions are also present in Ptx1b and are highly conserved in the Ptx2 proteins. Thus, the four Ptx proteins were all found to synergize with SF-1 and Egr-1 on the LH $\beta$  promoter, with Pit1 on the PRL promoter, and with NeuroD1/Pan1 on the POMC

promoter (Fig. 3-6), in agreement with the sequence conservation in the relevant interaction domains of the four Ptx proteins.

The lack of detectable Ptx1b protein in several pituitary-derived cell lines or in mouse pituitary extracts despite the presence of its mRNA suggested that synthesis of the Ptx1b isoform is under translational control. This presence of an untranslated mRNA in pituitary cells is reminiscent of Pit1 mRNA which was reported to be present in all pituitary cells despite the highly restricted expression of Pit1 protein (2,10,41). Also, Pit1 isoforms expressed at low levels have been suggested to play important roles for differential regulation of Pit1-dependent promoters. Other transcription factors, such as Rpx and Prop-1, are only transiently expressed in the developing pituitary, but they play crucial roles for proper development of this gland (15,43). Similarly, the Ptx1b isoform may be expressed at critical times during development and/or when Ptx1 is not expressed. A large number of developmental roles have been suggested or demonstrated for Ptx homeoproteins: for Ptx1, development of craniofacial structures deriving from the stomodeum/foregut region and/or specification of posterior lateral plate mesoderm (23); for Ptx2, involvement in craniofacial development, in particular odontogenesis as exemplified by Rieger's syndrome (29,38) and/or specification of left side mesoderm to direct left-right asymmetry of heart and stomach development (24,34,36,51). It is, thus, not unreasonable to imagine that specific Ptx isoforms may play important transient role(s) in these functions.

## MATERIALS AND METHODS

### cDNA Library Screening and DNA Sequencing

Two cDNA libraries were screened for Ptx1 isoforms. The first was constructed from AtT-20 mRNA whereas the second, produced from  $\alpha$ T3-1 mRNA, was kindly provided by Pamela L. Mellon, UC San Diego. Library screening was performed using a *Bst*XI fragment of the Ptx1 cDNA (485 to 1052 bp). Positive clones were transferred into plasmid Bluescript SK+ (Stratagene) and sequenced by the dideoxy method (37) using a T7 polymerase kit purchased from Pharmacia.

### RNA Extraction and Analysis

Total cellular RNA was extracted by the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (8) and analyzed by northern blot as described (48). DNA probes used in the hybridizations were cDNA fragments specific for Ptx1b (bp 1-472) and Ptx1 (bp 1-484). As a loading control, the blot was stripped and rehybridized with a  $^{32}$ P-labeled oligonucleotide specific for 18S ribosomal RNA (48).

### Cell Culture and Transfection Assays

The following cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum: murine  $\alpha$ T3-1 cells as a model of gonadotrope precursors,  $\alpha$ TSH as a model of thyrotrope precursors, the corticotropic cells AtT-20, GHFT1.5 as a model of somatolactotrope precursors, lactotropic MMQ, somatotropic GC, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> and GH<sub>3</sub> cells, murine fibroblast L and African green monkey kidney fibroblast-like CV-1 cells. CV-1 and L cells were transfected by the calcium phosphate method (48). AtT-20 cells were transfected using the LipofectAMINE reagent (BRL) as

previously described (33). Transfection data presented here were from three to ten replicate experiments in which each sample was tested in duplicate.

### **Nuclear Extracts, Gel Retardation Assay and Western Blot Analysis**

Nuclear microextracts from transfected CV-1 and L cells and from wild-type AtT-20,  $\alpha$ T3-1,  $\alpha$ TSH, GHFT1.5, MMQ, GC, GH<sub>3</sub>, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells and mouse pituitary were prepared as previously described (45). Ptx1 gel retardation assays were done as outlined by Lamonerie et al (21). Western blot analysis was performed using a 1:20 dilution of either a Ptx1-specific antiserum (48) or an affinity purified Ptx1b-specific serum raised against a glutathione-S-transferase (GST)-Ptx1b (amino acids 1 to 24) fusion protein. Conditions for the western blot analyses and fusion protein production have been previously reported (48).

### **Plasmids and Oligonucleotides**

Luciferase reporter constructs: -776 bp LH $\beta$ , -2.4 kb FSH $\beta$ , -1.2 kb GnRH receptor (GnRH-R), -320 bp GH, -422 bp PRL, and -6000 bp TSH $\beta$  were kindly provided by John Nilson, Richard Maurer, Pamela L. Mellon, Michael Karin, Michael Rosenfeld, and David Gordon, respectively. The construction of the -120 bp  $\alpha$ GSU reporter was previously described (48). The Ptx1b expression vector was obtained by subcloning a *Bgl*II-*Kpn*I fragment of the Ptx1b cDNA (bp 270-1480) into the corresponding sites of a Rous sarcoma virus (RSV)-driven expression vector [described in (48)]. The Ptx2 and Ptx2b cDNAs were obtained by RT-PCR from adult mouse pituitary cDNA and then cloned into the same RSV-expression vector used for Ptx1b. A 4.2 kb *Xba*I-*Eag*I genomic DNA fragment corresponding to the Ptx1 promoter and a 1.2 kb *Bam*HI genomic DNA fragment containing the putative Ptx1b promoter were subcloned in the pA<sub>3</sub>Luc

promoterless plasmid kindly provided by David Gordon. Ptx1 wild-type (WT) and mutant (M1 and M3) oligonucleotide sequences used in gel retardation assays have been reported elsewhere (21). Oligonucleotides were synthesized with an Applied Biosystem synthesizer.



### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pamela Mellon for the pituitary-derived cell lines, for the  $\alpha$ T3-1 cDNA library and for the GnRH-R-Luc reporter, to David Gordon ( $\alpha$ GSU, TSH $\beta$ ), Michael Karin (GH), Richard Maurer (FSH $\beta$ ), John Nilson (LH $\beta$ ) and Michael Rosenfeld (PRL) for their reporter constructs. We also thank Keith Parker, Harold Weintraub, Vikas Sukhatme, Ming Tsai and Michael Karin for the SF-1, Pan1, Egr-1, NeuroD1/Beta2 and Pit1 expression vectors, respectively. The efficient secretarial assistance of Lise Laroche was much appreciated. J.J.T. was recipient of a studentship from the Cancer Research Society Inc. This work was funded by the National Cancer Institute of Canada supported with funds provided by the Canadian Cancer Society.

## REFERENCES

1. Acampora D, Mazan S, Tuorto F, Avantaggiato V, Tremblay JJ, Lazzaro D, di Carlo A, Mariano A, Macchia PE, Corte G, Macchia V, Drouin J, Brûlet P, Simeone A 1998 Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking *Otx1* reveal prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH. *Development* 125:1229-1239
2. Andersen B, Rosenfeld MG 1994 Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland. A model for transcriptional regulation of cell phenotypes in mammalian organogenesis. *J Biol Chem* 269:29335-29338
3. Arakawa H, Nakamura T, Zhadanov AB, Fidanza V, Yano T, Bullrich F, Shizumi M, Blechman J, Mazo A, Canaani E, Croce CM 1998 Identification and characterization of the *ARP1* gene, a target for the human acute leukemia *ALL1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4573-4578
4. Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M 1988 The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55:505-518
5. Bürglin, T.R. A comprehensive classification of homeobox genes. In: *A guidebook for homeobox genes*, edited by Duboule, D. England: Oxford University Press, 1993
6. Chang CP, Jacobs Y, Nakamura T, Jenkins NA, Copeland NG, Cleary ML 1997 Meis proteins are major *in vivo* DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Mol Cell Biol* 17:5679-5687
7. Chang CP, Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C, Cleary ML 1995 Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev* 9:663-674
8. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform-extraction. *Anal Biochem* 162:156-159

9. Day RN, Day KH 1994 An alternatively spliced form of Pit-1 represses prolactin gene expression. *Mol Endocrinol* 8:374-381
10. Dollé P, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M 1990 Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity. *Cell* 60:809-820
11. Driever W, Nusslein-Volhard C 1989 The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 337:138-143
12. Drouin J, Lanctôt C, Tremblay JJ 1998 La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *médecine/sciences* 14:335-339
13. Gage PJ, Camper SA 1997 Pituitary homeobox 2, a novel member of the *bicoid*-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum Mol Genet* 6:457-464
14. Haugen BR, Wood WM, Gordon DF, Ridgway EC 1993 A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin beta promoter. *J Biol Chem* 268:20818-20824
15. Hermes E, Mackem S, Mahon KA 1996 Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* 122:41-52
16. Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG 1988 A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519-529
17. Knoepfler PS, Calvo KR, Chen H, Antonarakis SE, Kamps MP 1997 Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14553-14558
18. Ko LJ, Engel JD 1993 DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 13:4011-4022

19. Konzak KE, Moore DD 1992 Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing. *Mol Endocrinol* 6:241-247
20. Kozak M 1984 Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12:857-872
21. Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J 1996 Ptx1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev* 10:1284-1295
22. Lanctôt C, Gauthier Y, Drouin J 1998 Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. Submitted
23. Lanctôt C, Lamolet B, Drouin J 1997 The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 124:2807-2817
24. Logan M, Pagán-Westphal SM, Smith DM, Paganessi L, Tabin CJ 1998 The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 94:307-317
25. Lu Q, Kamps MP 1996 Structural determinants within Pbx1 that mediate cooperative DNA binding with pentapeptide-containing Hox proteins: proposal for a model of a Pbx1-Hox-DNA complex. *Mol Cell Biol* 16:1632-1640
26. Ma X, Yuan D, Diepold K, Scarborough T, Ma J 1996 The drosophila morphogenetic protein bicoid binds DNA cooperatively. *Development* 122:1195-1206
27. Mann RS, Chan SK 1996 Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins [published erratum appears in *Trends Genet* 1996 Aug;12(8):328]. *Trends Genet* 12:258-262
28. Morris AE, Kloss B, McChesney RE, Bancroft C, Chasin LA 1992 An alternatively spliced Pit-1 isoform altered in its ability to trans-activate. *Nucleic Acids Research* 20:1355-1361

29. Mucchielli ML, Mitsiadis TA, Raffo S, Brunet JF, Proust JP, Goridis C 1997 Mouse *Otx2*/RIEG expression in the odontogenic epithelium precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signal for its maintenance. *Dev Biol* 189:275-284
30. Mucchielli ML, Martinez S, Pattyn A, Goridis C, Brunet JF 1996 *Otx2*, an *Otx*-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol Cell Neurosci* 8:258-271
31. Peltenburg LTC, Murre C 1997 Specific residues in the PBX homeodomain differentially modulate the DNA-binding activity of Hox and engrailed proteins. *Development* 124:1089-1098
32. Phelan ML, Rambaldi I, Featherstone MS 1995 Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol Cell Biol* 15:3989-3997
33. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J 1997 Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17:5946-5951
34. Piedra ME, Icardo JM, Albajar M, Rodriguez-Rey JC, Ros MA 1998 *Pitx2* participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* 94:319-324
35. Poulin G, Turgeon B, Drouin J 1997 *NeuroD1*/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol Cell Biol* 17:6673-6682
36. Ryan AK, Blumberg B, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Tamura I, Tsukui T, de la Peña J, Sabbagh W, Greenwald J, Choe S, Norris DP, Robertson EJ, Evans RM, Rosenfeld MG, Izpisua Belmonte JC 1998 *Pitx2* determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 394:545-551
37. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467

38. Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC 1996 Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics* 14:392-399
39. Semina EV, Reiter RS, Murray J 1997 Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum Mol Genet* 6:2109-2116
40. Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H 1996 Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *Lhx3*. *Science* 272:1004-1007
41. Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG, Swanson LW 1990 Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev* 4:695-711
42. Smidt M, van Schaick HSA, Lanctôt C, Tremblay JJ, Cox JJ, van der Kleij AAM, Wolterink G, Drouin J, Burbach PH 1997 A homeodomain gene *PTX3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13305-13310
43. Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carriere C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG 1996 Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384:327-333
44. Szeto DP, Ryan AK, O'Connell SM, Rosenfeld MG 1996 P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7706-7710

45. Therrien M, Drouin J 1993 Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 13:2342-2353
46. Tremblay JJ, Drouin J 1998 Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance LH $\beta$  gene transcription. Submitted
47. Tremblay JJ, Gauthier Y, Drouin J 1998 Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that bypasses the need for ligand. Submitted
48. Tremblay JJ, Lanctôt C, Drouin J 1998 The Pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol* 12:428-441
49. Voss JW, Wilson L, Rhodes SJ, Rosenfeld MG 1993 An alternative Pit-1 RNA splicing product reveals modular binding and nonmodular transcriptional activities of the POU-specific domain. *Mol Endocrinol* 7:1551-1560
50. Wilson DS, Sheng G, Jun S, Desplan C 1996 Conservation and diversification in homeodomain-dna interactions: a comparative genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6886-6891
51. Yoshioka H, Meno C, Koshiba K, Sugihara M, Itoh H, Ishimaru Y, Inoue T, Ohuchi H, Semina EV, Murray JC, Hamada H, Noji S 1998 Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94:299-305

## CHAPITRE IV

### **Ptx1 Regulates SF-1 Activity by An Interaction that Bypasses the Need for Ligand**

Jacques J. Tremblay, Yves Gauthier and Jacques Drouin

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

Soumis.



## INTRODUCTION AU CHAPITRE

J'ai montré au chapitre II que l'homéoprotéine Ptx1 agit de façon synergique avec le récepteur nucléaire orphelin SF-1 sur le promoteur LH $\beta$  dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse. Une étude détaillée de cette coopération transcriptionnelle est présentée dans ce chapitre. Cette étude a mené à la description d'un nouveau mécanisme pour l'activation du récepteur nucléaire SF-1.

## RÉSUMÉ

Ptx1 est un facteur de transcription à boîte homéo de type bicoïde exprimé dès l'initiation du programme de différenciation hypophysaire. Il coopère avec des facteurs d'expression restreinte tels Pit1, NeuroD1 et SF-1, établissant ainsi un code pour l'expression cellule-spécifique des gènes hypophysaires. La synergie transcriptionnelle entre Ptx1 et SF-1 sur deux gènes cibles de SF-1, LH $\beta$  de l'hypophyse et MIS (Müllerian-inhibiting substance) des gonades, requiert la liaison de SF-1 à l'ADN mais non celle de Ptx1. Cette synergie semble dépendre d'une interaction directe entre ces deux protéines. En fait, l'interaction entre le domaine C-terminal de Ptx1 et la moitié N-terminale de SF-1 résulte en une activation synergique de la transcription similaire à celle obtenue avec un mutant de SF-1 dont le domaine de liaison du ligand (LBD) a été supprimé, le rendant constitutivement actif, suggérant que le LBD masque le domaine d'activation de SF-1. Cette interaction entre Ptx1 et SF-1 simule l'effet de la liaison d'un ligand hypothétique à SF-1 qui mènerait à un changement de conformation dans le récepteur exposant ainsi le domaine d'activation de SF-1. Par conséquent, cette interaction entre une homéoprotéine et un récepteur nucléaire représente un nouveau mécanisme d'activation des récepteurs nucléaires. Dans ce mécanisme, l'interaction entre les deux protéines contourne la nécessité d'un ligand pour l'activation du récepteur nucléaire. Ainsi, Ptx1 agit comme un modulateur de l'activité de SF-1.

**ABSTRACT**

Ptx1 is a *bicoid*-related homeobox transcription factor expressed from the onset of pituitary development. It was shown to cooperate with cell-restricted factors, such as Pit1, NeuroD1/Pan1 and SF-1, to establish a combinatorial code conferring lineage- and promoter-specific gene transcription in the pituitary. Transcriptional synergism between Ptx1 and SF-1 on two SF-1 target genes, pituitary LH $\beta$  and Müllerian-inhibiting substance (MIS), requires SF-1 binding to DNA and appears to result from direct physical interaction between these two proteins. The interaction between the C-terminus of Ptx1 and the N-terminal half of SF-1 results in transcriptional enhancement that mimics the effect of SF-1 ligand and that equals that of a constitutively active SF-1 mutant. Thus, the unmasking of SF-1 activity by Ptx1 may represent a developmental mechanism to alleviate the need for SF-1 ligand in transcription and, possibly at critical times during organogenesis.

## INTRODUCTION

The Ptx family of transcription factors is a recently identified class of *bicoid*-related homeoproteins that are thought to be involved in the development of anterior structures. To date, three Ptx genes have been cloned from various species: Ptx1 (Lamonerie et al. 1996; Szeto et al. 1996; Muccielli et al. 1996; Shang et al. 1997; Vorbruggen et al. 1997), Ptx2 (Gage et al. 1997; Muccielli et al. 1996; Semina et al. 1996) and Ptx3 (Smidt et al. 1997; Semina et al. 1997). Ptx1, the founding member of this family, was cloned as a regulator of pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression in pituitary corticotrope cells (Lamonerie et al. 1996), whereas Ptx2 was first identified as the causative gene for Rieger's syndrome (Semina et al. 1996). Expression of Ptx1 and Ptx2 is detected in the stomodeum at embryonic day 8 (E8) and, subsequently, is maintained in all stomodeal derivatives, including Rathke's pouch, the pituitary anlage (Lanctôt et al. 1997; Muccielli et al. 1996). Thus, Ptx1 and Ptx2 represent the earliest known markers of pituitary organogenesis. Moreover, antisense RNA experiments have shown that Lim3/Lhx3 gene expression, a gene crucial for proper pituitary development (Sheng et al. 1996), requires Ptx1, thus placing Ptx1 upstream of Lim3/Lhx3 in the cascade of regulators involved in pituitary development (Tremblay et al. 1998). In contrast, Ptx3, the newest member of the family, is not expressed in the pituitary but rather in midbrain dopaminergic neurons and in the eyes (Smidt et al. 1997; Semina et al. 1997). No target gene has yet been identified for Ptx3.

The Ptx1 transcription factor is present throughout pituitary development and in all adult pituitary cell lineages, albeit at different levels (Tremblay et al. 1998; Lanctôt et al. submitted). Consistent with this observation, Ptx1 was found to activate transcription of a large set of pituitary target genes (Tremblay et al. 1998; Lamonerie et al. 1996; Szeto et al. 1996). Ptx1 was shown to be particularly important for transcription of genes specific for the gonadotrope lineage, the pituitary cell type in which Ptx1 protein is most

abundant (Lanctôt et al. submitted): these include the genes for glycoprotein hormone subunit  $\alpha$  ( $\alpha$ GSU) and luteinizing hormone (LH $\beta$ ) (Tremblay et al. 1998). However, since each Ptx1 target gene is expressed in a cell-restricted manner in the pituitary whereas Ptx1 is not, it is clear that Ptx1 alone cannot account for their lineage-specific expression. This specificity appears to be achieved by cooperation between Ptx1 and cell-restricted factors (Tremblay et al. 1998; Poulin et al. 1997; Szeto et al. 1996). For example, Ptx1 interacts with the somatotrope-, lactotrope- and thyrotrope-restricted factor Pit1, to synergistically activate the prolactin (PRL) promoter and, to a lesser extent, the growth hormone (GH) promoter (Tremblay et al. 1998; Szeto et al. 1996). In corticotrope cells, Ptx1 specifically cooperates with the bHLH heterodimer, NeuroD1/Pan1, to activate the pro-opiomelanocortin (POMC) promoter (Poulin et al. 1997). Finally, in gonadotropes, we have recently reported that Ptx1 activates the LH $\beta$  promoter in synergy with the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 (SF-1) (Tremblay et al. 1998). Thus, Ptx1 appears to work in a combinatorial code to confer lineage- and promoter-specific gene transcription in the pituitary gland.

The orphan nuclear receptor SF-1 was first isolated as an essential regulator of the P450 hydroxylases in the adrenal gland and gonads (Lala et al. 1992; Ikeda et al. 1993; Parker et al. 1997). Its expression, however, is not limited to steroidogenic tissues as it is also found in the pituitary and ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH; Ikeda et al. 1994; Ingraham et al. 1994; Ikeda et al. 1995). SF-1 knockout mice lack adrenal glands and gonads (Luo et al. 1994; Sadovsky et al. 1995), exhibit VMH abnormalities, and male mice have female internal genitalia due to the absence of Müllerian-inhibiting substance (MIS), a key hormone involved in male sex differentiation (Luo et al. 1994). The MIS gene was shown to be a direct target of SF-1 action (Giulli et al. 1997). SF-1<sup>-/-</sup> mice also have markedly reduced mRNA levels for several pituitary-

specific genes such as  $\alpha$ GSU, LH $\beta$ , follicle stimulating hormone (FSH $\beta$ ), and the gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R) (Ikeda et al. 1995; Shinoda et al. 1995). Although SF-1 was cloned six years ago (Lala et al. 1992), putative ligands for this nuclear receptor have only recently been described. Indeed, Lala et al. reported that hydroxycholesterol (OHC) steroidogenic intermediates or their derivatives, enhance SF-1-dependent transcription (Lala et al. 1997). As for other ligand-activated receptors, the enhancement of SF-1 activity by OHC requires the C-terminal ligand-binding domain (LBD) of SF-1 (Lala et al. 1997). Although these OHC are naturally present in steroidogenic tissues, they are not thought to be synthesized in pituitary gonadotrope cells that express SF-1. This strongly suggests that a different set of ligand(s) or cofactor(s) is involved in the modulation of SF-1 activity in this tissue.

SF-1 binds and activates the pituitary LH $\beta$  gene (Halvorson et al. 1996; Keri et al. 1996). The LH $\beta$  promoter contains binding sites for Ptx1 and SF-1 that are 20 bp apart. These two regulatory elements and their relative position within the LH $\beta$  promoter, are conserved in many species (Tremblay et al. 1998; Halvorson et al. 1996; Keri et al. 1996). Although each factor can individually activate the LH $\beta$  promoter (Tremblay et al. 1998; Halvorson et al. 1996; Keri et al. 1996), coexpression of both results in a strong synergistic activation (Tremblay et al. 1998). We now show that these two factors interact with each other through specific domains and that the resulting enhancement of transcription (observed both on LH $\beta$  and MIS promoters) mimics the activation of SF-1 by its ligand or by deletion of its LBD. These data suggest that Ptx1 acts as a modulator of SF-1 activity by relieving its ligand requirement.

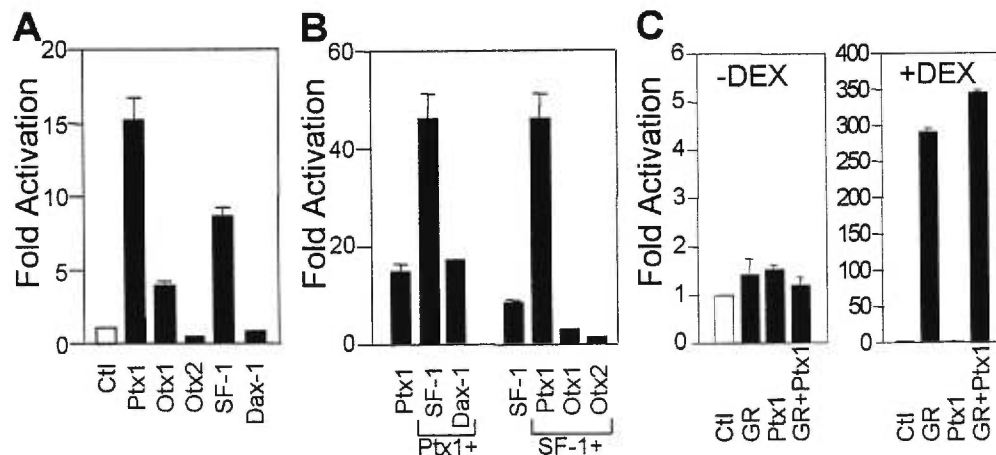
## RESULTS

### Specificity of Ptx1 and SF-1 Synergism for Activation of LH $\beta$ Promoter

We recently showed that Ptx1 cooperates with SF-1 to synergistically activate the LH $\beta$  promoter (Tremblay et al. 1998). To determine whether this synergism is specific to Ptx1 and SF-1, we tested the ability of two other *bicoid*-related homeoproteins, Otx1 and Otx2, and of two nuclear receptors, the glucocorticoid receptor (GR) and Dax-1 to synergistically enhance transcription. Dax-1 is coexpressed with SF-1 in pituitary gonadotropes (Ikeda et al. 1996) and, although Otx1 is expressed in the pituitary, Otx2 is not found in this tissue (Acampora et al. 1998). In contrast to Ptx1 and SF-1, Otx1 weakly activated the LH $\beta$  promoter whereas Otx2 and Dax-1 did not transactivate at all (Fig. 4-1A). Moreover, when these factors were tested in combination, synergistic activation of the LH $\beta$  promoter was observed only between Ptx1 and SF-1 (Fig. 4-1B). As for Otx1 and Otx2, SF-1 could not synergize with two other *paired*-class homeoproteins expressed in pituitary gonadotropes, Pax6 and Six3 (data not shown). Transactivation by GR was not affected by Ptx1 whether basal or hormone-stimulated transcription was assessed (Fig. 4-1C). These results indicate that the cooperation between SF-1 and *bicoid*-related homeoproteins is restricted to the Ptx-subfamily of factors. Consistent with this observation, Ptx2 and Ptx1b, a Ptx1 isoform, can also synergize with SF-1 (Tremblay JJ and Drouin J, in prep.). Interestingly, the Ptx1 and Ptx1b isoforms differ solely in their N-terminus. Since both Ptx1 isoforms can synergize with SF-1, this suggests that the N-terminal domain of Ptx1 is not likely to be involved in the synergy with SF-1.

### Ptx1/SF-1 Synergism Requires SF-1, but not a Ptx1, Binding Site

The LH $\beta$  promoter contains several consensus Ptx1 binding sites and a single SF-1 element that are conserved across species (Tremblay et al. 1998; Halvorson et al. 1996; Keri et al. 1996). Since we have recently shown that the proximal Ptx1 binding



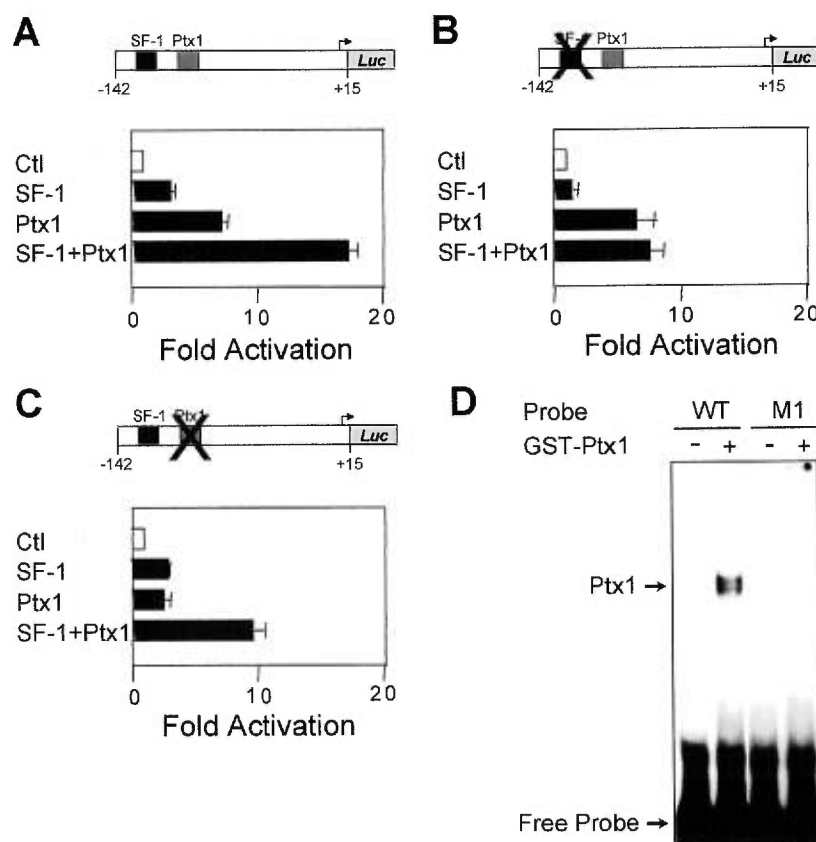
**Fig. 4-1.** Ptx1 and SF-1 Synergize on the LH $\beta$  promoter.

(A) The effects of Ptx1 and two other *bicoid*-related homeoproteins, Otx1 and Otx2, and of SF-1 and Dax-1, another nuclear receptor, were tested on the -776 bp bovine LH $\beta$  promoter. The LH $\beta$  reporter was cotransfected in CV-1 cells with a control plasmid (empty expression vector, open bar) or an expression vector for Ptx1, Otx1, Otx2, SF-1 and Dax-1 (solid bars). (B) Ptx1 and SF-1 transcriptionally cooperate. The combination of Ptx1 with SF-1 or Dax-1, and of SF-1 with Ptx1, Otx1 or Otx2 were tested for their ability to synergize on the same reporter. Note the difference in scale between A and B. (C) Ptx1 does not affect GR-dependent transcription. A GRE-containing reporter (Drouin et al. 1993) was transfected into CV-1 cells together with expression vectors for GR and/or Ptx1, and in presence or absence of the synthetic glucocorticoid, dexamethasone (DEX)  $10^{-7}$ M. Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM).

site present at -95 bp is sufficient for activation by Ptx1 (Tremblay et al. 1998), we generated a -142 bp LH $\beta$  promoter construct that retains the SF-1 site located at -120 bp and the proximal Ptx1 binding site. This shorter promoter fragment still exhibited transcriptional enhancement between the factors (Fig. 4-2A) and it was used to define



the mechanism of cooperation between SF-1 and Ptx1. We have previously shown that Ptx1/SF-1 synergism is lost when the SF-1 binding site is deleted (Tremblay et al. 1998). Similarly, we show here that mutagenesis of two nucleotides within the SF-1 element does not allow synergism with Ptx1 (Fig. 4-2B); this mutation was previously shown to impair SF-1 binding and transactivation (Halvorson et al. 1996; Keri et al. 1996). Conversely, a mutation of the Ptx1 binding site did not prevent enhancement of SF-1 activity by Ptx1 (Fig. 4-2C); this mutation was previously shown to abolish Ptx1-dependent transcription (Lamonerie et al. 1996) and it no longer bound Ptx1 *in vitro* (Fig. 4-2D). The weak activation of this mutant promoter by Ptx1 could suggest the presence



**Fig. 4-2.** The Synergy between Ptx1 and SF-1 Requires the SF-1, but Not the Ptx1, Binding Site.

Transactivation by either Ptx1, SF-1 or both factors was tested on three -142 bp bovine LH $\beta$  reporters: (A) the wild-type promoter that contains binding sites for SF-1 and Ptx1, (B) a reporter with a mutation in the SF-1 site (Halvorson et al. 1996; Keri et al. 1996),

and (C) a reporter with a mutation in the Ptx1 site (Lamonerie et al. 1996). Promoter constructs were cotransfected in CV-1 cells with the indicated expression plasmids. (D) The Ptx1 site mutant does not bind GST-Ptx1 *in vitro*. Gel retardation was performed as described previously (Lamonerie et al. 1996) using oligonucleotide probes for either wild-type (WT) or mutant (M1) Ptx1 binding sites. Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM).

of cryptic Ptx1 binding to the reporter plasmid: although such possibility is difficult to rule out completely, we have found a similar 1.5 to 2-fold effect on many other promoters that do not contain Ptx1 binding sites. For example, a short POMC gene promoter fragment (-35/+63 bp) and the herpes simplex virus thymidine kinase promoter responded similarly to Ptx1 (data not shown), as did minimal LH $\beta$  (-33 bp) and  $\alpha$ GSU (-65 bp) promoters (Tremblay et al. 1998). We take these small effects to be non-specific. Taken together, these observations suggest that Ptx1 binding to DNA is not required for synergy with SF-1 and that synergy observed with a reporter containing only an SF-1 site might result from modulation of SF-1 activity by a direct protein-protein interaction with Ptx1.

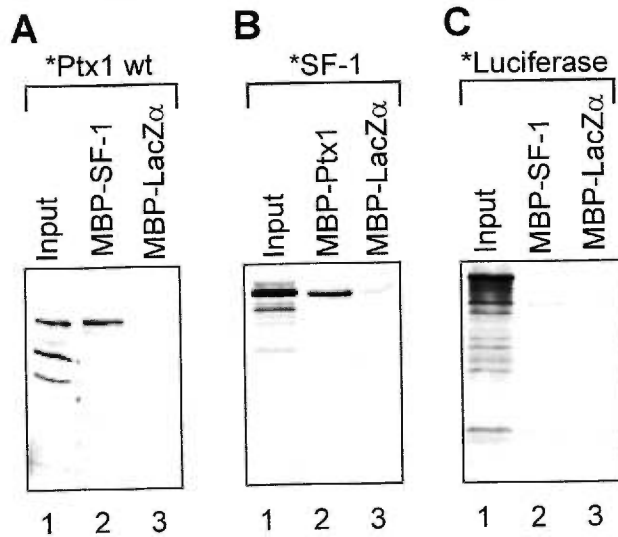
#### **Ptx1 and SF-1 Interact Directly**

In order to test this hypothesis, we assessed whether the two factors interact directly using the pull-down assay. As shown in Figure 4-3A, an immobilized MBP-SF-1 fusion protein specifically retained *in vitro* translated <sup>35</sup>S-labeled Ptx1 whereas an unrelated MBP-LacZ $\alpha$  fusion did not, indicating that the Ptx1/MBP-SF-1 interaction is not mediated by MBP itself. Reciprocal results were obtained when Ptx1 was linked to MBP and labeled SF-1 was used (Fig. 4-3B). The Ptx1/SF-1 interaction was further shown to be specific since no interaction was observed with luciferase protein as control (Fig. 4-3C).

#### **Mapping of Ptx1 Domain Interacting with SF-1**

***Transactivation by Ptx1 Mutants.*** The transcriptional properties of Ptx1 have not yet been dissected. In order to interpret a detailed analysis of Ptx1/SF-1 interaction, we first defined transcriptionally active domains of Ptx1 using a series of Ptx1 mutants (Fig. 4-4A). The DNA-binding properties of the Ptx1 mutants were first tested in gel shift

assays (Fig. 4-4B). Specific binding was observed with all mutants except those ( $\Delta C_5$ ,  $\Delta C_6$ , K139A) that affect the homeodomain (HD; Fig. 4-4B). The expression of these



**Fig. 4-3.** Ptx1 and SF-1 Interact Directly.

Pull-down assays were performed using immobilized, bacterially produced MBP fusion proteins (MBP-SF-1, MBP-Ptx1 and MBP-LacZ $\alpha$  as control) with *in vitro* translated  $^{35}\text{S}$ -labeled Ptx1 (A), SF-1 (B) or luciferase (C). Bound proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis and visualized by autoradiography. An aliquot of input protein corresponding to 20% of labeled protein used in the assay is shown for comparison.

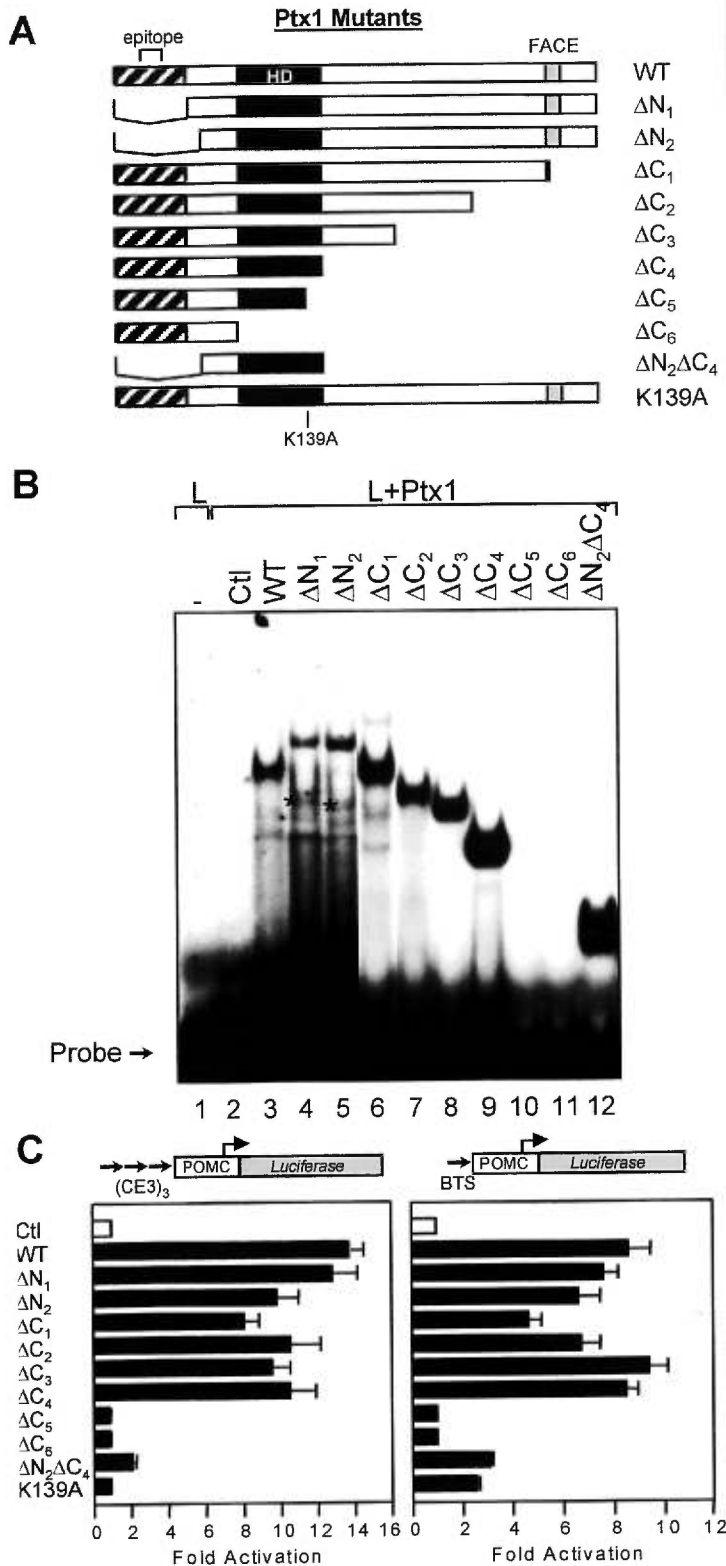
three non-binding mutants was verified by western blot using a Ptx1-specific antibody (data not shown). Both gel retardation and western blot assays were done using nuclear extracts and they revealed similar expression levels in the nucleus for the various mutants.

The level of expression could not be assessed as thoroughly for the N-terminal deletion mutants ( $\Delta N_1$  and  $\Delta N_2$ ) because the deleted region contains the epitopes against which Ptx1 antiserum was raised. In addition, the mutants behaved differently in gel retardation; indeed, they formed only a limited amount of DNA-bound complexes that may be Ptx1 monomers (Fig. 4-4B, lanes 4 and 5, asterisk) but, contrary to other Ptx1 proteins, they also exhibited slower migrating complexes that may be dimeric.

Nonetheless, they showed transcriptional activity that was similar to that of wild-type Ptx1 (Fig. 4-4C).

The transcriptional properties of the Ptx1 mutants were tested using two simple promoters. The first one consisted of three copies of the POMC promoter Ptx1-binding site (Lamonerie et al. 1996), whereas the second contained a single copy of the *bicoid* target site (BTS) from *drosophila hunchback* (Driever et al. 1989; Simeone et al. 1993). As shown in Figure 4-4C, deletion of either N- or C-terminal domains did not affect the ability of Ptx1 to transactivate the two reporters. However, deletion of both (mutant  $\Delta N_2\Delta C_4$  which retains the HD and nuclear localization signal) no longer activated transcription. As expected, deletion within the homeodomain ( $\Delta C_5$  and  $\Delta C_6$ ) or replacement of Lys 139 by Ala (this is Lys 50 of the HD) abolished transcriptional activity (Fig. 4-4C). Taken together, these results suggest that Ptx1 contains two independent transactivation domains located in the N- and C-terminal regions and that only one of these is required for transactivation of simple reporters.

**Synergism between Ptx1 and SF-1.** The ability of these mutants to activate the -142 bp LH $\beta$  reporter and to synergize with SF-1 was then evaluated. Contrary to its activity on simple reporters (Fig. 4-4C), the Ptx1 N-terminus did not appear sufficient for transactivation on this promoter, as revealed by mutant  $\Delta C_4$  (Fig. 4-5A). Mapping of Ptx1 C-terminal sequences required for activation of the LH $\beta$  promoter revealed that important sequences lie between the end point of mutant  $\Delta C_2$  and the C-terminus. These results suggest that N- or C-terminal transactivation domains of Ptx1 may be active depending on promoter context. This idea was further supported by experiments showing that other pituitary hormone promoters (POMC,  $\alpha$ GSU, GH and TSH $\beta$ ) exhibit a pattern of activity for Ptx1 mutants similar to that of the simple promoters shown in Figure 4-4C (data not shown).

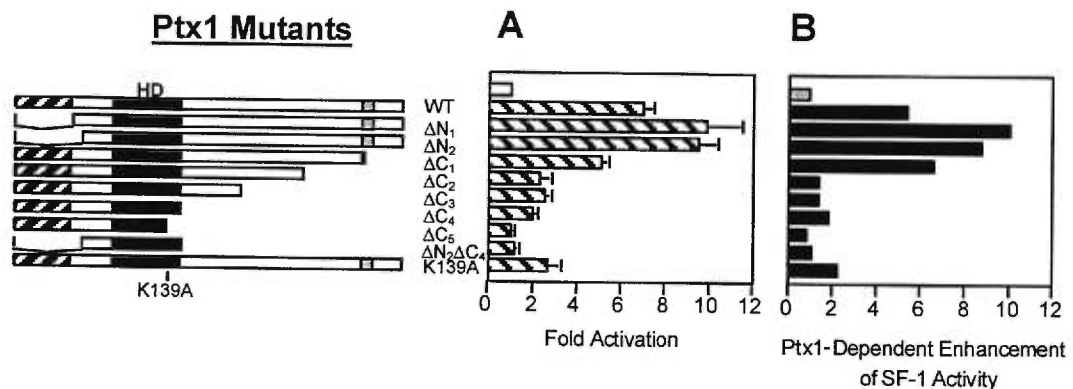


**Fig. 4-4. Ptx1 Contains two Independent Activation Domains.**

(A) Schematic representation of Ptx1 mutants used in the present study. The hatched box delineates the Ptx1-specific (compared to the Ptx1b isoform) N-terminal domain, the black box represents the homeodomain (HD) and the grey-shaded box, the FACE domain. The FACE domain is a 14 amino acid region conserved within homeoproteins that share expression in craniofacial structures during development (Semina et al. 1996). A Ptx1-specific antiserum was raised against epitopes within the N-terminal region. (B) The DNA-binding properties and expression levels of the mutants were assessed in gel retardation assays using the Ptx1 binding site of the POMC gene (Lamonerie et al. 1996) as probe and nuclear extracts from L cells transfected with expression vectors for the various mutants. Asterisks in lanes 4 and 5 identify bands of the expected size for the two N-terminal mutants. (C) Transactivation properties of Ptx1 mutants. The effect of each Ptx1 mutant was tested on two simple reporters by cotransfection in L cells. The reporters contain either three copies of the Ptx1 binding site of the POMC gene (Lamonerie et al.

1996) or one copy of the *bicoid* target site (BTS) found in the *drosophila hunchback* gene (Driever et al. 1989; Simeone et al. 1993) fused to the minimal POMC promoter (Therrien et al. 1991) and cloned upstream of luciferase. Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM).

When Ptx1 mutants were tested in the presence of SF-1, it appeared that a region of 49 amino acids, located between positions 234 and 283, was required for synergy since mutant  $\Delta C_1$  synergized with SF-1 whereas mutant  $\Delta C_2$  did not (Fig. 4-5B). Interestingly, mutant K139A did not show strong synergy with SF-1 (Fig. 4-5B), suggesting that an intact HD is required for synergism despite the fact that DNA binding is not *per se* required (Fig. 4-2C).

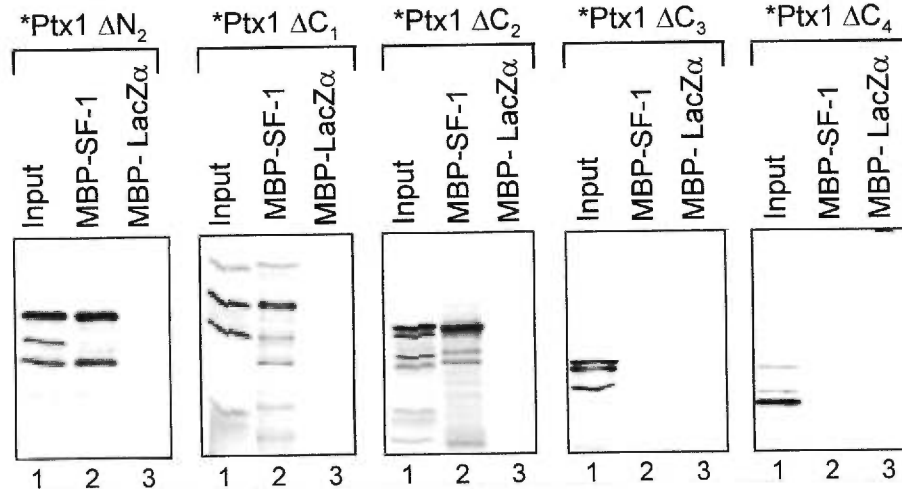


**Fig. 4-5.** The C-Terminal Domain of Ptx1 Is Required for Synergy with SF-1.

CV-1 cells were cotransfected with the bovine -142 bp LH $\beta$  reporter along with: (A) empty expression vector as control (open bar) or expression vectors for Ptx1 mutants (hatched bars), (B) an SF-1 expression vector alone (grey bar) or in combination with the Ptx1 mutants (solid black bars). Results are shown either as fold activation  $\pm$  SEM (A) or as Ptx1-dependent enhancement of SF-1 activity (B). The latter represents the ratio between the activity of the reporter in the presence of SF-1 and the various Ptx1 deletion mutants over the activity of the reporter in the presence of SF-1 alone. A value of 1 represents no synergy.

The region of physical interaction between Ptx1 and SF-1 was next identified using the pull-down assay. As for transactivation and synergism (Fig. 4-5), the N-terminus was not required for physical interaction with SF-1 (mutant  $\Delta N_2$ , Fig. 4-6). A 37 amino acid region, located in the C-terminus between residues 197 ( $\Delta C_3$ ) and 234 ( $\Delta C_2$ ) was essential for interaction with SF-1 since the former no longer interacted with MBP-SF-1 (Fig. 4-6). Taken together, these results indicate that different but contiguous

subdomains of the Ptx1 C-terminus are involved in transcriptional activation and in physical interaction between the factors.



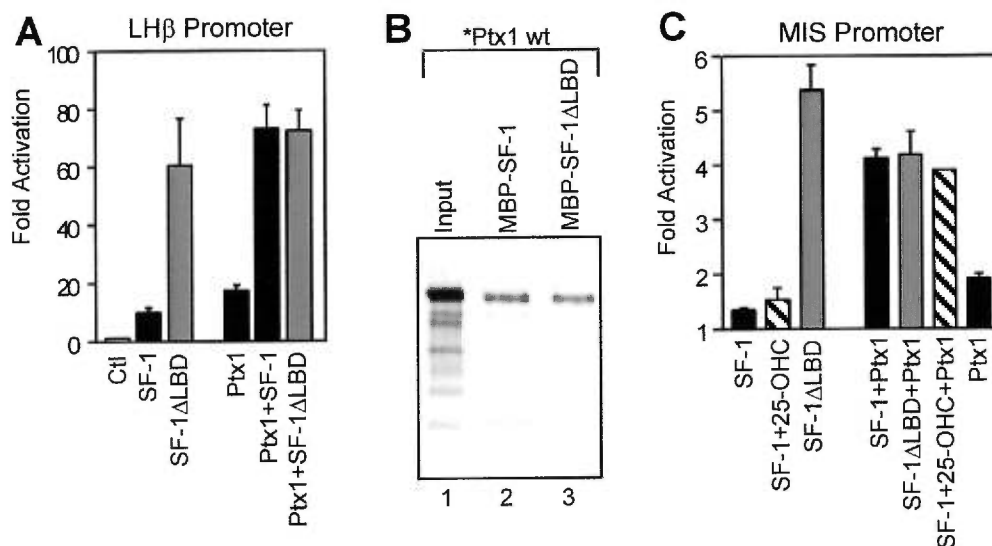
**Fig. 4-6.** Interaction Domain with SF-1 Maps to a 37 amino acids C-Terminal Region of Ptx1.

The indicated Ptx1 mutants (Fig. 4-4A) were labeled by *in vitro* translation and tested for binding to MBP-SF-1 or to MBP-LacZ $\alpha$  as control. Bound proteins were separated on SDS-PAGE and visualized by autoradiography. The input sample contains 20% of the labeled protein used in the assay.

### Ptx1 Modulates SF-1 Activity

Although SF-1 is expressed in the pituitary and is involved in the regulation of the LH $\beta$  gene (Halvorson et al. 1996; Keri et al. 1996; Ikeda et al. 1995), the ligand that may modulate its activity in this tissue remains unknown. However, Shen et al. have shown that deletion of the putative ligand-binding domain of SF-1 (SF-1 $\Delta$ LBD) increased transcriptional activity of SF-1 and suggested that this mimicked the effect of ligand (Shen et al. 1994). To explore this possibility, we compared the ability of SF-1 $\Delta$ LBD and SF-1 to activate the LH $\beta$  promoter and to synergize with Ptx1. SF-1 $\Delta$ LBD was markedly

more active on the LH $\beta$  promoter than SF-1, in agreement with the model that the SF-1 LBD represses transactivation function (Fig. 4-7A). Interestingly, SF-1 $\Delta$ LBD did not synergize with Ptx1. In fact, the activity of SF-1 $\Delta$ LBD was identical to the synergistic action of SF-1 and Ptx1, suggesting that the Ptx1/SF-1 interaction has the same unmasking effect as deletion of the SF-1 LBD. The absence of synergism between SF-1 $\Delta$ LBD and Ptx1 was not due to a loss of interaction between them since they still interact in the pull-down assay (Fig. 4-7B).



**Fig. 4-7.** Ptx1 Interaction Unmasks SF-1 Activity.

(A) Wild-type SF-1 (SF-1) or an SF-1 mutant deleted of its LBD (SF-1 $\Delta$ LBD) were tested either alone or in combination with Ptx1 for activation of the bovine LH $\beta$  reporter. Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM). (B) Ptx1 still interacts with SF-1 $\Delta$ LBD. Pull-down assays were performed using the full-length  $^{35}$ S-labeled Ptx1 protein and immobilized MBP-SF1 or MBP-SF-1 $\Delta$ LBD. Protein complexes were separated on SDS-PAGE and visualized by autoradiography. (C) Synergism between Ptx1 and SF-1 on the MIS promoter which does not have a Ptx1 binding site. The experiment was performed as in A. In addition, the putative SF-1 ligand, 25-hydroxycholesterol, was tested at a concentration of  $10^{-5}$ M (Lala et al. 1997).



Since the unmasking effect of deleting the SF-1 LBD was previously shown to operate on the MIS promoter (Shen et al. 1994), we tested whether Ptx1 may have a similar effect in this system as well. Indeed, we found very similar cooperation between Ptx1 and SF-1 on this promoter as on the LH $\beta$  promoter (Fig. 4-7C), despite the absence of a Ptx1 binding site in the MIS promoter. The effect of the recently identified putative SF-1 ligand (Lala et al. 1997) was assessed in this system. 25-OH-cholesterol only weakly activated SF-1 and much less than observed with the SF-1 LBD deletion or the synergistic activation by Ptx1 (Fig. 4-7C). Taken together, these data suggest that Ptx1 (or another member of the Ptx family) acts as a modulating cofactor of SF-1 and that this action may mimic the role of the liganded SF-1 LBD.

## DISCUSSION

So far, only one class of putative ligands, all hydroxycholesterols (Lala et al. 1997), have been proposed as SF-1 ligands, although they only weakly activate SF-1 (Fig. 4-7C). Future work will tell whether more effective SF-1 ligands exist and whether these play a significant regulatory role. The present work revealed that enhancement of SF-1-dependent transcription can be achieved by interaction with a transcription factor that acts as a modulatory cofactor in the absence of ligand. In the context of pituitary development, the Ptx1/SF-1 synergism is consistent with the establishment of a regulatory code during organogenesis and cell differentiation in which a pituitary-restricted factor, Ptx1, collaborates with a lineage-restricted factor, SF-1, for activation for a cell-specific gene expression program (Tremblay et al. 1998). In such a model, the requirement for an SF-1 ligand may be bypassed by another regulatory process, like the tissue-restricted expression of Ptx1 that is turned on at a specific developmental stage.

### Organisation of Ptx1 transcription factor

Deletion analysis of Ptx1 revealed two independent activation domains located on each side of the HD (Fig. 4-4C). Both Ptx1 N- and C-termini contain proline- and serine-rich motifs (Lamonerie et al. 1996 and Fig. 4-8A) that are known to function as activation domains in other transcription factors (Gerber et al. 1994). The activity of these domains is, however, dependent on promoter context as only the C-terminal activation domain is contributing to Ptx1-dependent activation of the LH $\beta$  promoter (Fig. 4-5A). Such promoter dependence has been documented for other transcription factors, like, for example, the retinoic acid and estrogen receptors (Nagpal et al. 1992; Tora et al. 1989). The Ptx1 C-terminal activation domain appears to be primarily located between amino acids 234 and 283 (Fig. 4-8A). Interestingly, this region does not include the FACE motif, a stretch of 14 amino acids conserved within homeoproteins that share expression in craniofacial structures during development (Semina et al. 1996). No function has yet been ascribed to this motif. The same Ptx1 C-terminal activation domain was found to be essential for synergism with SF-1 (Fig. 4-5B).

### Mechanism of Ptx1/SF-1 Synergism

We have shown that synergism between Ptx1 and SF-1 is specific to the Ptx family of *bicoid*-related homeoproteins since Otx1 and Otx2, two closely related factors, failed to synergize with SF-1 (Fig. 4-1). Consistent with this, two other Ptx family members, Ptx1b (a Ptx1 isoform) and Ptx2, also synergize with SF-1 (Tremblay JJ and Drouin J, in prep.). We have previously shown that pituitary gonadotropes contain almost exclusively Ptx1 protein despite the presence of Ptx1b and Ptx2 mRNA in these cells (Tremblay et al. 1998; Tremblay JJ and Drouin J, in prep.), indicating that Ptx1 is most likely to cooperate with SF-1 for the control of LH $\beta$  transcription. It is noteworthy that Otx1 does not synergize with SF-1 (Fig. 4-1B) despite the similarity of Ptx and Otx

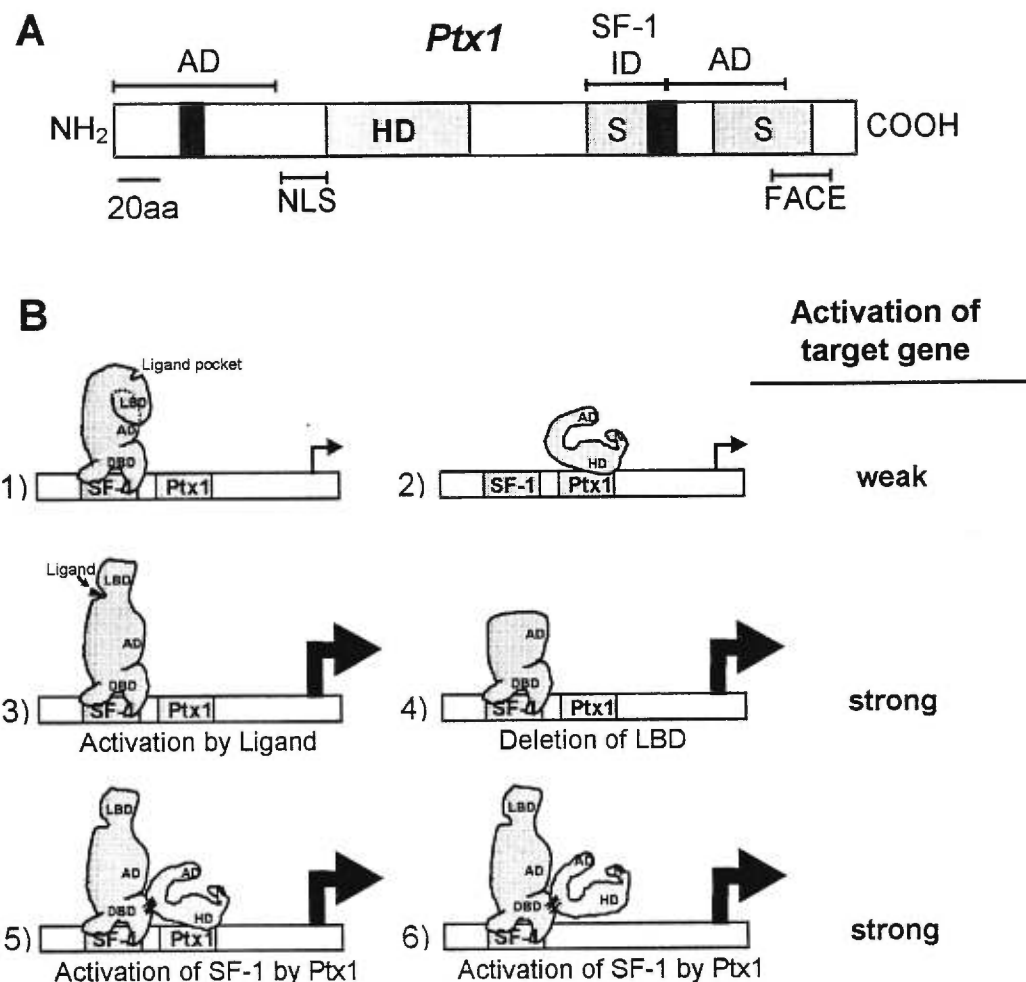
DNA binding specificity (Drouin et al. 1997; Drouin et al. 1998) and the activation of the LH $\beta$  promoter by Otx1 (Fig. 4-1A and Acampora et al. 1998). The physical interaction between Ptx1 and SF-1 was mapped to a 37 amino acid segment of Ptx1, between amino acids 197 and 234 (Fig. 4-6), that lies just upstream of the transactivation domain (Fig. 4-8A). This segment is highly conserved between Ptx1 and Ptx2, with 29 conserved residues, but not at all in Otx1 or Otx2 (data not shown). The cooperation between Ptx1 (a homeoprotein) and SF-1 (a nuclear receptor) is reminiscent of the interaction between Ftz-F1, the *Drosophila* homolog of SF-1, and the homeoprotein Ftz (Yu et al. 1997; Guichet et al. 1997). Despite the apparent conservation of a mechanism for synergism, the protein interfaces involved in these interactions do not reveal significant conservation of primary sequences.

The direct interaction between Ptx1 and SF-1 raises the formal possibility that DNA binding of either factor may be sufficient for synergism, as was shown for the interaction between myogenic bHLH factors and MEF2 (Molkentin et al. 1995). In contrast, we found that DNA binding was required for SF-1 but not for Ptx1 (Fig. 4-2). These observations suggest that Ptx1 can modulate SF-1 activity by a DNA-independent protein-protein interaction. We have documented this protein-protein interaction (Figs. 4-3 and 4-6) and, furthermore, we have shown that it is functional on a natural promoter that is devoid of Ptx1 binding site and that is an SF-1 target gene, MIS (Shen et al. 1994; Giuli et al. 1997). Indeed, Ptx1 greatly enhanced SF-1-dependent activation of the MIS promoter (Fig. 4-7C).

#### **Ptx1 as Modulatory Cofactor of SF-1 Activity**

Although SF-1 plays critical roles in several tissues, little is known about the molecular mechanism that controls SF-1 activity. A recent study reported the identification of various hydroxycholesterols as putative ligands for SF-1 (Lala et al. 1997). As for other nuclear receptors, the SF-1 LBD is required for hydroxycholesterol-

mediated transcription. Another study has also shown the importance of the unliganded SF-1 LBD as a repressor of SF-1 activity (Shen et al. 1994). Indeed, it was shown that deletion of the LBD unmasks the SF-1 transcriptional activity and it is only under these conditions that activation of the SF-1 target gene MIS (Giulii et al. 1997) could be observed. Taken together, these results suggest that SF-1 requires a ligand to induce transcription of target genes. Our studies of the LH $\beta$  promoter activation by SF-1 have supported this model by showing enhanced activity of SF-1 $\Delta$ LBD compared to SF-1 (Fig. 4-7A). Moreover, we have shown that enhancement of SF-1 activity by LBD deletion is greater than that achieved by the putative SF-1 ligand (Fig. 4-7C). But significantly, the synergy observed between Ptx1 and SF-1 on the LH $\beta$  and MIS promoters (Fig. 4-8B, model 5) resulted in the same activity as that of SF-1 $\Delta$ LBD (Fig. 4-8B, model 4), suggesting that Ptx1 interaction has a similar effect on SF-1 as LBD deletion or perhaps ligand binding (Fig. 4-8B, model 3). Thus, we propose that Ptx1 (or another Ptx family member) may function as a modulatory cofactor of SF-1 by unmasking its activation domain. The Ptx1 unmasking effect does not operate on all nuclear receptor LBDs as no effect was observed on GR (Fig. 4-1C). The similarity between the LBD deletion and Ptx1 unmasking effects suggests that both revealed the activity of the SF-1 proximal activation domain (Parker et al. 1997). Since ligand-induced activation would be expected to also activate the AF-2 domain, it cannot be excluded at this point that a more efficient SF-1 ligand (than those currently available) might further increase the activity of SF-1 and Ptx1-dependent promoters. Although not requiring Ptx1 interaction with DNA (Fig. 4-8B, model 6), the Ptx1 unmasking effect results in greater transcriptional activation on promoters that contain sites for both factors (compare Figs. 4-1B and 4-2A with Figs. 4-2C and 4-7C). In each case, however, the interaction appears to bypass the need for an SF-1 ligand.



**Fig. 4-8.** Ptx1 Modulates SF-1 Activity in the Pituitary.

(A) Schematic representation showing the position of the homeodomain (HD), of proline (P)- and serine (S)-rich motifs, and of the FACE domain as in Fig. 4-4. The position of a putative nuclear localization signal (NLS) is also shown along with the position of two transcriptional activation domain (AD) and of an SF-1 interaction domain (SF-1 ID) identified in the present work. The putative NLS was maintained in all Ptx1 mutants described in the present paper. In contrast, a mutant protein deleted of this region (between amino acids 68 and 84) was no longer detectable in nuclear extracts by gel shift assay (data not shown). (B) Model for Ptx1/SF-1 synergism. The weak transcriptional effects of SF-1 (1) and Ptx1 (2) depends on binding to their cognate sites. A putative ligand would activate SF-1 through LBD binding and unmasking of activation domain (3). A similar effect appears to be achieved by deletion of the LBD (4). The interaction of Ptx1 with SF-1 also appears to unmask transcriptional activity and thus bypass the need for ligand (5). Although the Ptx1/SF-1 synergism results in the strongest activation of transcription when binding sites for both factors are present in the target promoter (5), synergism is also observed in the absence of a Ptx1 binding site (6).

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture and Transfection Assays

Murine fibroblast L and African green monkey kidney fibroblast-like CV-1 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum. CV-1 and L cells were transfected by the calcium phosphate method (De Bold et al. 1983). Briefly, CV-1 and L cells were plated at 30000 and 75000 cells/well, respectively, in 12-well plates 24 hours prior to transfection. Transfection was carried out using 1.5  $\mu$ g of reporter plasmid, 0.25-1  $\mu$ g of effector plasmid(s), 0.25  $\mu$ g of RSV-hGH (human growth hormone) as internal control and a carrier DNA (Sp64 or Bluescript) up to a total of 5  $\mu$ g/well. Cells were rinsed 12-16 hours later and harvested the next morning. An aliquot of media was assayed for hGH by RIA (Immunocorp, Montréal). One hundred  $\mu$ l of lysis buffer containing 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% NP-40 and 5 mM DTT was applied directly on the cells, incubated at room temperature with agitation for 15 minutes and 80  $\mu$ l was assayed for luciferase activity using a LB953 Berthold Luminometer. Data are presented as means  $\pm$  SEM of 4 to 17 experiments, each performed in duplicate.

### Nuclear Extracts and Gel Retardation Assay

Nuclear microextracts were prepared from transfected L cells (Therrien et al. 1993). Ptx1 gel retardation assays were done as outlined by Lamonerie et al. (Lamonerie et al. 1996). Ptx1 wild-type (WT) and mutant M1 oligonucleotides used in gel retardation assays were described previously (Lamonerie et al. 1996).

### Plasmids and Oligonucleotides

N- and C-terminal deletions of Ptx1 as well as SF1 $\Delta$ LBD (Shen et al. 1994) were generated by PCR. The DAX-1 cDNA was obtained by RT-PCR using first strand cDNA from rat testis and subsequently subcloned in an RSV-driven expression vector

described elsewhere (Tremblay et al. 1998). Site-directed mutagenesis was used to convert the lysine at position 139 of Ptx1 (residue 50 of the homeodomain) to an alanine using the pALTER (Promega) system according to the manufacturer's recommendations. LH $\beta$  promoter deletion to -142 bp was generated by PCR. The resulting *KpnI/HindIII* fragment was subcloned in the corresponding sites of a modified pGL2-Basic vector (Promega) which was previously deleted of its *SmaI* site. Mutations of the SF-1 and Ptx1 binding sites were also generated by PCR using the following primers showing mutation in bold: 1) SF-1 site mutation (with *KpnI* site added): 5'-ATGGTA<sup>-142</sup>CCACTCTTGCCTCTCCCTGAAATTGTCTGCCTCTCGCCC-3'<sup>-104</sup>; 2) Ptx1 site mutation (natural *SmaI* site just 5' of the Ptx1 binding site): <sup>-101</sup>5'-GGGGATTGTAGTGTCCAGGTTAC-3'<sup>-79</sup>. The resulting PCR products were subsequently subcloned in the corresponding sites of the modified pGL2-Basic. The GRE reporter and GR expression plasmids were previously described (Philips et al. 1997; Drouin et al. 1993). Oligonucleotides were obtained from Perkin-Elmer. All mutations and deletions were confirmed by DNA sequencing.

### Recombinant Protein Production

*Escherichia coli* strain BL21 was transformed with MBP(maltose-binding protein) fusion vectors (MBP-SF-1, MBP-Ptx1, MBP-SF-1 $\Delta$ LBD and MBP-LacZ $\alpha$ ) derived from pMal-c (New England Biolabs). Colonies were grown in 1000 ml of 2XYT to an O.D. of 0.4-0.6 at 600 nm. Induction of recombinant protein expression and their purification were performed as recommended by the manufacturer. <sup>35</sup>S-labelled *in vitro* translated Ptx1 (WT and mutants), SF-1 and luciferase were obtained using the TNT-coupled transcription/translation rabbit reticulocyte lysate system (Promega).

### Protein-Protein Interaction Assay

Protein-protein interaction assays were performed using 1  $\mu\text{g}$  of MBP-fusion proteins coupled to amylose-Sepharose beads (New England Biolabs) and 4-6  $\mu\text{l}$  of *in vitro* translated  $^{35}\text{S}$ -labelled protein as described in (Durocher et al. 1997).



### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to John Nilson, Keith Parker and Robert Viger for providing -776 bp LH $\beta$  promoter, SF-1 expression vector and -180 bp MIS promoter, respectively and to Cynthia Goodyer and Guy Sauvageau for critical reading of the manuscript. The efficient secretarial assistance of Lise Laroche was much appreciated. JJT was a recipient of a studentship from the Cancer Research Society Inc. This work was funded by the National Cancer Institute of Canada supported with funds provided by the Canadian Cancer Society.

## REFERENCES

- Acampora, D., S. Mazan, F. Tuorto, V. Avantaggiato, J.J. Tremblay, D. Lazzaro, A. di Carlo, A. Mariano, P.E. Macchia, G. Corte, V. Macchia, J. Drouin, P. Brûlet, and A. Simeone. 1998. Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking *Otx1* reveal prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH. *Development* **125**: 1229-1239.
- De Bold, C.R., M.E. Schworer, T.B. Connor, R.E. Bird, and D.N. Orth. 1983. Ectopic pro-opiomelanocortin: sequence of cDNA coding for beta-melanocyte-stimulating hormone and beta-endorphin. *Science* **220**: 721-723.
- Driever, W. and C. Nusslein-Volhard. 1989. The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **337**: 138-143.
- Drouin, J., B. Lamolet, T. Lamonerie, C. Lanctôt, and J.J. Tremblay. 1998. The *Ptx* family of homeodomain transcription factors during pituitary development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **In press**:
- Drouin, J., C. Lanctôt, and J.J. Tremblay. 1998. La famille *Ptx* de facteurs de transcription à boîte homéodomaine. *M/S* **14**: 335-339.
- Drouin, J., Y.L. Sun, M. Chamberland, Y. Gauthier, A. De Léan, M. Nemer, and T.J. Schmidt. 1993. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.* **12**:145-156.
- Durocher, D., F. Charron, R. Warren, R.J. Schwartz, and M. Nemer. 1997. The cardiac transcription factors *Nkx2-5* and *GATA-4* are mutual cofactors. *EMBO J.* **16**: 5687-5696.
- Gage, P.J. and S.A. Camper. 1997. Pituitary homeobox 2, a novel member of the *bicoid*-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 457-464.

- Gerber, H.P., K. Seipel, O. Georgiev, M. Hofferer, M. Hug, S. Rusconi, and W. Schaffner. 1994. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**: 808-811.
- Giulli, G., W.H. Shen, and H.A. Ingraham. 1997. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development* **124**: 1799-1807.
- Guichet, A., J.W. Copeland, M. Erdélyi, D. Hlousek, P. Závorszky, J. Ho, S. Brown, A. Percival-Smith, H.M. Krause, and A. Ephrussi. 1997. The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature* **385**: 548-552.
- Halvorson, L.M., U.B. Kaiser, and W.W. Chin. 1996. Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1. *J. Biol. Chem.* **271**: 6645-50.
- Ikeda, Y., D.S. Lala, X. Luo, E. Kim, M.P. Moisan, and K.L. Parker. 1993. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.* **7**: 852-860.
- Ikeda, Y., W.H. Shen, H.A. Ingraham, and K.L. Parker. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* **8**: 654-662.
- Ikeda, Y., X. Luo, R. Abbud, J.H. Nilson, and K.L. Parker. 1995. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* **9**: 478-486.
- Ikeda, Y., A. Swain, T.J. Weber, K.E. Hentges, E. Zanaria, E. Lalli, K.T. Tamai, P. Sassone-Corsi, R. Lovell-Badge, G. Camerino, and K.L. Parker. 1996. Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol. Endocrinol.* **10**: 1261-1272.

- Ingraham, H.A., D.S. Lala, Y. Ikeda, X. Luo, W.H. Shen, M.W. Nachtigal, R. Abbud, J.H. Nilson, and K.L. Parker. 1994. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* **8**: 2302-2312.
- Keri, R.A. and J.H. Nilson. 1996. A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone beta subunit promoter in gonadotropes of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **271**: 10782-10785.
- Lala, D.S., D.A. Rice, and K.L. Parker. 1992. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1249-1258.
- Lala, D.S., P.M. Syka, S.B. Lazarchik, D.J. Mangelsdorf, K.L. Parker, and R.A. Heyman. 1997. Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4895-4900.
- Lamonerie, T., J.J. Tremblay, C. Lanctôt, M. Therrien, Y. Gauthier, and J. Drouin. 1996. PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* **10**: 1284-1295.
- Lanctôt, C., B. Lamolet, and J. Drouin. 1997. The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**: 2807-2817.
- Luo, X., Y. Ikeda, and K.L. Parker. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77**: 481-490.
- Molkentin, J.D., B.L. Black, J.F. Martin, and E.N. Olson. 1995. Cooperative activation of muscle gene expression by *mef2* and myogenic *bhlh* proteins. *Cell* **83**: 1125-1136.
- Muccielli, M.L., S. Martinez, A. Pattyn, C. Goridis, and J.F. Brunet. 1996. *Otx2*, an *Otx*-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**: 258-271.

- Nagpal, S., M. Saunders, P. Kastner, B. Durand, H. Nakshatri, and P. Chambon. 1992. Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* **70**: 1007-1019.
- Parker, K.L. and B.P. Schimmer. 1997. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* **18**: 361-377.
- Philips, A., M.H. Maira, A. Mullick, M. Chamberland, S. Legage, P. Hugo, and J. Drouin. 1997. Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol. Cell. Biol.* **17**:5952-5959.
- Poulin, G., B. Turgeon, and J. Drouin. 1997. NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6673-6682.
- Sadovsky, Y., P.A. Crawford, K.G. Woodson, J.A. Polish, M.A. Clements, L.M. Tourtellotte, K. Simburger, and J. Milbrandt. 1995. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10939-10943.
- Semina, E.V., R. Reiter, N.J. Leysens, W.L. Alward, K.W. Small, N.A. Datson, J. Siegel-Bartelt, D. Bierke-Nelson, P. Bitoun, B.U. Zabel, J.C. Carey, and J.C. Murray. 1996. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics* **14**: 392-399.
- Semina, E.V., R.S. Reiter, and J. Murray. 1997. Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 2109-2116.
- Shang, J., Y. Luo, and D.A. Clayton. 1997. Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. *Dev. Dynamics* **209**: 242-253.

- Shen, W.H., C.C. Moore, Y. Ikeda, K.L. Parker, and H.A. Ingraham. 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* **77**: 651-661.
- Sheng, H.Z., A.B. Zhadanov, B. Mosinger, T. Fujii, S. Bertuzzi, A. Grinberg, E.J. Lee, S.P. Huang, K.A. Mahon, and H. Westphal. 1996. Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene LHX3. *Science* **272**: 1004-1007.
- Shinoda, K., H. Lei, H. Yoshii, M. Nomura, M. Nagano, H. Shiba, H. Sasaki, Y. Osawa, Y. Ninomiya, O. Niwa, and et al. 1995. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev. Dynamics* **204**: 22-29.
- Simeone, A., D. Acampora, A. Mallamaci, A. Stomaiuolo, M.R. D'Apice, V. Nigro, and E. Boncinelli. 1993. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* **12**: 2735-2747.
- Smidt, M., H.S.A. van Schaick, C. Lanctôt, J.J. Tremblay, J.J. Cox, A.A.M. van der Kleij, G. Wolterink, J. Drouin, and P.H. Burbach. 1997. A homeodomain gene *PTX3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13305-13310.
- Szeto, D.P., A.K. Ryan, S.M. O'Connell, and M.G. Rosenfeld. 1996. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7706-7710.
- Therrien, M. and J. Drouin. 1991. Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3492-3503.
- Therrien, M. and J. Drouin. 1993. Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2342-2353.

- Tora, L., J. White, C. Brou, D. Tasset, N. Webster, E. Scheer, and P. Chambon. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* **59**: 477-487.
- Tremblay, J.J., C. Lanctôt, and J. Drouin. 1998. The Pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol. Endocrinol.* **12**: 428-441.
- Vorbruggen, G., R. Constien, O. Zilian, E.A. Wimmer, G. Dowe, H. Taubert, M. Noll, and H. Jackle. 1997. Embryonic expression and characterization of a Ptx1 homolog in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **68**: 139-147.
- Yu, Y., W. Li, K. Su, M. Yussa, W. Han, N. Perrimon, and L. Pick. 1997. The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the *Drosophila* homeodomain protein Ftz. *Nature* **385**: 552-555.

## CHAPITRE V

### **Egr-1 Is a Downstream Effector of GnRH and Synergizes by Direct Interaction with Ptx1 and SF-1 to Enhance LH $\beta$ Gene Transcription**

Jacques J. Tremblay and Jacques Drouin

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

Soumis.



## INTRODUCTION AU CHAPITRE

Tel que décrit aux chapitres II et IV, Ptx1 est un activateur puissant et coopère physiquement et transcriptionnellement avec SF-1 pour l'expression du gène LH $\beta$ . De récents travaux ont mis aussi en évidence l'importance d'un autre facteur de transcription, Egr-1, dans l'expression du gène LH $\beta$ . Ce facteur de réponse précoce active le promoteur LH $\beta$  et agit aussi de façon synergique avec SF-1. L'expression du gène LH $\beta$  est étroitement régulée par l'hormone hypothalamique GnRH mais le(s) facteur(s) de transcription impliqué(s) dans l'activation du gène LH $\beta$  en réponse à la GnRH demeuraient inconnus. Cet article décrit l'identification du facteur Egr-1 comme médiateur transcriptionnel de l'action de la GnRH et définit le mode d'action de Egr-1 en association avec les facteurs Ptx1 et SF-1 dans la transcription de la LH $\beta$ .

## RÉSUMÉ

Les gonadotropines sont des régulateurs critiques du développement et de la fonction des gonades. L'expression et la sécrétion des hormones gonadotropes sont principalement contrôlées par la GnRH, elle-même sécrétée par l'hypothalamus. Cette dernière se lie à son récepteur présent sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse et active ainsi les voies de signalisation de la protéine kinase C (PKC) et de l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, et stimule ultimement l'expression des gènes codant pour les gonadotropines. Trois facteurs connus activent le promoteur du gène LH $\beta$ : l'homéoprotéine de type bicoïde Ptx1, le récepteur nucléaire orphelin SF-1 et le facteur de réponse immédiate précoce Egr-1. Nous montrons dans le présent article que la GnRH stimule fortement et transitoirement l'expression de Egr-1, mais non celle de Ptx1 et SF-1, et que cette stimulation passe par la voie de signalisation de la PKC. De plus, l'activation du promoteur LH $\beta$  par Egr-1 est spécifiquement stimulée par la PKC, suggérant que l'activation du promoteur LH $\beta$  par Egr-1, en réponse à la GnRH, par la voie PKC s'effectue en deux étapes: (1) induction de l'expression de Egr-1, et (2) stimulation du potentiel de transactivation de Egr-1. D'autre part, Egr-1 interagit directement avec Ptx1 et SF-1 menant à une amplification de la stimulation du promoteur LH $\beta$  induite par Ptx1 et SF-1. Ainsi, cette étude identifie pour la première fois le facteur de transcription Egr-1 comme médiateur transcriptionnel de la stimulation de l'expression du gène LH $\beta$  en réponse à la GnRH.

## ABSTRACT

Pituitary gonadotropins are critical regulators of gonadal development and function. Expression and secretion of the mature hormones are regulated by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) which is itself secreted from the hypothalamus. GnRH stimulation of gonadotropin expression and secretion occurs through the G-protein-linked PLC/IP<sub>3</sub> intracellular signaling pathway which ultimately leads to PKC activation and increased intracellular calcium levels. Transcription factors mediating the effects of GnRH-induced signals on transcription of gonadotropin genes have not yet been identified. Recent studies have identified key factors involved in LH $\beta$  gonadotropin gene transcription: the nuclear receptor SF-1, the *bicoid*-related homeoprotein Ptx1, and the immediate early gene Egr-1. We now show that GnRH is a potent stimulator of Egr-1, but not Ptx1 or SF-1, expression. Further, Egr-1 activation of the LH $\beta$  promoter is specifically enhanced by PKC in agreement with a role for Egr-1 in mediating GnRH effect on transcription. Egr-1 interacts directly with Ptx1 and with SF-1, leading to an enhancement of Ptx1- and SF-1-induced LH $\beta$  transcription. Thus, Egr-1 is a likely transcriptional mediator of GnRH-induced signals for activation of the LH $\beta$  gene.

## INTRODUCTION

Egr-1 (also designated as NGFI-A, Krox-24 and Zif268) belongs to a group of transcriptional regulators that behave as immediate early response genes. These genes are transiently activated at the cellular level by a variety of external stimuli, such as serum or growth factors, and they are thought to be important regulators of cellular proliferation and differentiation. Egr-1 was first identified about ten years ago as a gene rapidly induced during nerve growth factor-induced differentiation (9,36). Egr-1 has since been cloned by several groups and shown to be rapidly and transiently induced, both at the transcriptional and protein levels, by a variety of mitogens, developmental or differentiation cues, tissue damage, and signals that induce neuronal excitation or apoptosis in numerous cell types [(7,30,49) and reviewed in (9)]. The Egr-1 protein is a zinc finger-containing transcription factor of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> class that specifically binds the DNA sequence GCG(G/T)GGGCG to activate transcription of target genes (5,7,31,36,39,51). The DNA-binding activity of Egr-1 is apparently controlled by the phosphorylation state of the protein. Indeed, Huang et al. have shown that phosphorylated Egr-1 binds DNA more efficiently than the non-phosphorylated form (15). Moreover, Egr-1 DNA-binding is significantly increased by inhibitors of protein serine/threonine phosphatase 1 and 2A, suggesting that its DNA-binding activity is under the control of protein kinase(s) and/or phosphatase(s) (4). Taken together, these data suggest that Egr-1 serves as an intermediary regulatory factor in many cellular response pathways.

Egr-1 is broadly expressed in tissues throughout development and in the adult of many species. It can be found in the endothelial system, thymus, muscle, cartilage, bone and parts of the central and peripheral nervous systems (35,59). At a functional level, several *in vitro* studies initially characterized Egr-1 as having a role in the control of macrophage differentiation and T lymphocyte proliferation (37,40), as well as in platelet-

derived growth factor-B gene expression in endothelial cells (22). However, in two independent Egr-1 targeted gene deletion experiments, these observations were not corroborated (29,54). Rather, Egr-1<sup>-/-</sup> mice of both sexes have reduced body sizes and fertility problems due to a pituitary defect in the male and sterility due to combined pituitary and ovarian dysfunction in the female (28,54). In the pituitary of knockout mice, the absence of Egr-1 results in a lack of the gonadotropin luteinizing hormone  $\beta$  (LH $\beta$ ) gene expression in gonadotrope cells despite the presence of other gonadotrope markers (28,54). These observations have suggested that Egr-1 is not involved in the differentiation of gonadotrope cells but rather in the expression of the gonadotrope-specific gene, LH $\beta$ . Indeed, Lee et al. have shown that Egr-1 can bind to a conserved consensus GC-rich motif and directly activate LH $\beta$  transcription (28). Moreover, Egr-1 can act in synergy with the orphan nuclear receptor SF-1 to further enhance LH $\beta$  transcription (27,28).

Pituitary gonadotropes synthesize and secrete two gonadotropin hormones: LH and follicle-stimulating hormone (FSH). Both hormones are heterodimeric glycoproteins composed of a common peptide, the glycoprotein hormone subunit  $\alpha$  ( $\alpha$ GSU), and either a specific FSH $\beta$  or LH $\beta$  polypeptide (42). Expression of the genes encoding the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits as well as secretion of the mature hormones are regulated by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) which is itself secreted from the hypothalamus (10). Naturally occurring mutations in the GnRH (*hpg* mice) or GnRH receptor (GnRH-R) genes both lead to hypogonadism due to a lack of gonadotropin production (26,34). GnRH binds the GnRH-R, a seven transmembrane G-protein coupled receptor, present at the membrane of pituitary gonadotropes: this triggers activation of phospholipase C (PLC) which cleaves phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) to generate triphosphate inositol (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> increases intracellular calcium

levels whereas DAG activates protein kinase C (PKC) (1,2,19). Activation of PKC leads to increased mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK or MEK) and mitogen-activated protein kinase (MAPK or ERK) activity and to increased gonadotropin mRNA levels (14,19,50). Direct activation of PKC by phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA), as well as calcium mobilization by ionomycin, reproduce the profile of GnRH-induced LH $\beta$  mRNA (1,2). Conversely, depletion of PKC activity significantly reduces the ability of GnRH to stimulate LH $\beta$  mRNA (1). Thus, GnRH-dependent activation of the PKC pathway appears to be a major step for stimulation of LH $\beta$  mRNA. However, the transcriptional mediator(s) of PKC action on the LH $\beta$  promoter is (are) presently unknown.

Recent studies have identified three factors involved in LH $\beta$  gene transcription: the nuclear receptor SF-1, the *bicoid*-related homeoprotein Ptx1, and Egr-1 (13,21,28,55,56). Numerous studies have demonstrated the importance of SF-1 at multiple levels of the reproductive axis, including gonadotrope function in the pituitary (38). Ptx1 is a homeobox transcription factor first isolated as a regulator of pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression in pituitary corticotrope cells (24). Ptx1 was later shown to be present in all pituitary cells and to activate most pituitary hormone-coding gene promoters, including LH $\beta$  (25,56). In addition, Ptx1 contributes to lineage-restricted gene expression by synergism with cell-restricted transcription factors such as SF-1, Pit1 and NeuroD1/Pan1 (43,52,55,56).

In the present study, we report the identification of Egr-1 as a downstream effector of the GnRH-induced PKC signal transduction pathway in pituitary gonadotropes. Indeed, GnRH markedly induces Egr-1 gene expression in model gonadotrope cells,  $\alpha$ T3-1, and the Egr-1-dependent activation of the LH $\beta$  promoter is

specifically enhanced by PKC. Also, we show that Egr-1 exerts its transcriptional effects on the LH $\beta$  promoter by physical interactions with Ptx1 and SF-1.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell Culture and Transfection Assays.** Murine  $\alpha$ T3-1 and African green monkey kidney fibroblast-like CV-1 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum. CV-1 cells were transfected by the calcium phosphate method, as previously described (55). Data are presented as the means of 4 to 10 experiments, each performed in duplicate  $\pm$  SEM. The weak (about 2-fold) background activation observed with Ptx1 (and with combination of factors containing Ptx1) of mutant promoters (for example, Fig. 5-5F and G) has been observed with many negative control promoters like herpes simplex virus thymidine kinase promoter, minimal pituitary promoters and Mullerian inhibiting substance promoter, that do not contain Ptx1 binding sites (55,56); hence, we consider this to be a general non-specific effect on reporter activity.

**Hormone Treatment, RNA Extraction and Analysis.** GnRH, forskolin, TPA and cyclic ADP-ribose were obtained from Sigma.  $\alpha$ T3-1 cells were treated with  $10^{-5}$ M forskolin,  $10^{-7}$ M GnRH,  $5 \times 10^{-7}$ M TPA and 5  $\mu$ M cyclic ADP-ribose for the times indicated. Total cellular RNA was extracted by the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (6) and analyzed by northern blot analysis as described previously (56). DNA probes used for hybridization were cDNA fragments specific for Ptx1 (24), SF-1 (33), GnRH-R (44),  $\alpha$ GSU (11) and Egr-1 (49). As a loading control, the blots were stripped and rehybridized with a  $^{32}$ P-labeled oligonucleotide specific for 18S ribosomal RNA as described (56).

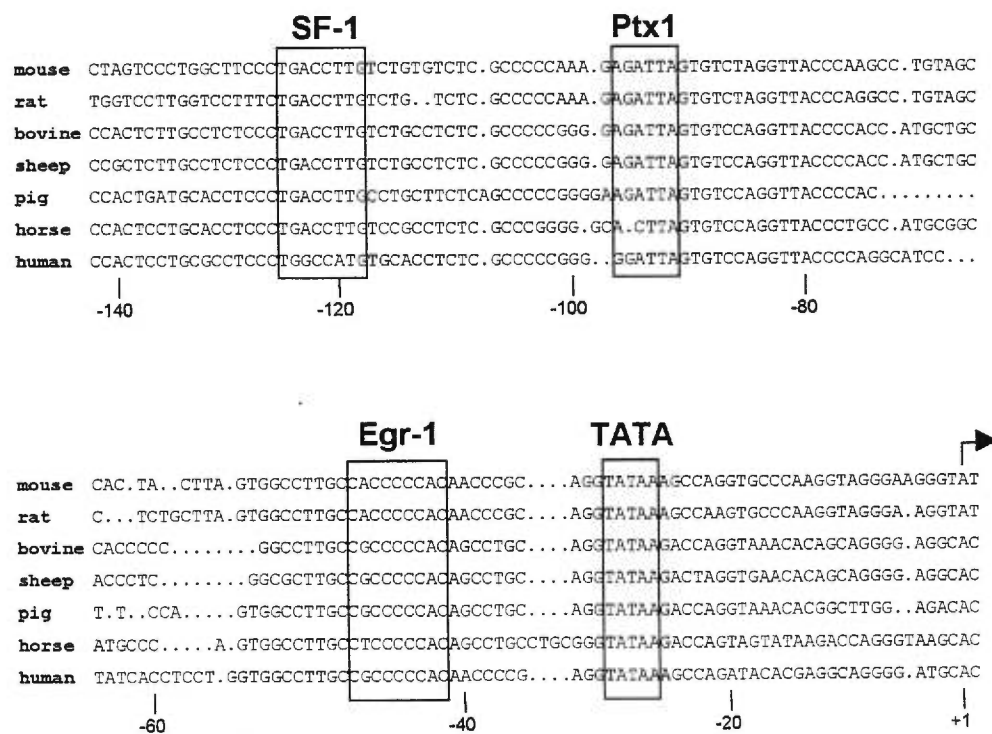
**Plasmids and Oligonucleotides.** The -142 bp LH $\beta$  promoter reporter, the mutations of the SF-1 and/or Ptx1 binding sites as well as the generation of Ptx1 mutants were described elsewhere (55). Mutations of the Egr-1 site and the double or triple mutants were obtained by PCR using the -142bp bovine LH $\beta$  promoter as template. A common reverse primer that incorporates the Egr-1 site mutation (shown in bold) and a natural *Pst*I site 5'-<sub>31</sub>ACCTGCAGGCTCTAAGAACAGCAAGGCCGGGG GTGGCAGC-<sub>70</sub>-3' was used with various forward primers that were described previously (55) to generate the mutants. The amplified fragments were subcloned back into the -142 bp LH $\beta$  reporter. All mutations and deletions were confirmed by DNA sequencing.

**Recombinant Protein Production and Pull-Down Assays.** MBP (maltose-binding protein) fusion proteins (MBP-SF-1, MBP-Egr-1, MBP-Ptx1 and MBP-LacZ $\alpha$ ) were produced as described (55). <sup>35</sup>S-labelled *in vitro* translated Ptx1 (WT and mutants), SF-1 and luciferase were obtained using the TNT-coupled transcription/translation rabbit reticulocyte lysate system (Promega). Protein-protein interaction assays were performed according to Tremblay et al. (55).

## RESULTS

**GnRH Rapidly and Transiently Induces Egr-1.** LH $\beta$  gene expression requires the concerted action of several transcription factors, some involved in basal expression whereas other inducible factors are needed to elicit a rapid response to external stimuli such as the hypothalamic hormone GnRH. As shown in Fig. 5-1, alignment of the LH $\beta$  promoter from several species reveals three highly conserved regions: one that binds the orphan nuclear receptor SF-1, a consensus site for binding of the homeobox transcription factor Ptx1, and a GC-rich region previously shown to bind Egr-1. All of these factors were previously shown to activate the LH $\beta$  promoter (13,21,28,56).



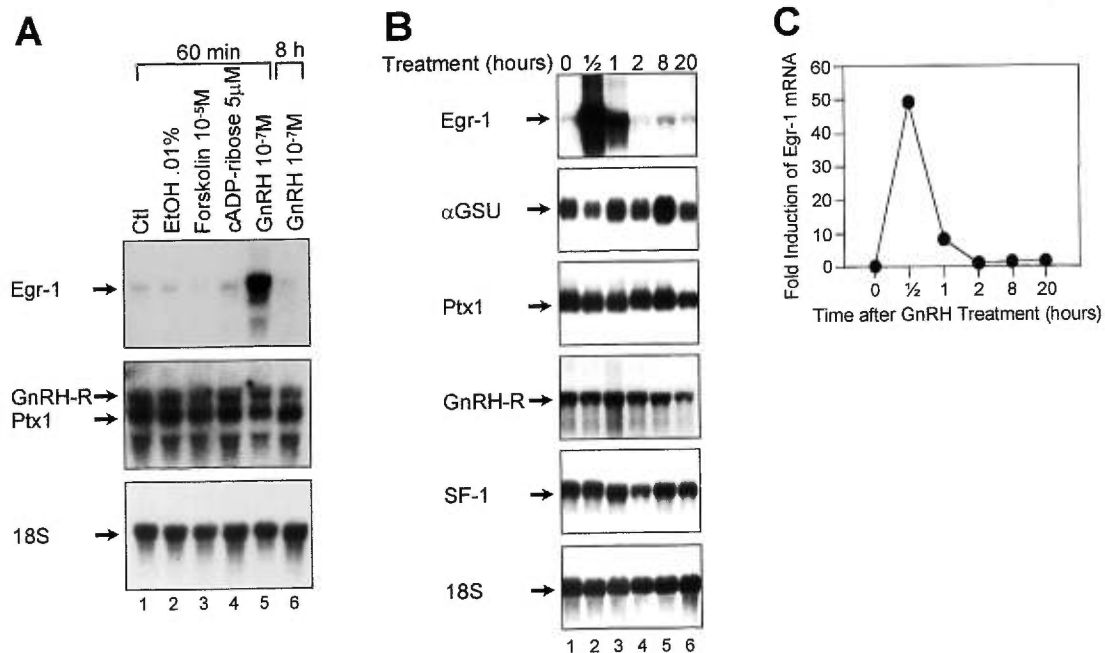


**Fig. 5-1.** Egr-1, Ptx1 and SF-1 Binding Sites Are Conserved Across Species in the LH $\beta$  Promoter.

Alignment of the mouse (23), rat (18), bovine (58), sheep (3), pig (8), horse (47) and human (53) LH $\beta$  promoter sequences reveals consensus SF-1, Ptx1 and Egr-1 elements (boxed) that are conserved across species.

In order to identify factor(s) responsible for GnRH-dependent activation of the LH $\beta$  promoter, we tested whether GnRH and other second messenger inducers could stimulate Ptx1, SF-1 and/or Egr-1 gene expression in the  $\alpha$ T3-1 gonadotrope cell line. As shown in Fig. 5-2A, treatment of  $\alpha$ T3-1 cells with forskolin (an inducer of protein kinase A [PKA]) or cyclic ADP-ribose (a calcium ionophore) had no significant effect on Ptx1 and Egr-1 mRNA levels. Interestingly, one hour after treatment with  $10^{-7}$ M of GnRH, Egr-1, but not Ptx1, mRNA levels were dramatically increased. Egr-1 mRNA returned to normal levels 8 hours after initiation of GnRH treatment. Densitometric quantitation revealed that Egr-1 mRNA levels were already 50 times higher in the GnRH-

treated cells when compared to the vehicle-treated cells after only 30 minutes (Fig. 5-2B and C). Egr-1 induction was transient as mRNA levels were back to basal levels by two



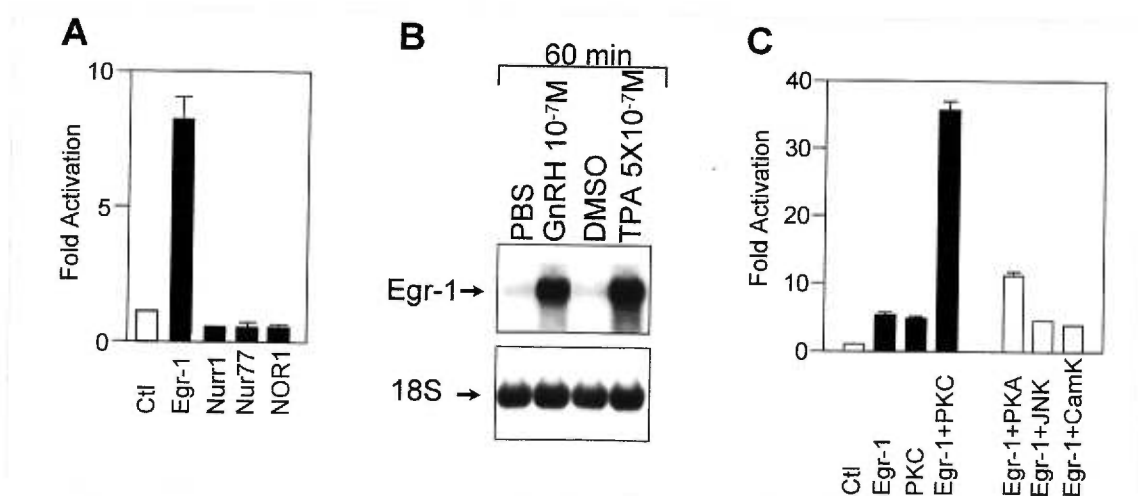
**Fig. 5-2.** GnRH Rapidly Induces Egr-1 Gene Expression.

(A)  $\alpha$ T3-1 cells were treated as indicated for 60 minutes or 8 hours and total RNA was isolated for use in northern blot analysis of Egr-1, GnRH-R and Ptx1 mRNA. The blot was subsequently probed with an 18S ribosomal RNA probe to ensure integrity and loading of the RNA. (B) Time-course analysis of GnRH effect on  $\alpha$ T3-1 cells. Total RNA was isolated at the indicated time after GnRH-treatment (10<sup>-7</sup>M) and analyzed by northern blot as in A. (C) The Egr-1 mRNA levels from B were quantified by densitometry.

hours of GnRH treatment (Fig. 5-2B and C). Consistent with a previous report by Windle et al.,  $\alpha$ GSU mRNA levels were slightly increased after 8 h of GnRH treatment [Fig. 5-2B and (60)]. GnRH treatment did not significantly affect GnRH-R mRNA levels nor those of the two other transcription factors known to be involved in LH $\beta$  gene expression, Ptx1 and SF-1 (Fig. 5-2B). Taken together, these results suggest that Egr-1 may be a downstream mediator of the GnRH-induced signal transduction pathway in pituitary gonadotropes.

**PKC Enhances Egr-1-Dependent LH $\beta$  Promoter Activation.** Egr-1 has been shown recently to be involved in LH $\beta$  gene expression (27,28,54). As shown in Fig. 5-3A, LH $\beta$  promoter activation by Egr-1 (NGFI-A) was specific since three other immediate early genes, Nur77 (NGFI-B), Nurr1 and NOR-1, failed to activate the LH $\beta$  promoter.

GnRH stimulation of gonadotropin expression and secretion occurs through activation of PKC and increased intracellular calcium levels (1,2,19); in turn, PKC is thought to activate downstream transcription factor(s) that control LH $\beta$  gene expression. Consistent with this model, we showed that the PKC activator TPA is as efficient as GnRH in inducing Egr-1 mRNA levels in  $\alpha$ T3-1 cells (Fig. 5-3B). The activity of Egr-1



**Fig. 5-3.** Involvement of PKC Pathway in Egr-1-Dependent Activation of LH $\beta$  Promoter.

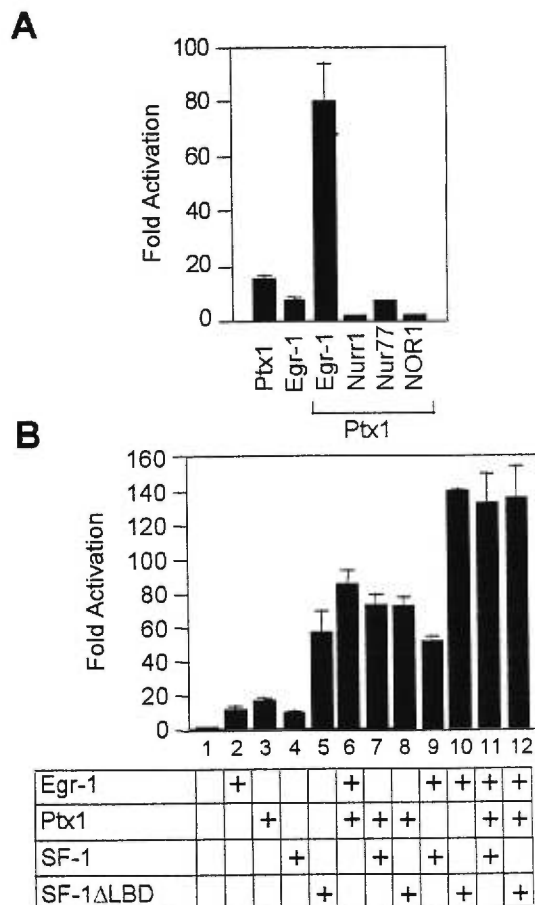
(A) The effect of Egr-1 and of other immediate-early genes, Nurr1, Nur77 and NOR-1 was assessed on the -776 bp bovine LH $\beta$  promoter. The LH $\beta$ -luciferase reporter was cotransfected in CV-1 cells together with a control plasmid (empty expression vector, open bar) or with expression vectors for Egr-1, Nurr1, Nur77 or NOR-1 as indicated (solid bars). (B) Effect of TPA treatment on Egr-1 mRNA levels.  $\alpha$ T3-1 cells were treated with 5X10<sup>-7</sup>M TPA for 60 minutes before harvest and RNA isolation. Egr-1 mRNA was revealed by northern blot. (C) Enhancement of Egr-1-dependent stimulation of LH $\beta$  promoter activity by protein kinase C, but not other kinases. CV-1 cells were cotransfected with the -776 bp LH $\beta$  reporter and either a control empty expression vector (Ctl) or with expression vectors for Egr-1 +/- PKC, PKA, JNK or CamK. Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM).

may also be enhanced by phosphorylation (4,15) and, consequently, we tested various protein kinase catalytic subunits for enhancement of Egr-1-dependent LH $\beta$  promoter activation. As shown in Fig. 5-3C, PKC potentiated the ability of Egr-1 to activate the LH $\beta$  promoter. This potentiation was specific for PKC since none of the other kinases tested, including protein kinase A (PKA), jun kinase (JNK), and calmodulin kinase (CamK) were able to enhance Egr-1-induced LH $\beta$  promoter activation (Fig. 5-3C). These results suggest that induction of Egr-1 gene expression and phosphorylation of Egr-1, both events specifically mediated through the PKC pathway, constitute part of the intracellular signaling cascade induced by GnRH in gonadotropes.

**Egr-1, Ptx1 and SF-1 Cooperatively Activate the LH $\beta$  Promoter.** Ptx1 and SF-1 are both present at high levels in unstimulated pituitary gonadotropes (25,38,56) and in  $\alpha$ T3-1 cells (Fig. 5-2B) whereas Egr-1 is not (Fig. 5-2). Binding sites for these three factors are conserved across species within the LH $\beta$  promoter (Fig. 5-1). It has already been shown that, individually, Ptx1 and SF-1 activate the LH $\beta$  promoter by binding to their cognate sites (13,21,56) while, together, they act synergistically (55,56). Since Egr-1 and SF-1 have also been documented to synergize with each other (27,28), we tested whether Ptx1 could synergistically enhance transcription with Egr-1. Both Ptx1 and Egr-1 activated the -776 bp LH $\beta$  reporter and they also acted synergistically to enhance promoter activity (Fig. 5-4A). Other immediate early genes, such as Nurr1, Nur77 and NOR-1, did not synergize with Ptx1 (Fig. 5-4A).

We have recently demonstrated that Ptx1 can modulate the activity of SF-1 by bypassing the requirement for its ligand (55). Indeed, as shown in Fig. 5-4B, a constitutively active SF-1 mutant devoid of its ligand binding domain ( $\Delta$ LBD) was as active as the synergistic activity of Ptx1/SF-1 (compare lane 5 with lane 7), suggesting that Ptx1 serves to unmask SF-1 activity (55). Since Egr-1 also synergizes with SF-1

[(27,32) and lane 9], we tested whether Egr-1 has a similar unmasking effect on SF-1 as does Ptx1. Although Egr-1 and Ptx1 each markedly enhanced the activity of wild-type SF-1 (lanes 9 and 7, respectively), only Egr-1 synergized with SF-1 $\Delta$ LBD (compare lane



**Fig. 5-4.** Egr-1, Ptx1 and SF-1 Synergize for Activation of the LH $\beta$  Promoter.

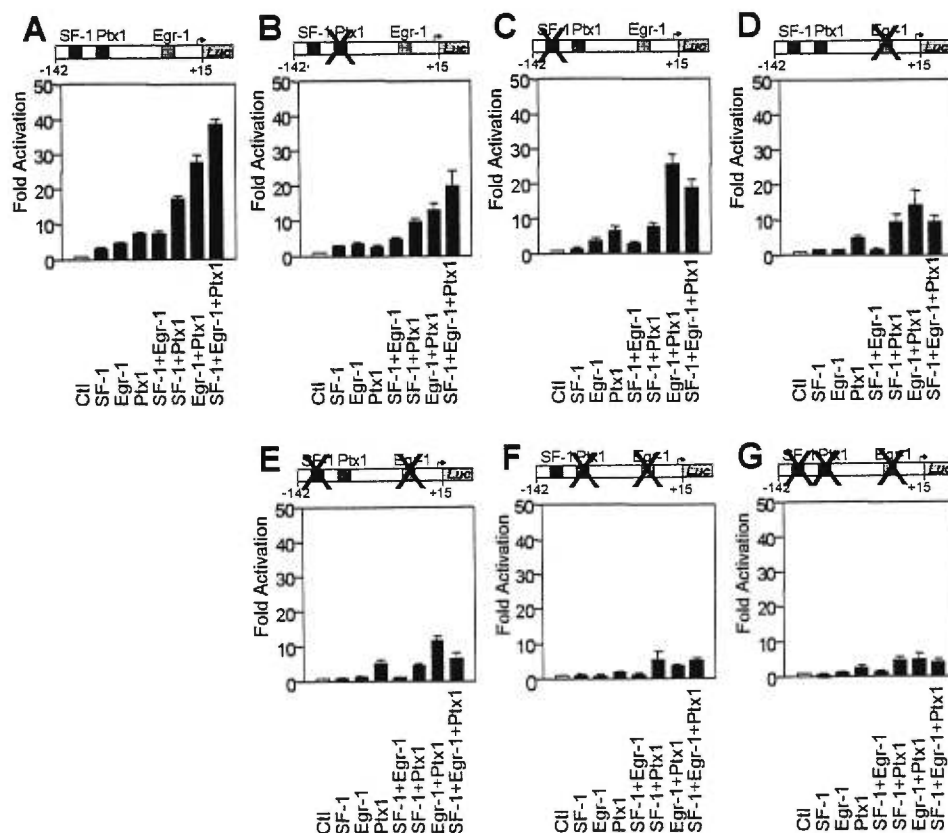
(A) Transcriptional cooperation between Egr-1 and Ptx1. Ptx1 was tested for synergism on the -776 bp LH $\beta$  reporter with either Egr-1, Nurr1, Nur77 or NOR-1. (B) Egr-1 has a cumulative effect on Ptx1/SF-1 synergism. CV-1 cells were cotransfected with the -776 bp LH $\beta$  reporter and the indicated expression plasmids. The SF-1 $\Delta$ LBD mutant is deleted of its ligand binding domain (LBD) and it was previously shown to have constitutive transcriptional activity (46,55). Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM).

10 with lane 8), suggesting that Egr-1 and Ptx1 have different mechanisms for synergizing with SF-1. As expected, when the three factors were combined, a cumulative effect was observed (Fig. 5-4B, lane 11). Moreover, the cumulative activity of the three factors (lane 11) was the same as that of Egr-1 with SF-1 $\Delta$ LBD (lane 10) or of Ptx1, Egr-1 and SF-1 $\Delta$ LBD (lane 12), consistent with the putative role of Ptx1 in unmasking the activation domain of SF-1.

**Binding Site Requirements for Egr-1/Ptx1/SF-1 Synergism.** Previous studies have revealed that a -142 bp LH $\beta$  promoter fragment that retains the SF-1 element at -120 bp, the Ptx1 binding site at -95 bp, and the Egr-1 binding motif at -45 bp is sufficient for Ptx1 and SF-1 transactivation and synergy (55). This construct also allowed us to determine the binding sites required for the synergistic cooperativity between SF-1, Ptx1, and Egr-1. Like the -776 bp LH $\beta$  promoter (Fig. 5-4B), the three factors exhibited cumulative effects on the shorter -142 bp LH $\beta$  promoter fragment (Fig. 5-5A). The requirement for each promoter binding site was tested by creating mutations of each site, either individually (Fig. 5-2B, C and D), in two-by-two combinations (Fig. 5-2E and F), or all three together (Fig. 5-2G).

Consistent with our previous study, mutation of the Ptx1 binding site did not affect Ptx1/SF-1 synergism (Fig. 5-5B and (55)). Similarly, this same mutation did not prevent synergy between Ptx1 and Egr-1 (Fig. 5-5B). Thus, the cooperativity between Ptx1, SF-1, and Egr-1 appears to be independent of Ptx1 binding to DNA. In contrast, mutation of the SF-1 element abolished both Ptx1/SF-1 and SF-1/Egr-1 synergism (Fig. 5-5C). Finally, mutation of the Egr-1 element prevented synergy with SF-1 but did not completely abolish Egr-1 interaction with Ptx1 (Fig. 5-5D). Taken together, these results suggest that Egr-1/SF-1 synergism requires the binding of both factors to their cognate elements since mutation of each site, either individually (Figs. 5-5C and D) or in combination (Fig. 5-5E) abolished synergy. Conversely, synergism between Egr-1 and Ptx1 apparently requires only one of the two elements since promoters with single mutations still exhibited some synergism (Fig. 5-5B and D) although the cumulative activity was not as great in these cases as with the intact promoter (Fig. 5-5A). In contrast, the double Egr-1 and Ptx1 site mutation completely abrogated Egr-1/Ptx1 synergism (Fig. 5-5F). As expected, mutation of all three elements, blocked LH $\beta$

promoter activation by any combination of Egr-1, Ptx1 or SF-1 (Fig. 5-5G). The results of this mutagenesis analysis (summarized in Table 5-1) revealed that the synergies observed between Egr-1, SF-1, and Ptx1 on the LH $\beta$  promoter have different site requirements and, thus, are likely mediated via different molecular mechanisms.



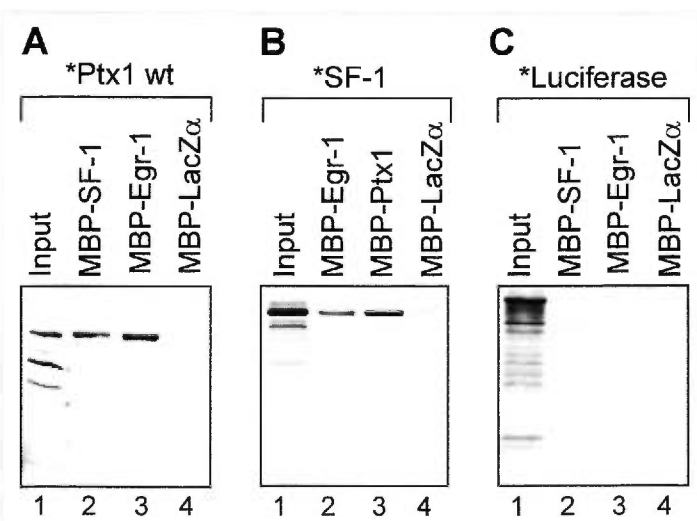
**Fig. 5-5.** Site Requirements for Egr-1/Ptx1/SF-1 Cooperation.

Transactivation by Egr-1, Ptx1, and SF-1 alone or in combination was tested on -142 bp bovine LH $\beta$  reporters: (A) wild-type promoter with intact binding sites for Egr-1, SF-1 and Ptx1, (B) mutation of Ptx1 site (24), (C) mutation of SF-1 site (13,21), (D) mutation of Egr-1 site (28), (E) double mutant for the SF-1 and Egr-1 sites, (F) double mutant for the Ptx1 and Egr-1 sites, and (G) mutation of all three sites. Promoter constructs were cotransfected in CV-1 cells with the indicated expression plasmids. Results are shown as fold activation ( $\pm$  SEM).

**Table 5-1.** Site Requirements for Synergy on the LH $\beta$  Promoter.

Synergy	Site Requirements	References
Egr-1/Ptx1	Egr-1 or Ptx1	This study
SF-1/Egr-1	SF-1 and Egr-1	This study
SF-1/Ptx1	SF-1 only	This study and (55)

**Egr-1 and Ptx1 Interact Physically.** Cooperativity between Ptx1, SF-1, and Egr-1 for activation of LH $\beta$  promoter suggests that the proteins may interact directly. We have, in fact, recently demonstrated that Ptx1 and SF-1 interact *in vitro* (55). As shown in Fig. 5-6A, both SF-1 and Egr-1 immobilized on beads also interacted with *in vitro* synthesized Ptx1. These interactions were specific since no binding was observed with immobilized MBP-LacZ $\alpha$  (Fig. 5-6A, lane 4) and labeled luciferase did not bind any immobilized protein (Fig. 5-6C). Similarly, both Egr-1 and Ptx1 interacted with labeled SF-1 protein (Fig. 5-6B). Thus, the Ptx1, SF-1, and Egr-1 cooperative effects are likely to occur through direct protein-protein interactions.

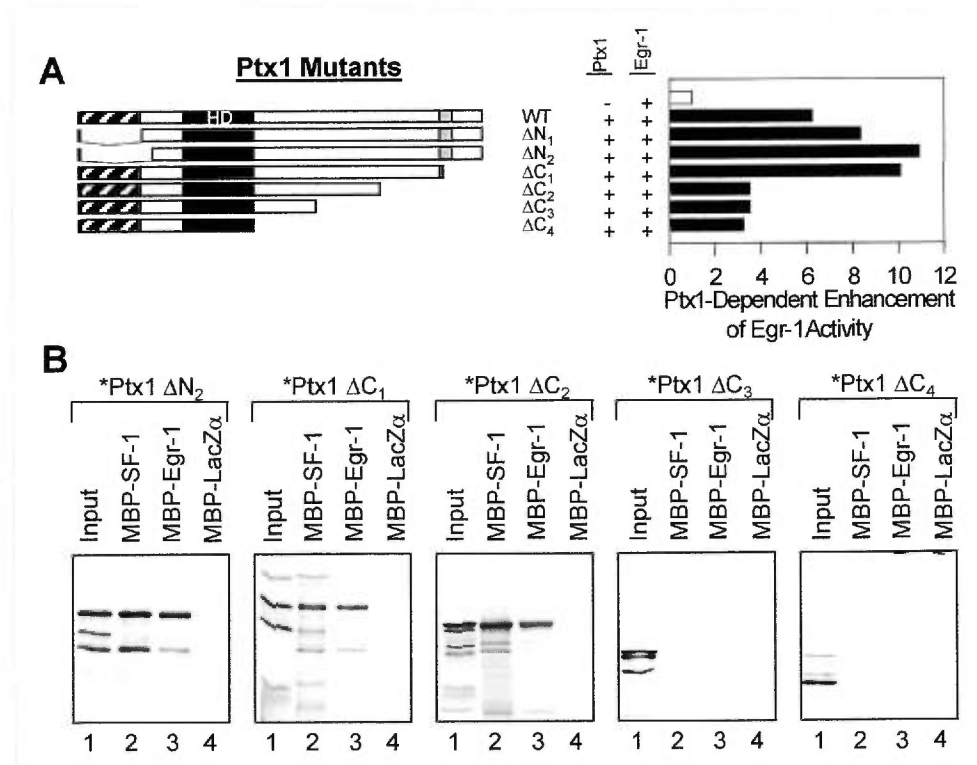
**Fig. 5-6.** Egr-1 Directly Interacts with Ptx1 and SF-1.

Pull-down assays were performed using immobilized, bacterially produced MBP fusion proteins (MBP-SF-1, MBP-Egr-1, MBP-Ptx1 and MBP-LacZ $\alpha$  as control) with  $^{35}\text{S}$ -labeled Ptx1 (A), SF-1 (B) or luciferase (C). Complexes were separated by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes, and visualized by auto-

radiography. The input protein (lanes 1) corresponds to 20% of the labeled protein used in the assay.



**Egr-1/Ptx1 Synergism Maps to a C-Terminal Domain of Ptx1.** In order to identify the domain of Ptx1 involved in the synergistic and physical interactions with Egr-1, a series of Ptx1 mutants was tested in transfection and pull-down assays. The expression level, nuclear localization, and transcriptional properties of the Ptx1 mutant proteins have been assessed previously (55). Deletion of the N-terminal domain of Ptx1 (mutants  $\Delta N_1$  and  $\Delta N_2$ ) did not affect its ability to synergize with Egr-1 (Fig. 5-7A). However, deletion of a 49 amino acid region in the C-terminal domain of Ptx1 (amino acids 234 to 283), which deletes an activation domain (55), led to a significant decrease



**Fig. 5-7.** The C-Terminal Domain of Ptx1 Is Required for Physical Interaction and Transcriptional Cooperation with Egr-1.

(A) CV-1 cells were cotransfected with the bovine -142 bp LH $\beta$  reporter along with expression vectors for Egr-1 (open bar) or for Egr-1 together with Ptx1 mutants (solid bars). The Ptx1 mutants were described previously (55). (B) The indicated Ptx1 mutant proteins were labeled by *in vitro* translation and tested for binding to MBP-SF-1 (lanes 2), MBP-Egr-1 (lanes 3) or MBP-LacZ $\alpha$  (lanes 4) as control. Bound complexes were separated on SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes, and visualized by autoradiography. The input proteins (lanes 1) correspond to 20% of the labeled protein used in the assay.

in synergy with Egr-1 (Fig. 5-7A, compare mutant  $\Delta C_2$  with  $\Delta C_1$ ). Pull-down assays were then used to identify the region involved in the physical interaction with Egr-1 (Fig. 5-7B). Consistent with the transactivation data, the N-terminal region of Ptx1 was not required for interaction with Egr-1 (Fig. 5-7B, mutant  $\Delta N_2$ ). The Egr-1 interacting domain mapped to a 37 amino acid region located between residues 197 (mutant  $\Delta C_3$ ) and 234 (mutant  $\Delta C_2$ ) of Ptx1. Interestingly, this same Ptx1 region was recently shown to be the domain involved in the physical interaction with SF-1 [Fig. 5-7B and (55)]. Thus, it appears that an activation domain of Ptx1 (localized between residues 234 and 283) is required for its transcriptional synergism with both Egr-1 and SF-1 while physical interactions involve a contiguous region of Ptx1 (between residues 197 and 234).

## DISCUSSION

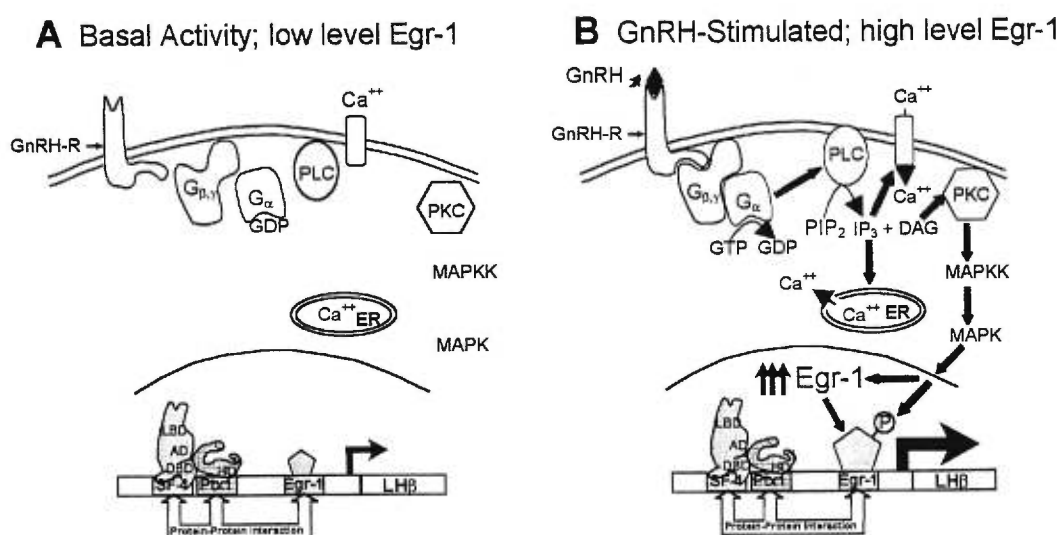
The regulation of gonadotropin synthesis and secretion by GnRH is well-established. The lack of LH $\beta$  expression in the *hpg* mouse, which harbours mutations in the GnRH gene (34), and naturally occurring mutations in the GnRH receptor in humans (26), have corroborated the importance of this hypothalamic hormone for control of gonadotropin function. Although it is clear that GnRH is essential for gonadotropin gene expression, the transcription factors that, ultimately, are targets of GnRH action remain unknown. In the present study, we have identified the immediate early response gene Egr-1 as a potential effector of GnRH-elicited responses in pituitary gonadotropes. Moreover, we propose a model in which Egr-1 physically and functionally cooperates with two other transcription factors, Ptx1 and SF-1, to elicit a rapid increase in LH $\beta$  gene expression in response to GnRH.

**Regulation of Egr-1 Activity.** The rapid and strong induction of Egr-1 mRNA in response to GnRH (Fig. 5-2) and to TPA (Fig. 5-3B) suggested that this early response

transcription factor may mediate some of the effects of the hypothalamic hormone (Fig. 5-8). It was previously shown that GnRH binding to its receptor elevates intracellular  $Ca^{++}$  and activates the PKC cascade (1,2,19). We now show that the PKC activator TPA elevates Egr-1 mRNA levels (Fig. 5-3B) and that PKC enhances Egr-1-dependent transcription (Fig. 5-3C). Although these data do not exclude the putative involvement of other signaling events, they suggest that Egr-1 may be a transcriptional effector of GnRH action. This would be achieved by two complementary mechanisms: (1) stimulation of Egr-1 expression and (2) direct enhancement by PKC-elicited modification (phosphorylation ?) of Egr-1 transcriptional potency. This model (Fig. 5-8) is entirely consistent with the presence of a conserved Egr-1 target site in the LH $\beta$  promoter of many species (Fig. 5-1) and with its conserved position in relation to binding sites for Ptx1 and SF-1 which synergistically (Figs. 5-4, 5-5, and 5-7A) and physically (Figs. 5-6 and 5-7B) interact with Egr-1.

**Mechanism of Egr-1, Ptx1 and SF-1 Cooperation.** We have recently shown that synergistic cooperation between two transcription factors, Ptx1 and SF-1, contributes to LH $\beta$  gene expression. This synergism is achieved through a Ptx1/SF-1 physical interaction that mimics the activity of a constitutively active form of SF-1 (LBD deletion) and thus appears to bypass the need for an SF-1 ligand (55). We now show that Egr-1 also cooperates with these two factors, Ptx1 and SF-1, to activate LH $\beta$  promoter activity. However, the molecular mechanism of the Egr-1 synergism appears to be different (Table 5-1). Interestingly, the cumulative effects of these factors may serve to confer hormone responsiveness as Egr-1 activity is greatly stimulated by GnRH, whereas Ptx1 and SF-1 mRNA levels are not hormone regulated. In resting cells, low level expression of Egr-1 may contribute only slightly to LH $\beta$  expression (Fig. 5-8A); after GnRH stimulation, increased levels of Egr-1, as well as enhancement of Egr-1

transcriptional potency by PKC (for example, by phosphorylation), is likely to contribute to stimulation of LH $\beta$  gene transcription (Fig. 5-8B). Although we have shown *in vitro* interactions between the three factors involved in LH $\beta$  transcription, we do not know yet how these interactions occur between promoter-bound proteins. It appears, however, that each pairwise interaction utilizes a different mechanism (Table 5-1).



**Fig. 5-8.** Model for control of LH $\beta$  Gene Expression by Egr-1, Ptx1 and SF-1.

(A) In the absence of GnRH, Egr-1 is expressed at low level. The LH $\beta$  gene is activated by Ptx1, SF-1 and low levels of Egr-1. (B) When GnRH is secreted from the hypothalamus, it binds to its receptor (GnRH-R) leading to activation of G protein-linked phospholipase C (PLC) and inositol triphosphate (IP $_3$ ) intracellular signaling pathways (19). PLC cleaves phosphatidyl-inositol 4,5-biphosphate (PIP $_2$ ) to generate IP $_3$  and diacylglycerol (DAG). IP $_3$  increases intracellular calcium levels (by L-type voltage-sensitive channel and release by endoplasmic reticulum; ER) whereas DAG activates protein kinase C (PKC). Activation of PKC leads to increased mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity leading to phosphorylation of Egr-1 (4,15). Egr-1 mRNA levels are rapidly increased by GnRH via the PKC pathway, rather than by PKA or calcium (Ca $^{++}$ ). Egr-1 synergizes with Ptx1 and SF-1 to rapidly increase LH $\beta$  gene expression.

**Egr-1 as a Downstream Effector of GnRH.** None of the transcription factors so far implicated in regulation of LH $\beta$  gene expression act as a downstream effector of GnRH action. The orphan nuclear receptor SF-1 was initially thought to play such a role since gonadectomy, which is known to increase hypothalamic GnRH secretion, led to a three-fold increase in SF-1 mRNA levels in the pituitary (12,57) and because SF-1 directly regulates LH $\beta$  promoter activity (13,21,55,56). Moreover, targeted ablation of the SF-1 gene resulted in a severe decrease in LH $\beta$  mRNA levels (17,48). However, the recovery of normal LH $\beta$  mRNA levels by GnRH injection in SF-1 knockout mice has unambiguously eliminated SF-1 as a mediator of GnRH action (16). The absence of LH $\beta$  mRNA in the SF-1<sup>-/-</sup> animals was later proven to be the result of a blockade of GnRH secretion due to the absence of neurons of the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH), another site of SF-1 expression (16,48). Our results are also consistent with this interpretation since GnRH did not affect SF-1 mRNA levels in  $\alpha$ T3-1 cells (Fig. 5-2B).

Ptx1 is unlikely to be a mediator of GnRH action since Ptx1 gene expression was unaffected by GnRH treatment (Fig. 5-2). In contrast, the dramatic upregulation of the Egr-1 mRNA (nearly 50-fold; Fig. 5-2C) by GnRH strongly suggests that Egr-1 is an effector of GnRH action in pituitary gonadotropes. Binding of GnRH to its cognate receptor activates the G-protein-linked PLC/IP<sub>3</sub> intracellular signaling pathway leading to PKC activation and increased intracellular calcium levels (1,2,19). Since Egr-1 mRNA levels are similarly induced by TPA and GnRH (Fig. 5-3B), a PKC activator, but not by cyclic ADP-ribose (Fig. 5-2A), a calcium ionophore, it appears that GnRH-induced stimulation of Egr-1 gene expression is primarily mediated by PKC. This observation is consistent with recent work showing preferential activation of LH $\beta$ , but not  $\alpha$ GSU, promoter activity by the PKC pathway (45). The involvement of Egr-1 together with Ptx1

and SF-1 in mediating GnRH action is also compatible with recent LH $\beta$  promoter mapping data (20). Our working model (Fig. 5-8) is strongly supported by the recent characterization of Egr-1 knockout mice that have undetectable LH $\beta$  expression despite the presence of other gonadotrope markers (FSH $\beta$  and  $\alpha$ GSU) and normal GnRH secretion by the VMH; further, gonadectomy, which increases GnRH secretion, induced FSH $\beta$  in these mice as in wild-type animals, but not LH $\beta$  (28,54).

The transcriptional signaling of GnRH action through activation of Egr-1 (NGFI-A) is reminiscent of our recent identification of Nur77 (NGFI-B) as a mediator of corticotropin-releasing hormone (CRH) stimulation of POMC gene transcription (41). Thus, two different pituitary lineages utilize immediate early response genes as transcriptional effectors to mediate the effects of its trophic hypothalamic hormone.

### ACKNOWLEDGMENTS

The Egr-1 expression vector and the bovine -776 bp LH $\beta$  luciferase reporter were kindly provided by Dr. Vikas Sukhatme and Dr. John Nilson, respectively. We are grateful to Dr. Keith Parker for the SF-1 expression plasmid, to Dr. Pamela Mellon for the  $\alpha$ T3-1 cells, to Dr. Stanley McKnight for the PKA expression vector, to Dr. Michael Wagner for the CamK plasmid, to Dr. Michael Karin for the JNK plasmid, to Dr. Mona Nemer for the PKC expression vector and to Dr. Cynthia Goodyer for critical reading of the manuscript. The efficient secretarial assistance of Lise Laroche was much appreciated. This work was funded by the National Cancer Institute of Canada supported with funds provided by the Canadian Cancer Society.

## REFERENCES

1. **Andrews, W. V., R. A. Maurer, and P. M. Conn.** 1988. Stimulation of rat luteinizing hormone-beta messenger RNA levels by gonadotropin releasing hormone. Apparent role for protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **263**:13755-13761.
2. **Ben-Menahem, D. and Z. Naor.** 1994. Regulation of gonadotropin mRNA levels in cultured rat pituitary cells by gonadotropin-releasing hormone (GnRH): role for Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C. *Biochemistry* **33**:3698-3704.
3. **Brown, P., J. R. McNeilly, R. M. Wallace, A. S. McNeilly, and A. J. Clark.** 1993. Characterization of the ovine LH beta-subunit gene: the promoter directs gonadotrope-specific expression in transgenic mice. *Molecular & Cellular Endocrinology* **93**:157-165.
4. **Cao, X., R. Mahendran, G. R. Guy, and Y. H. Tan.** 1993. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J. Biol. Chem.* **268**:16949-16957.
5. **Cao, X. M., R. A. Koski, A. Gashler, M. McKiernan, C. F. Morris, R. Gaffney, R. V. Hay, and V. P. Sukhatme.** 1990. Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol. Cell. Biol.* **10**:1931-1939.
6. **Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform-extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
7. **Christy, B. A., L. F. Lau, and D. Nathans.** 1988. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7857-7861.
8. **Ezashi, T., T. Hirai, T. Kato, K. Wakabayashi, and Y. Kato.** 1990. The gene for the beta subunit of porcine LH: clusters of GC boxes and CACCC elements. *J. Mol. Endocrinol.* **5**:137-146.



9. **Gashler, A. and V. P. Sukhatme.** 1995. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic Acid. Res. & Mol. Biol.* **50**:191-224.
10. **Gharib, S. D., M. E. Wierman, M. A. Shupnik, and W. W. Chin.** 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrine Reviews* **11**:177-199.
11. **Gordon, D. F., W. M. Wood, and E. C. Ridgway.** 1988. Organization and nucleotide sequence of the mouse alpha-subunit gene of the pituitary glycoprotein hormones. *DNA* **7**:679-690.
12. **Haisenleder, D. J., M. Yasin, A. C. Dalkin, J. Gilrain, and J. C. Marshall.** 1996. GnRH regulates steroidogenic factor-1 (SF-1) gene expression in the rat pituitary. *Endocrinology* **137**:5719-5722.
13. **Halvorson, L. M., U. B. Kaiser, and W. W. Chin.** 1996. Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1. *J. Biol. Chem.* **271**:6645-50: 2.
14. **Horn, F., L. M. Bilezikjian, M. H. Perrin, M. M. Bosma, J. J. Windle, K. S. Huber, A. L. Blount, B. Hille, W. Vale, and P. L. Mellon.** 1991. Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of the gonadotrope lineage. *Mol. Endocrinol.* **5**:347-355.
15. **Huang, R. P. and E. D. Adamson.** 1994. The phosphorylated forms of the transcription factor, Egr-1, bind to DNA more efficiently than non-phosphorylated. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**:1271-1276.
16. **Ikeda, Y., X. Luo, R. Abbud, J. H. Nilson, and K. L. Parker.** 1995. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* **9**:478-486.

17. **Ingraham, H. A., D. S. Lala, Y. Ikeda, X. Luo, W. H. Shen, M. W. Nachtigal, R. Abbud, J. H. Nilson, and K. L. Parker.** 1994. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* **8**:2302-2312.
18. **Jameson, L., W. W. Chin, A. N. Hollenberg, A. S. Chang, and J. F. Habener.** 1984. The gene encoding the beta-subunit of rat luteinizing hormone. Analysis of gene structure and evolution of nucleotide sequence. *Journal of Biological Chemistry* **259**:15474-15480.
19. **Kaiser, U. B., P. M. Conn, and W. W. Chin.** 1997. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr. Rev.* **18**:46-70.
20. **Kaiser, U. B., E. Sabbagh, B. D. Saunders, and W. W. Chin.** 1998. Identification of *cis*-acting deoxyribonucleic acid element that mediate gonadotropin-releasing hormone stimulation of the rat luteinizing hormone  $\beta$ -subunit gene. *Endocrinology* **139**:2443-2451.
21. **Keri, R. A. and J. H. Nilson.** 1996. A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone beta subunit promoter in gonadotropes of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **271**:10782-10785.
22. **Khachigian, L. M., V. Lindner, A. J. Williams, and T. Collins.** 1996. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* **271**:1427-1431.
23. **Kumar, T. R. and M. M. Matzuk.** 1995. Cloning of the mouse gonadotropin beta-subunit-encoding genes, II. Structure of the luteinizing hormone beta-subunit-encoding genes. *Gene* **166**:335-336.
24. **Lamonerie, T., J. J. Tremblay, C. Lanctôt, M. Therrien, Y. Gauthier, and J. Drouin.** 1996. PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* **10**:1284-1295.

25. **Lanctôt, C., Y. Gauthier, and J. Drouin.** 1998. Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. **Submitted**
26. **Layman, L. C., D. P. Cohen, M. Jin, J. Xie, Z. Li, R. H. Reindollar, S. Bolbolan, D. P. Bick, R. R. Sherins, L. W. Duck, L. C. Musgrove, J. C. Sellers, and J. D. Neill.** 1998. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nature Genetics* **18**:14-15.
27. **Le Drean, Y., D. Liu, F. Xiong, and C. L. Hew.** 1997. Presence of distinct cis-acting elements on gonadotropin gene promoters in diverse species dictates the selective recruitment of different transcription factors by steroidogenic factor-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **135**:31-40.
28. **Lee, S. L., Y. Sadovsky, A. H. Swirnoff, J. A. Polish, P. Goda, G. Gavrulina, and J. Milbrandt.** 1996. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* **273**:1219-1221.
29. **Lee, S. L., Y. Wang, and J. Milbrandt.** 1996. Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transplantation factor NGFI-A (EGR1). *Mol. Cell. Biol.* **16**:4566-4572.
30. **Lemaire, P., O. Revelant, R. Bravo, and P. Charnay.** 1988. Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:4691-4695.
31. **Lemaire, P., C. Vesque, J. Schmitt, H. Stunnenberg, R. Frank, and P. Charnay.** 1990. The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* **10**:3456-3467.
32. **Li, T., M. R. Stark, A. D. Johnson, and C. Wolberger.** 1995. Crystal structure of the MATa1/MAT alpha 2 homeodomain heterodimer bound to DNA. *Science* **270**:262-269.

33. Luo, X., Y. Ikeda, D. A. Schlosser, and K. L. Parker. 1995. Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse *Ftz-F1* gene. *Mol. Endocrinol.* **9**:1233-1239.
34. Mason, A. J., J. S. Hayflick, R. T. Zoeller, W. S. Young, H. S. Phillips, K. Nikolics, and P. H. Seeburg. 1986. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse. *Science* **234**:1366-1371.
35. McMahon, A. P., J. E. Champion, J. A. McMahon, and V. P. Sukhatme. 1990. Developmental expression of the putative transcription factor Egr-1 suggests that Egr-1 and c-fos are coregulated in some tissues. *Development* **108**:281-287.
36. Milbrandt, J. 1987. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* **238**:797-799.
37. Nguyen, H. Q., B. Hoffman-Liebermann, and D. A. Liebermann. 1993. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* **72**:197-209.
38. Parker, K. L. and B. P. Schimmer. 1997. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* **18**:361-377.
39. Pavletich, N. P. and C. O. Pabo. 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**:809-817.
40. Perez-Castillo, A., C. Pipaon, I. Garcia, and S. Alemany. 1993. NGFI-A gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* **268**:19445-19450.
41. Philips, A., S. Lesage, R. Gingras, M. H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo, and J. Drouin. 1997. Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**:5946-5951.
42. Pierce, J. G. and T. F. Parsons. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **50**:465-495.

43. Poulin, G., B. Turgeon, and J. Drouin. 1997. NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol. Cell. Biol.* **17**:6673-6682.
44. Reinhart, J., L. M. Mertz, and K. J. Catt. 1992. Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* **267**:21281-21284.
45. Saunders, B. D., E. Sabbagh, W. W. Chin, and U. B. Kaiser. 1998. Differential use of signal transduction pathways in the gonadotropin-releasing hormone-mediated regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Endocrinology* **139**:1835-1843.
46. Shen, W. H., C. C. Moore, Y. Ikeda, K. L. Parker, and H. A. Ingraham. 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* **77**:651-661.
47. Sherman, G. B., M. W. Wolfe, T. A. Farmerie, C. M. Clay, D. S. Threadgill, D. C. Sharp, and J. H. Nilson. 1992. A single gene encodes the beta-subunits of equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Mol. Endocrinol.* **6**:951-959.
48. Shinoda, K., H. Lei, H. Yoshii, M. Nomura, M. Nagano, H. Shiba, H. Sasaki, Y. Osawa, Y. Ninomiya, O. Niwa, and et al. 1995. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev. Dynamics* **204**:22-29.
49. Sukhatme, V. P., X. Cao, L. C. Chang, C. H. Tsai-Morris, D. Stamenkovich, P. C. P. Ferreira, D. R. Cohen, S. A. Edwards, T. B. Shows, T. Curran, M. M. Le Beau, and E. D. Adamson. 1988. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* **53**:37-43.
50. Sundaresan, S., I. M. Colin, R. G. Pestell, and J. L. Jameson. 1996. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase. *Endocrinology* **137**:304-311.

51. **Swirnoff, A. H. and J. Milbrandt.** 1995. DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **15**:2275-2287.
52. **Szeto, D. P., A. K. Ryan, S. M. O'Connell, and M. G. Rosenfeld.** 1996. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:7706-7710.
53. **Talmadge, K., N. C. Vamvakopoulos, and J. C. Fiddes.** 1984. Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature* **307**:37-40.
54. **Topilko, P., S. Schneider-Maunoury, G. Levi, A. Trembleau, D. Gourdji, M. A. Driancourt, C. V. Rao, and P. Charnay.** 1998. Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol. Endocrinol.* **12**:107-122.
55. **Tremblay, J. J., Y. Gauthier, and J. Drouin.** 1998. Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that bypasses the need for ligand. **Submitted**
56. **Tremblay, J. J., C. Lanctôt, and J. Drouin.** 1998. The Pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol. Endocrinol.* **12**:428-441.
57. **Turzillo, A. M., C. C. Quirk, J. L. Juengel, T. M. Nett, and C. M. Clay.** 1997. Effects of ovariectomy and hypothalamic-pituitary disconnection on amounts of steroidogenic factor-1 mRNA in the ovine anterior pituitary gland. *Endocrine* **6**:251-256.
58. **Virgin, J. B., B. J. Silver, A. R. Thomason, and J. H. Nilson.** 1985. The gene for the beta subunit of bovine luteinizing hormone encodes a gonadotropin mRNA with an unusually short 5'-untranslated region. *Journal of Biological Chemistry* **260**:7072-7077.

59. **Watson, M. A. and J. Milbrandt.** 1990. Expression of the nerve growth factor-regulated NGFI-A and NGFI-B genes in the developing rat. *Development* **110**:173-183.
60. **Windle, J. J., R. I. Weiner, and P. L. Mellon.** 1990. Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **4**:597-603.

## **CHAPITRE VI**

## **DISCUSSION**



Nos connaissances sur le développement de l'hypophyse et sur l'expression des gènes hypophysaires ont rapidement évoluées au cours des dernières années avec l'identification de plusieurs nouveaux facteurs de transcription tels Prop-1, Rpx, Lim3/Lhx3, NeuroD1, SF-1 et Egr-1. Quoique tous importants à la fonction hypophysaire, aucun de ces facteurs ne joue cependant un rôle global dans l'organogenèse de l'hypophyse et dans l'expression des gènes qui y sont spécifiques, ce qui ne peut par conséquent expliquer l'origine commune des différents types cellulaires composant l'hypophyse. Ceci suggère donc l'existence d'autre(s) facteur(s) de transcription impliqué(s) dans ces processus et soulève ainsi l'importance de l'identification et de la caractérisation de tel(s) facteur(s). Un nouveau facteur de transcription à boîte homéo, Ptx1, a d'abord été isolé en tant que facteur impliqué dans l'expression du gène POMC des cellules corticotropes, première lignée cellulaire à apparaître lors de la différenciation hypophysaire. De plus, Ptx1 constitue le prototype d'une nouvelle famille d'homéoprotéines de type bicoïde. L'expression de Ptx1 ne semble toutefois pas restreinte à la lignée corticotropique puisque certaines données ont suggéré qu'il est aussi exprimé dans d'autres types cellulaires et ce dès le début du programme de différenciation hypophysaire. Cependant, le rôle et le mécanisme d'action du facteur de transcription Ptx1 demeuraient inconnus.

Mon projet de thèse consistait donc à élucider la (les) fonction(s) du nouveau facteur de transcription à boîte homéo Ptx1 dans la fonction hypophysaire. Les données du chapitre II m'ont permis de confirmer l'expression de Ptx1 dans tous les types cellulaires de l'hypophyse et de démontrer son implication dans l'expression de nombreux gènes hypophysaires. Ces données m'ont aussi permis de définir Ptx1 comme le premier et le seul régulateur pan-hypophysaire de la transcription connu à ce jour. De plus, ce chapitre a mis en évidence l'existence d'un code pour l'expression des gènes spécifiques à l'hypophyse et a proposé un rôle pour le facteur Ptx1 dans le

développement de l'hypophyse. Le chapitre III a décrit l'isolement et la caractérisation d'une isoforme, Ptx1b, du facteur de transcription Ptx1. Le chapitre IV a présenté une analyse détaillée de la coopération fonctionnelle au niveau du promoteur LH $\beta$  entre Ptx1 et le récepteur nucléaire orphelin SF-1 d'abord identifiée au chapitre II. Cette analyse a mené à l'élaboration d'un nouveau mécanisme pour l'activation des récepteurs nucléaires. Au chapitre V, un facteur de transcription, Egr-1, a pour la première fois été identifié comme médiateur de la stimulation de l'expression du gène LH $\beta$  en réponse à l'hormone hypothalamique GnRH. Ainsi, l'ensemble de ces données démontre que Ptx1 est un facteur multi-fonctionnel et essentiel à la fonction hypophysaire, et particulièrement dans l'axe de la reproduction. Ce dernier chapitre est séparé en deux parties. La première présente une analyse critique des éléments importants présentés dans cette thèse: (i) Ptx1: un facteur clé pour la fonction hypophysaire, (ii) propriétés des facteurs Ptx, et (iii) implication de Ptx1 dans l'axe de la reproduction. Comme Ptx1 est un facteur de transcription nouvellement identifié, beaucoup reste donc à faire afin de bien connaître et comprendre les différents aspects de ce facteur. Ainsi, la deuxième partie de ce chapitre propose différentes avenues de recherche intéressantes à poursuivre dans les années futures en ce qui a trait au facteur Ptx1.

### **Ptx1: un facteur clé pour la fonction hypophysaire?**

L'expression précoce de Ptx1 lors de l'embryogenèse et subséquemment lors de l'organogenèse de l'hypophyse (Lanctôt et al. 1997) de même que dans tous les types cellulaires qui composent l'hypophyse adulte (chapitre II) supporte plusieurs rôles pour ce facteur au cours du développement, particulièrement en ce qui a trait au développement hypophysaire. Ceci est bien illustré par le fait que l'expression du gène *Lim3/Lhx3* codant pour un facteur essentiel au développement normal de l'hypophyse

(Sheng et al. 1996) est strictement dépendante de Ptx1, du moins dans un modèle cellulaire [chapitre II et (Lanctôt et al. 1998)]. Ces données identifient donc Ptx1 comme une composante très précoce dans la cascade de régulateurs essentiels au développement de l'hypophyse. De plus, Ptx1 semble être un facteur clé de l'expression de plusieurs autres gènes hypophysaires (chapitre II). Ptx1 agit de façon synergique avec d'autres facteurs de transcription dont l'expression est restreinte à un type cellulaire de l'hypophyse en particulier. Ainsi, Ptx1 s'associe au facteur bHLH NeuroD1 dont l'expression est restreinte aux cellules corticotropes (Poulin et al. 1997) pour activer spécifiquement l'expression du gène POMC dans ces cellules. Similairement, Ptx1 coopère avec le facteur POU Pit1 exprimé dans les cellules somatotropes, lactotropes et thyrotropes afin d'activer l'expression des gènes PRL et GH dans les cellules lactotropes et somatotropes. Enfin, Ptx1 interagit avec le récepteur nucléaire orphelin SF-1 présent dans les cellules gonadotropes pour activer le gène LH $\beta$  dans ce type cellulaire (chapitres II). Ces données supporte un modèle dans lequel la différenciation progressive des différentes lignées cellulaires de l'hypophyse procéderait par l'activation séquentielle de gènes de régulation au cours de l'organogenèse. Ainsi, chaque type cellulaire posséderait un ensemble unique de facteurs de transcription, certains présents dans plus d'un type cellulaire comme Ptx1, Lim3/Lhx3 et Pit1, et d'autres dont l'expression est limitée à un type cellulaire particulier comme SF-1 et NeuroD1. Il en résulterait alors un code cellule-spécifique impliqué dans l'activation des gènes spécifiques à ce type cellulaire, similaire au code défini par les facteurs Hox dans les différents segments de l'embryon au cours du développement. Ainsi, le facteur Ptx1 semble être une composante cruciale du développement et de la fonction de la glande hypophysaire.

Un rôle similaire a été démontré dans une autre glande endocrine, le pancréas, pour le facteur à boîte homéo Pdx1. Tout comme l'hypophyse, le pancréas endocrine

est composé de plusieurs types cellulaires qui originent d'un précurseur commun. Le facteur Pdx1 a d'abord été identifié comme un régulateur transcriptionnel des gènes codant pour la somatostatine et l'insuline dans les cellules  $\delta$  et  $\beta$  (Leonard et al. 1993; Miller et al. 1994; Ohlsson et al. 1993). Ce facteur partage plusieurs similarités avec Ptx1. D'abord, Pdx1 est exprimé dans les cellules précurseurs avant même la spécification des cellules pancréatiques (Guz et al. 1995) et son expression est maintenue à des niveaux différents chez l'adulte dans la plupart des types cellulaires du pancréas; l'expression de Pdx1 est principalement restreinte aux cellules  $\beta$  produisant l'insuline (Guz et al. 1995). De plus, Pdx1 agit en association avec d'autres facteurs tels les bHLH E47/Pan1 et NeuroD (Beta2) au niveau du promoteur du gène de l'insuline (Peers et al. 1994; Naya et al. 1995) de même qu'avec l'homéoprotéine Pbx1 au niveau du promoteur du gène de la somatostatine (Peers et al. 1995) et ce afin de conférer l'expression spécifique à ces deux types cellulaires. A la différence de Ptx1, l'importance de Pdx1 dans la fonction pancréatique a été confirmée par des expériences d'inactivation génique chez la souris (Jonsson et al. 1994; Offield et al. 1996) et par l'existence d'une mutation naturelle chez l'humain (Stoffers et al. 1997). Dans les deux cas, le pancréas est absent confirmant hors de tout doute l'importance de ce facteur pour le développement de cette glande, et le définissant comme un gène clé du pancréas. Ainsi, les résultats de l'inactivation du gène *Ptx1* chez la souris seront décisifs quant à l'importance de ce facteur dans l'organogenèse et la fonction hypophysaire.

### **Propriétés des facteurs Ptx**

Depuis l'identification du facteur Ptx1, deux autres facteurs apparentés à Ptx1 ont été isolées et nommées Ptx2 (Gage et al. 1997; Arakawa et al. 1998; Semina et al.

1996; Mucchielli et al. 1996) et Ptx3 (Smidt et al. 1997; Semina et al. 1997; Semina et al. 1998), formant ainsi une nouvelle famille d'homéoprotéines de type bicoïde. De plus, deux isoformes du facteur Ptx2, Ptx2b et Ptx2c, ont aussi été identifiées (Gage et al. 1997; Arakawa et al. 1998) et j'ai isolé et caractérisé une nouvelle isoforme pour le facteur Ptx1, Ptx1b (chapitre III). Les homéoprotéines de la famille Ptx peuvent être classées en deux sous-familles, Ptx1 et Ptx2 versus Ptx3, d'après leurs séquences peptidiques et leurs domaines d'expression. En fait, Ptx1 et Ptx2 sont co-exprimés dans le stomodeum et leur expression est maintenue dans ses dérivés, dont l'hypophyse (Mucchielli et al. 1996; Lanctôt et al. 1997; Tremblay et al. 1998). Ptx3 n'est pas exprimé dans ces tissus mais est plutôt présent dans les neurones mésencéphaliques dopaminergiques et dans les yeux (Smidt et al. 1997; Semina et al. 1997). J'ai montré que tous les membres de la familles Ptx ont des propriétés de liaison à l'ADN similaire *in vitro* (chapitre III et annexe III) ce qui est en accord avec le haut niveau de conservation de la séquence peptidique de l'homéodomaine (58/60 acides aminés identiques) et du fait que l'homéodomaine seul est suffisant pour la liaison à l'ADN *in vitro* (Desplan et al. 1988; Treisman et al. 1989). Les trois facteurs Ptx reconnaissent la séquence TAA(T/G)CC avec la même spécificité (chapitre III et annexe III). D'autres homéoprotéines apparentées à bicoïde, comme Otx1 et Otx2, se lient aussi à cette séquence *in vitro* (Smidt et al. 1997; Acampora et al. 1998), mais activent plus faiblement la transcription que ne le font les facteurs Ptx (annexes II et III). De plus, les facteurs Otx n'agissent pas en synergie avec SF-1 au niveau du promoteur LH $\beta$  (chapitre IV) suggérant la présence de régions à l'extérieur de l'homéodomaine importantes pour la fonction des facteurs Ptx et soulignant l'importance d'une étude de la structure-fonction du facteur Ptx1. Une telle étude, présentée au chapitre IV, a mis en évidence deux domaines d'activation dans la protéine Ptx1 situés de part et d'autre de l'homéodomaine en plus de localiser la région impliquée dans l'interaction avec le

facteur SF-1. Donc, en plus des patrons d'expression complémentaires entre les facteurs des familles Ptx et Otx au cours du développement des structures antérieures, la capacité de ces facteurs à boîte homéo à activer la transcription et à interagir en synergie avec d'autres facteurs de transcription peut aussi être responsable de leur spécificité d'action au cours du développement.

À l'intérieur de la famille Ptx, les facteurs Ptx1 et Ptx2 de même que leurs isoformes Ptx1b, Ptx2b et Ptx2c, sont tous capables de coopérer avec plusieurs autres facteurs de transcription tels SF-1, Egr-1, Pit1, et NeuroD1/Pan1 (chapitre III). Dans ce cas, d'autres mécanismes doivent exister afin de conférer une spécificité d'action aux facteurs Ptx. Une partie de cette spécificité peut être conférée par des patrons d'expression différents, ce qui est le cas pour Ptx1/Ptx2 comparativement à Ptx3 (Lanctôt et al. 1997; Mucchielli et al. 1996; Smidt et al. 1997; Semina et al. 1997). Les ARNm de Ptx1 et Ptx2 sont toutefois co-détectés dans le stomodeum et ses dérivés au cours du développement, avec quelques exceptions pour certains dérivés mésenchymateux (Lanctôt et al. 1997; Mucchielli et al. 1996). Il est cependant possible qu'une seule de ces protéines soit présente dans la cellule, ce qui n'a pas été analysé jusqu'à maintenant. Le contrôle traductionnel existe et pourrait constituer un mécanisme important du contrôle de l'expression de Ptx2 dans un modèle de cellules gonadotropes, les cellules  $\alpha$ T3-1. En effet, les ARNm de Ptx1 et Ptx2 sont présents dans cette lignée cellulaire mais j'ai montré que ces cellules contiennent presque exclusivement la protéine Ptx1 (chapitre II). La traduction semble aussi être impliquée dans le contrôle de l'expression de Ptx1b puisque la protéine Ptx1b n'a pu être détectée dans plusieurs lignées hypophysaires malgré la présence de son ARNm (chapitre III). Il semble ainsi que le contrôle de l'expression des membres de la famille Ptx, autant au niveau transcriptionnel que traductionnel, représente une façon de moduler leur spécificité d'action *in vivo*. Un autre mécanisme pour expliquer leur

spécificité d'action *in vivo* pourrait impliquer leur interaction avec des partenaires ou co-facteurs qui moduleraient leurs propriétés de liaison à l'ADN. Tel est le cas des facteurs homéotiques Hox. En effet, plusieurs homéoprotéines de cette famille reconnaissent avec une affinité et une spécificité similaire la même séquence d'ADN *in vitro* (Ekker et al. 1994; Gehring et al. 1994; Bürglin, 1993). Ceci est plutôt contrastant avec leurs fonctions spécifiques *in vivo*. Une partie de cette spécificité est obtenue d'une part par des patrons d'expression différentiels (Bürglin, 1993) et d'autre part via des interactions avec des membres d'une autre famille d'homéoprotéines, les facteurs Pbx et Meis1. Ces facteurs interagissent directement avec les facteurs Hox et augmentent ainsi leur affinité et leur spécificité de liaison à l'ADN *in vivo* pour certaines séquences cibles spécifiques (Mann et al. 1996; Chang et al. 1997; Berthelsen et al. 1998a; Berthelsen et al. 1998b; Kroon et al. 1998). De tels co-facteurs impliqués dans l'action des homéoprotéines de la famille Ptx, s'ils existent, restent toutefois à être identifiés.

### **Implication de Ptx1 dans l'axe de la reproduction**

J'ai montré au chapitre II que Ptx1 est exprimé dans tous les types cellulaires qui composent l'hypophyse quoiqu'à différents niveaux. Les cellules exprimant les plus hauts niveaux de Ptx1 ont par la suite été identifiés comme les gonadotropes [chapitre II et (Lanctôt et al. 1998)]. Ces cellules constituent une composante essentielle de l'axe de la reproduction (hypothalamus / cellules gonadotropes de l'hypophyse / gonades). En effet, leur présence est cruciale au développement des gonades ainsi qu'à la fonction reproductive (voir section 1.2.2.2). Ceci a été clairement démontré par des expériences d'ablation de ce type cellulaire par expression de la chaîne A de la toxine diphtérique chez des souris transgéniques (Kendall et al. 1991). Ces souris sont hypogonadiques et ont des organes génitaux internes et externes sous-développés (Kendall et al. 1991).



Ces effets des cellules gonadotropes s'effectuent par l'entremise des deux hormones qu'elles sécrètent, LH et FSH.

Les facteurs de transcription impliqués dans l'expression basale ou induite par la GnRH du gène LH $\beta$  sont par conséquent considérés comme essentiels non seulement pour l'expression de ce gène mais aussi au développement et à la fonction gonadique, et à une échelle plus large, au bon fonctionnement de tout l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. Jusqu'à maintenant, trois facteurs de transcription sont impliqués dans l'expression du gène LH $\beta$ : le récepteur nucléaire orphelin SF-1 (Halvorson et al. 1996; Keri et al. 1996), le facteur de réponse immédiate précoce Egr-1 (Lee et al. 1996a; Topilko et al. 1998), et l'homéoprotéine Ptx1 (chapitre II). Ces trois facteurs agissent individuellement, de façon synergique deux à deux, et coopèrent aussi tous ensemble pour l'activation du promoteur LH $\beta$  (chapitres II, IV et V).

Le facteur SF-1 a originellement été identifié comme facteur clé de l'expression de plusieurs gènes spécifiques aux tissus stéroïdogéniques tels les surrénales et les cellules de Leydig des testicules (Lala et al. 1992; Parker et al. 1997). Maintenant, SF-1 est bien caractérisé aussi pour son implication à tous les niveaux de l'axe de la reproduction (Parker et al. 1997) puisqu'il y régule l'expression de plusieurs gènes, dont le gène LH $\beta$  des cellules gonadotropes de l'hypophyse tel que mentionné ci-haut, et le gène codant pour l'hormone anti-Müllerienne (MIS) spécifique aux cellules de Sertoli des testicules (Ingraham et al. 1994; Giuili et al. 1997). Cette hormone induit la régression des canaux de Müller dans les gonades indifférenciées des embryons XY ce qui permet la différenciation sexuelle masculine. Ainsi, de par ces nombreuses fonctions, SF-1 ne peut être le seul facteur responsable de l'expression histo-spécifique de ces gènes. L'existence de ligands ou de co-facteurs spécifiques à ces tissus qui modèleraient l'activité de SF-1 a longtemps été postulée. Un ligand de SF-1 a d'ailleurs été proposé



dans les tissus stéroïdogéniques, à savoir le 25-hydroxycholestérol (Lala et al. 1997), mais une récente étude a démontré que ce dernier n'est pas un ligand de SF-1 *in vivo* (Mellon et al. 1998). Ainsi, SF-1 demeure un récepteur nucléaire orphelin.

L'activation de deux promoteurs cibles de SF-1, LHB $\beta$  et MIS, peut être significativement augmentée par la délétion du LBD de SF-1, ce qui suggère que cette partie de la protéine masque le domaine proximal d'activation de SF-1 (localisé entre les résidus 187 et 245). Une récente étude a montré que le LBD de SF-1 est impliqué dans une interaction avec le récepteur nucléaire Dax-1, un récepteur atypique qui ne contient pas de DBD, menant à la répression de l'activation dépendante de SF-1. En fait, Dax-1 interagit simultanément avec le co-répresseur N-CoR et c'est ce dernier qui est responsable de la répression (Crawford et al. 1998). Ainsi, la délétion du LBD de SF-1 empêche l'interaction avec le complexe Dax-1/N-CoR dérèprimant par conséquent SF-1. Dans le cas de la vaste majorité des récepteurs nucléaires non-stéroïdiens, la liaison d'un ligand induit un changement de conformation du récepteur et il s'en suit la dissociation du co-répresseur et l'association avec un co-activateur. Une interaction entre SF-1 et le co-activateur SRC-1 a de fait récemment été documentée (Ito et al. 1998; Crawford et al. 1997). Des recherches subséquentes seront toutefois nécessaires à l'identification d'un ligand spécifique à SF-1 qui serait responsable d'un tel changement de conformation du récepteur.

Deux co-facteurs de SF-1 ont cependant récemment été identifiés: Ptx1 dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse (chapitres II et IV), et le produit du gène Wilim's tumour 1 (WT-1) dans les cellules de Sertoli (Nachtigal et al. 1998). L'expression histo-spécifique de ces deux facteurs permettrait d'expliquer la modulation de l'activité de SF-1 dans ces deux tissus cibles. Les deux co-facteurs, Ptx1 et WT-1, interagissent directement avec la région N-terminale (acides aminés 1-279) de SF-1 menant à l'activation synergique des promoteurs LHB $\beta$  et MIS, respectivement [chapitre

IV et (Nachtigal et al. 1998)]. Quoique le mécanisme exact menant à l'activation de SF-1 par ces co-facteurs ne soit pas entièrement élucidé, j'ai mis en évidence que l'interaction entre Ptx1 et SF-1 induit une activation de SF-1 similaire à celle obtenue par la délétion de son LBD. Cette interaction protéine-protéine Ptx1/SF-1 semble ainsi contourner la nécessité d'un ligand pour l'activation de SF-1 (chapitre IV). Cette interaction entre une homéoprotéine et un récepteur nucléaire constitue un nouveau mécanisme d'activation des récepteurs nucléaires dont un modèle est présenté à la Fig. 4-8 (chapitre IV). Il est concevable que l'interaction de SF-1 avec Ptx1 (ou WT-1) induise un changement de conformation dans le récepteur, tout comme le fait normalement un ligand, menant alors à la dissociation du co-répresseur Dax-1/N-CoR et l'association avec le co-activateur SRC-1. Un tel changement de conformation de SF-1, la dissociation du co-répresseur et l'association du co-activateur suite à l'interaction avec Ptx1 (ou WT-1) reste cependant à démontrer. Néanmoins, cette interaction entre Ptx1/SF-1 peut aussi activer SF-1 non seulement au niveau du promoteur LH $\beta$  mais aussi au niveau de certains autres promoteurs qui contiennent uniquement un site de liaison pour SF-1 comme le promoteur du gène MIS (chapitre IV). De plus, une synergie avec SF-1 est aussi observée avec d'autres membres de la famille Ptx dont Ptx1b, Ptx2 et Ptx2b (chapitre III) mais pas avec d'autres homéoprotéines de type bicoïde comme Otx1 et Otx2 (chapitre IV). Ainsi, toute homéoprotéine de la famille Ptx peut agir comme modulateur de l'activité de SF-1 au cours du développement et chez l'adulte. Quoique Ptx1 et SF-1, de par leur expression dans les cellules gonadotropes et leur coopération au niveau du promoteur LH $\beta$  représentent certes une composante importante de l'expression du gène LH $\beta$ , ils ne peuvent à eux seuls être responsables de l'activation de ce gène en réponse à l'hormone hypothalamique GnRH. D'une part, j'ai montré que leur expression n'est pas affectée par cette hormone (chapitre V), et d'autre part, il a été

démontré hors de tout doute que SF-1 n'est pas impliqué dans la stimulation du gène LH $\beta$  en réponse à la GnRH puisque cette stimulation se produit dans des souris SF-1<sup>-/-</sup> (Ikeda et al. 1995).

La GnRH est une hormone cruciale au développement et au maintien de la fonction reproductive. Des mutations naturelles dans les gènes GnRH (souris *hpg*) ou GnRH-R causent l'hypogonadisme dû à l'absence de production de LH et FSH (Layman et al. 1998; Mason et al. 1986), démontrant clairement l'importance de ce système hormone/récepteur au développement et au maintien de la fonction reproductive. Plusieurs agonistes et antagonistes de cette hormone ont été développés permettant ainsi l'avancement rapide de nos connaissances dans le domaine de la reproduction de même que le développement d'applications cliniques pour la contraception et pour le traitement de plusieurs maladies comme le cancer de la prostate, l'endométriose, la puberté précoce, et l'infertilité (Conn et al. 1991). La liaison de la GnRH à son récepteur induit l'activation de la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC) et une augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca<sup>++</sup> (Ben-Menahem et al. 1994; Kaiser et al. 1997). En accord avec ce double mode d'action de la GnRH, une récente étude de Saunders et al. a montré que l'activation de l'expression des gènes LH $\beta$  et FSH $\beta$  s'effectue par l'entremise de la voie dépendante de PKC, alors que l'activation de la  $\alpha$ GSU se produit essentiellement via l'augmentation du calcium intracellulaire (Saunders et al. 1998). Cependant, les facteurs de transcription en aval de ces voies de signalisation et responsables de l'activation de l'expression des gènes des gonadotropines demeuraient inconnus. Mes travaux présentés au chapitre V ont toutefois mené à l'identification d'un tel facteur de transcription.

En effet, j'ai montré que le facteur de réponse immédiate précoce Egr-1 est un effecteur de la stimulation de la transcription du gène LH $\beta$  induite par la GnRH. Egr-1

était déjà connu comme un facteur de transcription impliqué dans l'expression du gène LH $\beta$  (Lee et al. 1996a; Le Drean et al. 1997). Cependant, son mécanisme d'action demeurait inconnu. J'ai montré que l'expression du gène *Egr-1* est rapidement, fortement et transitoirement stimulée par la GnRH dans des cellules gonadotropes en culture. En effet, l'expression de *Egr-1* est augmentée d'un facteur 50, moins de 30 minutes après stimulation pour retourner à des niveaux de base en quelques heures, ce qui est en accord avec l'augmentation rapide et transitoire de l'expression du gène LH $\beta$  en réponse à la GnRH. Ce mode d'action constitue donc une caractéristique essentielle d'un tel effecteur transcriptionnel. D'autre part, j'ai montré que cette stimulation de l'expression de *Egr-1* passe spécifiquement par la voie de signalisation de PKC, et non par l'augmentation du calcium intracellulaire, en accord avec les données de Saunders. En plus de stimuler l'expression de *Egr-1*, PKC, contrairement à d'autres protéines kinases, amplifie aussi l'activation du promoteur LH $\beta$  dépendante de *Egr-1*, suggérant ainsi qu'une modification post-traductionnelle, telle la phosphorylation, peut moduler l'activité de *Egr-1*. En fait, Huang et al. ont montré que la forme phosphorylée de *Egr-1* se lie à l'ADN plus efficacement (Huang et al. 1994). D'autres études ont montré que l'activité de liaison à l'ADN de *Egr-1* est augmentée par des inhibiteurs des protéines phosphatases 1 et 2A (Cao et al. 1993). L'ensemble de ces données suggèrent donc que l'activation de l'expression de LH $\beta$  par *Egr-1*, en réponse à la GnRH, impliquerait deux mécanismes complémentaires: (1) la stimulation de l'expression du gène *Egr-1*, et (2) la stimulation du potentiel de transactivation de *Egr-1* par une phosphorylation dépendante de PKC (chapitre V).

La séquence et la position (à environ -45 pb) du site de liaison du facteur *Egr-1* dans le promoteur LH $\beta$  sont conservées chez plusieurs espèces, ce qui est consistant avec des études qui ont montré que la région promotrice jusqu'à environ -80 pb du gène

LH $\beta$  est toujours stimulée par la GnRH (Kaiser et al. 1998). Cependant, la stimulation induite par la GnRH est plus forte lorsque d'autres régions promotrices plus en amont sont présentes (Kaiser et al. 1998). Trois modèles, qui ne sont pas mutuellement exclusifs, peuvent être proposés pour expliquer ces données: (1) d'autres facteurs, en plus de Egr-1, sont aussi impliqués où induits en réponse à la GnRH, (2) Egr-1 induit directement l'expression et/ou l'activation d'un autre facteur de transcription, et/ou (3) Egr-1 interagit directement avec d'autres facteurs de transcription liés à des séquences en amont, stimulant ainsi la transcription de façon synergique. Des études ont effectivement montré que la GnRH induit l'expression du gène *c-fos*, un autre membre de la famille de réponse immédiate précoce (Naor et al. 1998). Cependant, ce dernier n'a pas été impliqué dans l'expression du gène LH $\beta$  mais pourrait être responsable de la stimulation du gène FSH $\beta$  en réponse à la GnRH puisque le complexe AP-1 (Fos/Jun) est un activateur important du promoteur FSH $\beta$  (voir section 1.4.5). Ainsi, malgré le fait qu'on ne peut exclure les deux premiers modèles présentés ci-haut, mes données supportent plutôt le troisième modèle. En effet, les résultats présentés au chapitre V montrent dans une première étape que Egr-1 agit en synergie avec Ptx1 et SF-1 pour stimuler le promoteur LH $\beta$ , et que d'autre part Egr-1 interagit directement avec Ptx1 et SF-1. Il semble que la coopération entre Egr-1 et SF-1 requiert la présence des deux sites de liaison intacts. Toutefois, pour la coopération transcriptionnelle entre Egr-1 et Ptx1 au niveau du promoteur LH $\beta$ , un seul site de liaison pour l'un ou l'autre des facteurs est requis. Ainsi, quoique la présence de Ptx1 lié à son élément de réponse soit suffisante à l'activation du promoteur LH $\beta$  (chapitres II, IV et V), elle apparaît tout aussi suffisante à l'amplification de la stimulation transcriptionnelle en association avec Egr-1 (chapitre V). En accord avec ce modèle, le promoteur LH $\beta$  contient plusieurs sites de liaison potentiels de Ptx1 (Table 2-1 – chapitre II) dont certains sont localisés dans

des régions impliquées dans la réponse à la GnRH. Ainsi, l'ensemble de ces données m'ont permis de proposer un modèle présenté à la Fig. 5-8 (chapitre V) dans lequel Egr-1 est fortement induit et activé par la GnRH et coopère ensuite physiquement et transcriptionnellement avec deux autres facteurs de transcriptions, Ptx1 et SF-1, pour provoquer une augmentation rapide et transitoire de l'expression du gène LH $\beta$  dans les cellules gonadotropes. Egr-1 ne semble pas agir comme un co-facteur de SF-1, tout comme le fait Ptx1 (voir plus haut et chapitre V), mais il agirait plutôt comme un "amplificateur" de la synergie entre Ptx1 et SF-1. Ce modèle d'activation du gène LH $\beta$  par Egr-1 est supporté par la caractérisation de souris Egr-1<sup>-/-</sup> qui sont hypogonadiques puisqu'elles n'expriment pas le gène LH $\beta$  (Lee et al. 1996a; Topilko et al. 1998) malgré la présence de certains autres marqueurs de différenciation de la lignée gonadotrope tels FSH $\beta$  et  $\alpha$ GSU. Ceci suggère que Egr-1 n'est pas impliqué dans la différenciation de cette lignée mais plutôt directement dans l'expression du gène LH $\beta$ . De plus, l'ablation des gonades, qui induit une augmentation de la sécrétion de la GnRH par l'hypothalamus, stimule l'expression du gène FSH $\beta$  dans ces souris sans stimuler celle de LH $\beta$  (Lee et al. 1996a). Ainsi, l'ensemble des données concernant l'implication de Ptx1 seul et en association avec les facteurs SF-1 et Egr-1 dans l'expression du gène LH $\beta$  suggèrent un rôle important pour ce facteur à boîte homéo dans la fonction des cellules gonadotropes et par conséquent dans l'axe de la reproduction.

### **Perspectives**

Les résultats présentés dans la présente thèse constituent une importante contribution à nos connaissances sur l'implication et le mode d'action du facteur de transcription à homéodomaine Ptx1 dans la fonction hypophysaire. La meilleure façon de valider ces résultats *in vivo* est sans contredit l'inactivation du gène *Ptx1* par

recombinaison homologue dans la souris. Aussi puissante que puisse être cette approche, le phénotype obtenu peut toutefois être différent de celui attendu ou espéré. L'inactivation du gène *Egr-1* est un exemple d'une telle situation. En effet, en utilisant des modèles cellulaires, plusieurs études avaient démontré l'importance du facteur *Egr-1* dans le contrôle de la différenciation des macrophages et de la prolifération des lymphocytes T (Nguyen et al. 1993; Perez-Castillo et al. 1993), de même que dans l'expression du gène *PDGF-B* (platelet-derived growth factor-B) des cellules endothéliales (Khachigian et al. 1996). Ces observations n'ont cependant pas été corroborées dans les souris *Egr-1<sup>-/-</sup>*, ces dernières étant plutôt hypogonadiques dû à l'absence d'expression du gène *LHβ* (Lee et al. 1996b; Lee et al. 1996a; Topilko et al. 1998). Similairement, l'inactivation des gènes codant pour les récepteurs nucléaires *RARα*, *β* et *γ*, pour les facteurs de transcription bHLH myogénique *MyoD*, *Myf-5* et *MRF4*, de même que récemment pour le gène *HNF3γ*, n'a eu que peu d'effet chez la souris (Mendelsohn et al. 1994a; Rudnicki et al. 1992; Braun et al. 1992; Patapoutian et al. 1995; Kaestner et al. 1998). Quoique surprenant étant donné les nombreuses fonctions qui leur sont attribuées dans des systèmes de cellules en culture principalement au cours de la différenciation cellulaire, l'absence ou le faible phénotype peut être attribué à la redondance entre facteurs d'une même famille dont l'expression est souvent augmentée afin de compenser la perte du facteur délété. Ainsi, pour observer un effet plus marqué, de doubles ou même triples inactivations géniques simultanées ont dûes être effectuées (Lohnes et al. 1994; Mendelsohn et al. 1994b; Rudnicki et al. 1995; Weintraub, 1993; Braun et al. 1995; Rudnicki et al. 1993). Ainsi, comme *Ptx1* et *Ptx2* sont tous deux exprimés dans le stomodeum et plusieurs de ses dérivés dont l'hypophyse, il est possible qu'une telle redondance entre ces deux facteurs soit observée *in vivo*, quoique mes données de "knockdown" de *Ptx1* par une approche



de surexpression d'ARN antisens dans des cellules en culture, n'a pas mené à une induction de l'expression de *Ptx2* (chapitre II). D'autre part, en absence de redondance, il serait intéressant de voir si l'ajout (knock-in) du gène *Ptx2* sous le contrôle des éléments de régulation du gène *Ptx1* pourrait r chapper (rescue) le phénotype des souris *Ptx1*<sup>-/-</sup>, tel que récemment démontré pour les gènes *Otd* (drosophile) et *Otx1* (vertébré) (Nagao et al. 1998). Alternativement, comme *Ptx1* est exprimé tôt au cours de l'embryogenèse, avant même la spécification hypophysaire, il est possible que l'inactivation du gène *Ptx1* cause la mort *in utero* avant même l'apparition des marqueurs hypophysaires, auquel cas il sera impossible de valider l'importance de ce facteur dans la fonction hypophysaire. Une approche alternative devra alors être envisagée. Cette approche consiste en l'inactivation d'un gène de façon histo-spécifique, comme par exemple l'inactivation de *Ptx1* dans l'hypophyse uniquement, en utilisant le système Cre-LoxP (Kuhn et al. 1995). Cette approche a déjà été utilisée avec succès lors de l'inactivation du gène *C/EBP * dans le foie (Lee et al. 1997), du gène *Pdx1* dans les cellules à du pancréas (Ahlgren et al. 1998), de même que de certains gènes cardiaques (Agah et al. 1997).

Une autre avenue de recherche très prometteuse est l'étude de la régulation de l'expression et de l'activité de *Ptx1*. En effet, les propriétés de liaison à l'ADN et/ou transcriptionnelles de *Ptx1* pourraient être soumises à une régulation post-traductionnelle telle la phosphorylation. Le principal point de contrôle de régulation de l'expression de *Ptx1* se situe sans doute au niveau transcriptionnel. Ainsi, l'isolement et la caractérisation du promoteur du gène *Ptx1* constitue un projet de recherche intéressant. Le patron d'expression de *Ptx1* dans le mésoderme latéral de même que dans le stomodeum et les dérivés stomodeaux permet de supposer l'existence d'éléments de régulation spécifiques à l'expression de *Ptx1* dans ces différents tissus.



La caractérisation et l'identification des facteurs de transcription qui se lient au promoteur du gène *Ptx1* permettront ainsi de remonter la cascade des régulateurs impliqués dans l'embryogenèse et le développement précoce.

Les molécules de signalisation constituent des candidats potentiels de la régulation de l'expression de *Ptx1* tôt au cours du développement. Ces molécules sécrétées constituent des signaux qui agissent sur les cellules avoisinantes, leur transmettant ainsi l'information nécessaire pour leur devenir cellulaire. Plusieurs molécules de signalisations sont aujourd'hui connues et regroupées en différentes familles: BMP (Hogan, 1996), FGF, Wnt (Cadigan et al. 1997), et TGF $\beta$  (Kingsley, 1994). Ces molécules, impliquées dans le développement de presque tous les tissus et organes, n'agissent cependant qu'à un moment précis au cours du développement. Deux études récentes ont démontré que de telles molécules de signalisation, particulièrement BMP2, BMP4, BMP7, FGF8 et Wnt5a, sont requises au développement précoce de l'hypophyse (Ericson et al. 1998; Treier et al. 1998). De fait, elles modulent l'expression de certains facteurs de transcription exprimés dans l'hypophyse, entre autres *Isl-1*, *GATA-2* et *Lim3/Lhx3*. Il est raisonnable et logique de croire que ces molécules puissent aussi affecter l'expression de *Ptx1*. D'autre part, de récentes études ont démontré que l'expression de *Ptx2*, un autre membre de la famille *Ptx*, dans les dérivés mésodermiques est stimulée et même étroitement dépendante des molécules de signalisation Nodal et Sonic hedgehog (*Shh*) (Ryan et al. 1998; Logan et al. 1998b; Piedra et al. 1998). Toujours en accord avec un rôle pour de telles molécules dans la régulation de l'expression de *Ptx1*, Helms et al. ont démontré que Sonic hedgehog de même que son récepteur, *patched (ptc)*, sont exprimés dans l'ectoderme du stomodeum, site précoce de l'expression de *Ptx1* (Helms et al. 1997). Ainsi, il apparaît logique que *Ptx1* soit une cible de choix de ces molécules de signalisation au cours de l'embryogenèse.

En conclusion, les facteurs de transcription Ptx1, Ptx2 et Ptx3 forment une nouvelle famille d'homéoprotéines de type bicoïde et ils représentent certes une classe critique de régulateurs transcriptionnels. En effet, de nombreux rôles ont été proposés et démontrés dans certains cas, pour les membres de cette famille, et ce dans plusieurs processus biologiques importants (Smidt et al. 1997; Ikeda et al. 1993; Semina et al. 1996; Mucchielli et al. 1997; Ryan et al. 1998; Yoshioka et al. 1998; Logan et al. 1998b; Piedra et al. 1998; Lanctôt et al. 1997; Logan et al. 1998a; Lamonerie et al. 1996; Crawford et al. 1997). Les travaux présentés dans cette thèse élargissent le champs d'action et la fonction de Ptx1, le prototype de cette famille. En fait, mes travaux ont permis de définir un rôle majeur et global pour Ptx1 et d'élucider son mode d'action dans plusieurs aspects de la fonction hypophysaire, allant de son développement jusqu'à l'expression histo-spécifique de plusieurs gènes (chapitres II, III, IV et V). L'importance de Ptx1 dans ces processus biologiques est supporté par le fait qu'il est conservé dans diverses espèces telles la drosophile (Vorbruggen et al. 1997) et le poulet (Crawford et al. 1997), et ce malgré la pression évolutive de plusieurs milliers d'années.

## **ANNEXE I**

### **IMPLICATION DE Ptx1 DANS L'EXPRESSION DU GÈNE POMC**

Cette annexe décrit les travaux qui ont mené au clonage du facteur Ptx1 et met en évidence ma participation à la réalisation de cet article en présentant entre autres les figures représentant ma contribution.

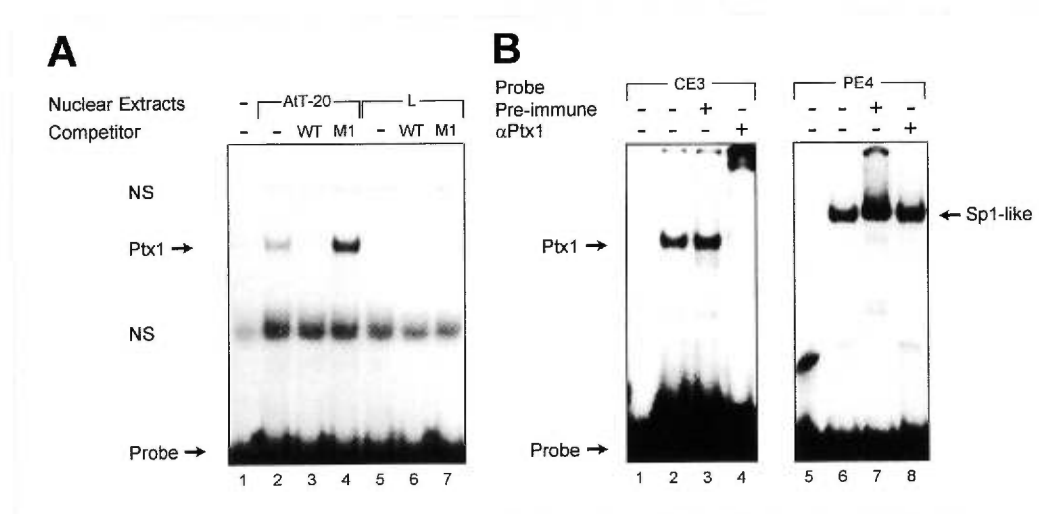
**Ptx1, a *bicoid*-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene**

Thomas Lamonerie, Jacques J. Tremblay, Christian Lanctôt,  
Marc Therrien, Yves Gauthier and Jacques Drouin

*Genes & Development* 10:1284-1295 (1996)

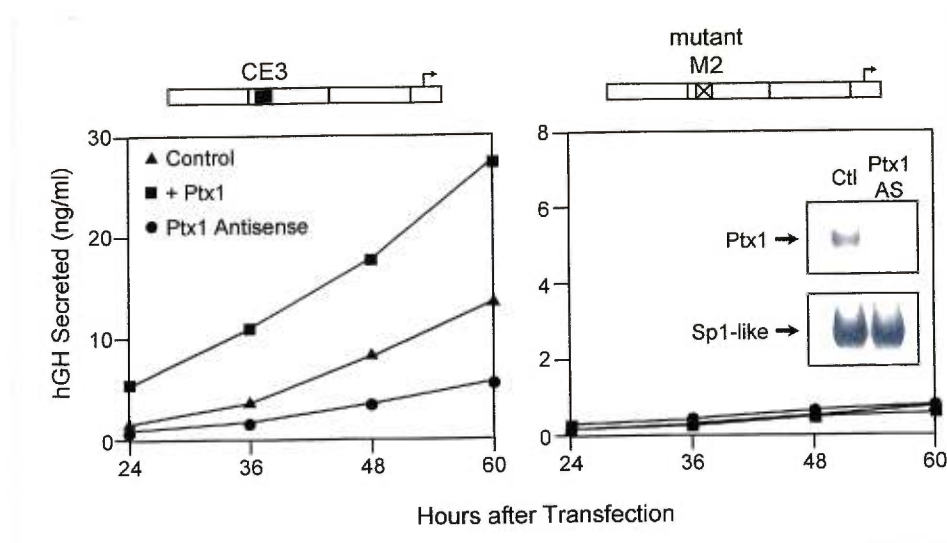
L'hypophyse est composée de six types cellulaires qui apparaissent de façon séquentielle au cours de l'organogenèse. Les premières cellules à apparaître sont celles exprimant le gène de la pro-opiomélanocortine (POMC) dans le lobe antérieur de l'hypophyse. Les autres lignées dépendantes du facteur POU Pit1 de même qu'un autre type cellulaire exprimant la POMC dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse apparaissent subséquentement. Grâce aux cellules AtT-20, un modèle cellulaire de l'expression précoce de la POMC au niveau de l'hypophyse antérieure, nous avons caractérisé un élément de régulation conférant la spécificité transcriptionnelle de POMC dans ces cellules et nous avons cloné le facteur se liant à cet élément. Ce facteur, Ptx1 (pituitary homeo box 1), contient une boîte homéo apparentée à celle de gènes spécifiques aux structures antérieures soient *bicoïde* et *orthodenticle* chez la drosophile et Otx1 et Otx2 chez les vertébrés. Ptx1 active la transcription en se liant à un élément dont la séquence est similaire au site de liaison de bicoïde chez la drosophile. Ptx1 est le seul facteur nucléaire possédant cette spécificité de liaison présent dans les cellules AtT-20 (Fig. AI-1), et il est exprimé dans une sous-population de cellules du lobe

antérieur de l'hypophyse qui expriment la POMC. Ptx1 est aussi exprimé dans la plupart des cellules de la poche de Rathke à un stade précoce du développement hypophysaire avant la différenciation terminale des différents types cellulaires. Ces données suggèrent que Ptx1 puisse jouer un rôle dans la différenciation des cellules hypophysaires, alors que son patron d'expression précoce sous-tend un rôle potentiel pour Ptx1 dans la formation de l'hypophyse. Dans l'hypophyse adulte, Ptx1 semble être un facteur clé de l'expression du gène POMC tel que démontré par des expériences de surexpression d'ARN antisens (Fig. AI-2).



**Fig. AI-1.** La protéine Ptx1 est présente dans les cellules AtT-20.

(A) Retardement sur gel de protéines nucléaires de cellules AtT-20 liant l'élément CE3. Une seule bande spécifique à l'élément CE3 (identifiée Ptx1) est observée dans les cellules AtT-20 et non dans les cellules L. Cette liaison est compétitionnée par un excès molaire (100 X) de la sonde CE3 (WT), mais pas du mutant inactif M1. (B) La protéine des cellules AtT-20 se liant spécifiquement à l'élément CE3 (identifiée Ptx1) est encore plus retardée en présence d'un antiserum dirigé contre GST-Ptx1 ( $\alpha$ Ptx1) mais pas en présence du sérum pré-immun. L'antisérum n'affecte pas la liaison d'une autre protéine se liant à l'élément PE4 (identifiée Sp1-like) du promoteur POMC (Therrien et al. 1991) présente dans les mêmes extraits nucléaires. NS: non-spécifique.



**Fig. AI-2.** Blocage de l'activité du promoteur POMC par surexpression d'ARN antisens de Ptx1 dans les cellules AtT-20.

Deux rapporteurs contenant le promoteur POMC (-480 bp à + 63 bp) fusionné à l'hormone de croissance humaine (hGH) ont été utilisés afin de déterminer l'implication de Ptx1 dans l'activité promotrice. Un rapporteur contient la mutation M2, une mutation qui détruit le site de liaison de Ptx1 (droite), alors que l'autre correspond au promoteur intact (gauche). Les échantillons témoins ont été co-électroporés dans les cellules AtT-20 avec le vecteur d'expression vide (cercle), alors que les autres échantillons contenaient un vecteur d'expression pour Ptx1 dans l'orientation sens (+ Ptx1) ou antisens (Ptx1 antisense). Les données présentées correspondent à une expérience de transfection typique effectuée en duplicata. Des résultats similaires ont été obtenus dans quatre autres expériences et des cellules transfectées de façon stable ont par la suite été obtenues. La différence d'activité entre les deux rapporteurs était encore plus évidente dans les clones stables (données non présentées). De plus, l'activité de liaison à l'ADN de Ptx1 dans les clones AtT-20 stables antisens Ptx1 est dramatiquement réduite comparée à une autre protéine (Sp1-like) se liant à l'ADN (en médaillon).

## **ANNEXE II**

### **PROPRIÉTÉS DE Otx1**

Cette annexe décrit l'implication du facteur Otx1 dans la fonction post-natale de l'hypophyse et met en évidence ma participation à la réalisation de cet article en présentant entre autres les figures représentant ma contribution.

**Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking *Otx1* reveal  
prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH**

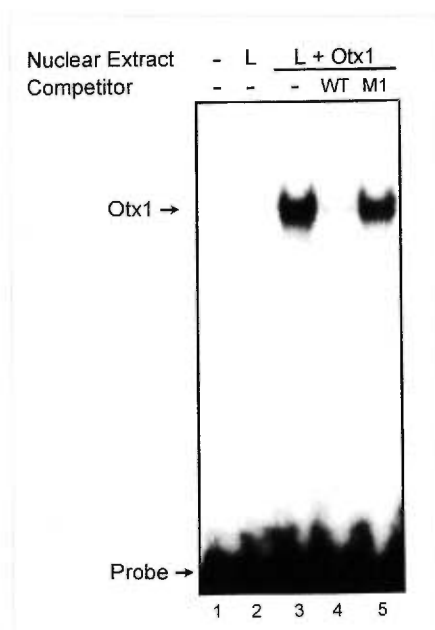
Dario Acampora, Sylvie Mazan, Francesca Tuorto, Virginia Avantaggio  
Jacques J. Tremblay, Domenico Lazzaro, Angela di Carlo, Angela Mariano,  
Paolo Emidio Macchia, Giorgio Corte, Vincenzo Macchia,  
Jacques Drouin, Philippe Brûlet and Antonio Simeone

*Development* **125**:1229-1239 (1998)

Par des approches génétiques et moléculaires, plusieurs gènes critiques à la détermination des types cellulaires de l'hypophyse et/ou de l'hypothalamus ont été identifiés. Cet article montre que *Otx1*, un gène à boîte homéo de type bicoïde de la famille *Otx*, est transcrit et traduit dans l'hypophyse post-natale. Des expériences de liaison *in vitro* ont montré que *Otx1* peut se lier spécifiquement à la séquence TAA(T/G)CC caractéristique des homéoprotéines de type bicoïde (Fig. All-1). De plus, des expériences de transfections de cellules en cultures indiquent que *Otx1* peut activer la transcription des gènes codant pour l'hormone de croissance (GH), l'hormone folliculostimulante ( $\beta$ FSH), l'hormone lutéinisante ( $\beta$ LH) et la sous-unité  $\alpha$  des hormones glycoprotéiques ( $\alpha$ GSU) (Fig. All-2). L'analyse de souris *Otx1*<sup>-/-</sup> a révélé qu'au stade pré-pubère, elles sont transitoirement naines et hypogonadiques dû à de très faibles

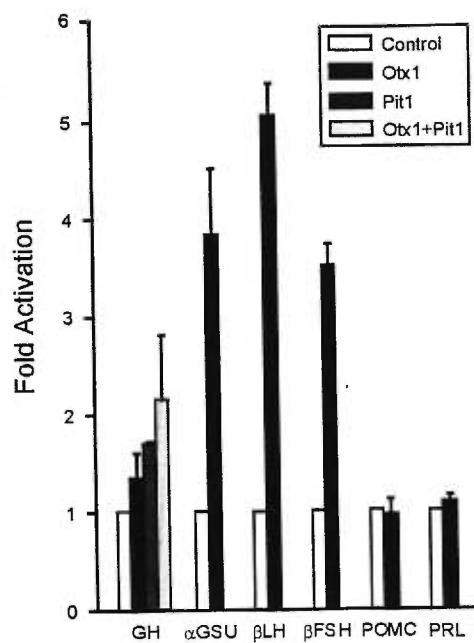


niveaux des hormones hypophysaires GH, FSH, LH, affectant par conséquent de façon dramatique le développement et la fonction de leurs organes cibles. Néanmoins, les souris *Otx<sup>-/-</sup>* récupèrent graduellement et présentent à quatre mois des niveaux normaux d'hormones hypophysaires. On observe aussi le rétablissement de la croissance et de la fonction des gonades. Le patron d'expression d'autres gènes restreints à l'hypophyse et à l'hypothalamus, tels les facteurs hypothalamiques de libération de la GH (GHRH) et des gonadotropines (GnRH) de même que leurs récepteurs hypophysaires (GHRH-R et GnRH-R), suggère que les cellules hypothalamiques et les lignées hypophysaires somatotropes et gonadotropes semblent normales dans les souris *Otx<sup>-/-</sup>*. Il apparaît que leur habileté à synthétiser la GH, FSH et LH, plutôt que le nombre des cellules produisant ces hormones, est affectée. Ces données indiquent que *Otx1* est un nouveau facteur de transcription hypophysaire impliqué dans le contrôle des niveaux hormonaux de GH, FSH et LH au stade post-natal mais pré-pubère. Ces travaux suggèrent l'existence d'un mécanisme de régulation complexe afin de contrôler les besoins physiologiques en hormones hypophysaires spécifiquement à des stades post-nataux.



**Fig. All-1.** *Otx1* se lie spécifiquement à une séquence apparentée à bicoïde.

Retardement sur gel montrant que *Otx1* se lie spécifiquement à l'élément CE3 du promoteur POMC (puits 3). Les complexes retardés présents aux puits 3 et 5 (identifiés *Otx1*) sont absents du contrôle (puits 2). La liaison de *Otx1* est compétitionnée par un excès de 200 X molaire de l'oligonucléotide sauvage (WT, puits 4) mais non d'un oligonucléotide contenant une mutation qui détruit le site de liaison de *Ptx1* (M1, puits 5) (Lamonerie et al. 1996).



**Fig. AII-2.** Otx1 active certains promoteurs hypophysaires.

Les propriétés transcriptionnelles de Otx1 ont été analysées sur les promoteurs GH,  $\alpha$ GSU,  $\beta$ LH,  $\beta$ FSH, POMC, et PRL par transfections transitoires des cellules CV-1. Seulement les promoteurs  $\alpha$ GSU,  $\beta$ LH,  $\beta$ FSH, et à un niveau moindre GH sont activés par Otx1. De plus, l'activation du promoteur GH par Pit1 seul et en association avec Otx1 a aussi été analysée.

## **ANNEXE III**

### **PROPRIÉTÉS DE Ptx3**

Cette annexe décrit le clonage et la caractérisation d'un nouveau membre de la famille Ptx, Ptx3, et met en évidence ma participation à la réalisation de cet article en présentant entre autres les figures représentant ma contribution.

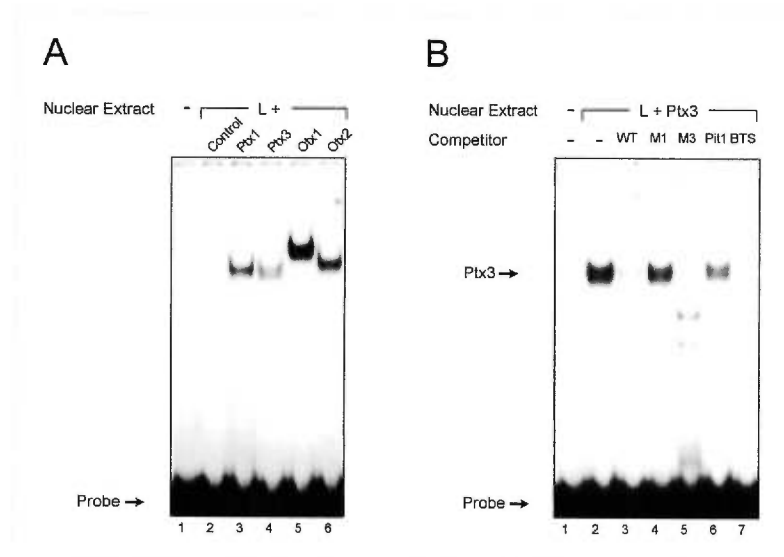
**A homeodomain gene *Ptx3* has highly restricted brain expression  
in mesencephalic dopaminergic neurons**

Marten P. Smidt\*, Hermien S. A. van Schaick\*, Christian Lanctôt\*,  
Jacques J. Tremblay, Joke J. Cox, Amo A. M. van der Kleij,  
Gerrit Wolterink, Jacques Drouin and J. Peter H. Burbach  
(\* co-first authors)

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**:13305-13310

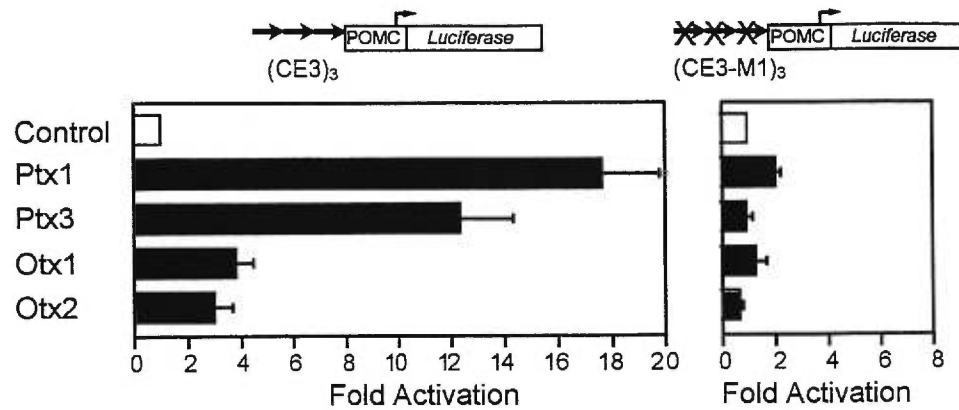
Le système mésencéphalique dopaminergique (mesDA) contrôle le comportement et le mouvement. Il a été impliqué dans des désordres d'ordre affectif et psychiatrique. Nous avons identifié un gène à boîte homéo de type bicoïde, *Ptx3*, un nouveau membre de la famille Ptx, exprimé uniquement dans ces neurones. Tout comme les autres homéoprotéines de type bicoïde connues chez les vertébrés (*Ptx1*, *Otx1* et *Otx2*), *Ptx3* peut se lier spécifiquement à l'élément TAATCC-like (Fig. AIII-1). *Ptx1* et *Ptx3* activent fortement un rapporteur simple constitué de trois copies de cet élément devant un promoteur minimal, alors que les facteurs de la famille *Otx* sont moins efficace à activer ce rapporteur (Fig. AIII-2), et ce malgré des niveaux d'expression et de liaison à l'ADN similaire pour les quatre facteurs de transcription (Fig. AIII-1). L'expression de *Ptx3* dès le jour e11.5 au cours du développement de la souris corrèle avec l'apparition des neurones mesDA. Le nombre de neurones exprimant *Ptx3*

est réduit chez patients atteints de la maladie de Parkinson, et ces neurones sont absentes chez des rats traités avec la 6-hydroxydopamine, un modèle animal pour cette maladie. Ainsi Ptx3 est un facteur de transcription spécifique aux neurones mesDA, et il est possible qu'il soit impliqué dans la détermination de cette lignée neuronale au cours du développement.



**Fig. AIII-1.** Propriétés de liaison à l'ADN de Ptx3.

(A) Comparaison de l'activité de liaison à l'élément CE3 du promoteur POMC de plusieurs facteurs apparentés à bicoïde, tels Ptx1, Ptx3, Otx1 et Otx2. (B) Ptx3 se lie spécifiquement à l'élément CE3. La liaison de Ptx3 à l'élément CE3 est compétitionnée par un excès (200 X molaire) d'oligonucléotides correspondants au site CE3 (WT), au mutant M3 qui contient une mutation à l'extérieur du site de liaison de Ptx1, et au site de liaison du facteur bicoïde présent dans le promoteur du gène *Hunchback* de la drosophile (BTS). La liaison n'est pas compétitionnée par un oligonucléotide non apparenté comme le site de liaison du facteur POU Pit1, et par un oligonucléotide contenant une mutation qui abolit la liaison et la transactivation par Ptx1 (M1).



**Fig. AIII-2.** Propriétés transcriptionnelles de Ptx3.

L'activité de Ptx3 sur un promoteur artificiel composé de trois copies de l'élément CE3 du promoteur POMC est comparable à celle de Ptx1, alors que celle de deux autres protéines apparentées à bicoïde, Otx1 et Otx2, est significativement plus faible (gauche). L'activation par tous les facteurs est absente lorsqu'une mutation est introduite dans le site de liaison (droite).

## RÉFÉRENCES

- Acampora, D., V. Avantaggiato, F. Tuorto, and A. Simeone. 1997. Genetic control of brain morphogenesis through Otx gene dosage requirement. *Development* **124**: 3639-3650.
- Acampora, D., S. Mazan, V. Avantaggiato, P. Barone, F. Tuorto, Y. Lallemand, P. Brulet, and A. Simeone. 1996. Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the Otx1 gene. *Nature Genetics* **14**: 218-222.
- Acampora, D., S. Mazan, Y. Lallemand, V. Avantaggiato, M. Maury, A. Simeone, and P. Brûlet. 1995. Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* **121**: 3279-3290.
- Acampora, D., S. Mazan, F. Tuorto, V. Avantaggiato, J.J. Tremblay, D. Lazzaro, A. di Carlo, A. Mariano, P.E. Macchia, G. Corte, V. Macchia, J. Drouin, P. Brûlet, and A. Simeone. 1998. Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking Otx1 reveal prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH. *Development* **125**: 1229-1239.
- Adamczewski, J.P., M. Rossignol, J.P. Tassan, E.A. Nigg, V. Moncollin, and J.M. Egly. 1996. MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH. *EMBO J.* **15**: 1877-1884.
- Ades, S.E. and R.T. Sauer. 1994. Differential DNA-binding specificity of the engrailed homeodomain: the role of residue 50. *Biochemistry* **33**: 9187-9194.
- Affolter, M., A. Schier, and W.J. Gehring. 1990. Homeodomain proteins and the regulation of gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**: 485-495.
- Agah, R., P.A. Frenkel, B.A. French, L.H. Michael, P.A. Overbeek, and M.D. Schneider. 1997. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre

- recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J. Clin. Invest.* **100**: 169-179.
- Agulnick, A.D., M. Taira, J.J. Breen, T. Tanaka, I.B. Dawid, and H. Westphal. 1996. Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* **384**: 270-272.
- Ahlgren, U., J. Jonsson, L. Jonsson, K. Simu, and H. Edlund. 1998.  $\beta$ -cell-specific inactivation of the mouse *lpf1/Pdx1* gene results in loss of the  $\beta$ -cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev.* **12**: 1763-1768.
- Akerblom, I.E., E.C. Ridgway, and P.L. Mellon. 1990. An alpha-subunit-secreting cell line derived from a mouse thyrotrope tumor. *Mol. Endocrinol.* **4**: 589-596.
- Alarid, E.T., J.J. Windle, D.B. Whyte, and P.L. Mellon. 1996. Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development* **122**: 3319-3329.
- Alland, L., R. Muhle, H. Hou, Jr., J. Potes, L. Chin, N. Schreiber-Agus, and R.A. DePinho. 1997. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**: 49-55.
- Allen, B.M. 1916. The results of extirpation of the anterior lobe of the hypophysis and of the thyroid of *Rana pipiens* larvae. *Science* **44**: 755-757.
- Allen, B.M. 1920. Experiments in the transplantation of the hypophysis of adult *Rana pipiens* to tadpoles. *Science* **52**: 274-276.
- Allfrey, V., R.M. Faulkner, and A.E. Mirsky. 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**: 786-794.
- Allison, L.A., J.K. Wong, V.D. Fitzpatrick, M. Moyle, and C.J. Ingles. 1988. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces*



- cerevisiae, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 321-329.
- Andres, V., B. Nadal-Ginard, and V. Mahdavi. 1992. Clox, a mammalian homeobox gene related to *Drosophila cut*, encodes DNA-binding regulatory proteins differentially expressed during development. *Development* **116**: 321-334.
- Ang, S.L., O. Jin, M. Rhinn, N. Daigle, L. Stevenson, and J. Rossant. 1996. A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* **122**: 243-252.
- Applequist, S.E., M. Selg, C. Raman, and H.M. Jack. 1997. Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense mRNA-reducing UPF1 protein. *Nucleic Acids Res.* **25**: 814--21
- Arakawa, H., T. Nakamura, A.B. Zhadanov, V. Fidanza, T. Yano, F. Bullrich, M. Shizumi, J. Blechman, A. Mazo, E. Canaani, and C.M. Croce. 1998. Identification and characterization of the *ARP1* gene, a target for the human acute leukemia *ALL1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4573-4578.
- Arany, Z., D. Newsome, E. Oldread, D.M. Livingston, and R. Eckner. 1995. A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature* **374**: 81-84.
- Archambault, J., F. Lacroute, A. Ruet, and J.D. Friesen. 1992. Genetic interaction between transcription elongation factor TFIIS and RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4142-4152.
- Archer, T.K., M.G. Cordingley, R.G. Wolford, and G.L. Hager. 1991. Transcription factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 688-698.
- Arias, J., A.S. Alberts, P. Brindle, F.X. Claret, T. Smeal, M. Karin, J. Feramisco, and M. Montminy. 1994. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* **370**: 226-229.

- Aspland, S.E. and R.A. White. 1997. Nucleocytoplasmic localisation of extradenticle protein is spatially regulated throughout development in *Drosophila*. *Development* **124**: 741-747.
- Auble, D.T., K.E. Hansen, C.G. Mueller, W.S. Lane, J. Thorner, and S. Hahn. 1994. Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes Dev.* **8**: 1920-1934.
- Austin, R.J. and M.D. Biggin. 1995. A domain of the even-skipped protein represses transcription by preventing TFIID binding to a promoter: repression by cooperative blocking. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4683-4693.
- Ayer, D.E., Q.A. Lawrence, and R.N. Eisenman. 1995. Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* **80**: 767-776.
- Aylwin, S.J. and J.M. Burrin. 1995. The role of transcription factors in the pituitary expression of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene. [Review] [82 refs]. *J. Mol. Endocrinol.* **15**: 221-231.
- Ayoubi, T.A. and D. Van, V. 1996. Regulation of gene expression by alternative promoters. [Review] [41 refs]. *FASEB J.* **10**: 453-460.
- Bach, I., C. Carriere, H.P. Ostendorff, B. Andersen, and M.G. Rosenfeld. 1997. A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* **11**: 1370-1380.
- Bach, I., S.J. Rhodes, R.V.2. Pearse, T. Heinzel, B. Gloss, K.M. Scully, P.E. Sawchenko, and M.G. Rosenfeld. 1995. P-lim, a lim homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2720-2724.
- Baeuerle, P.A. and D. Baltimore. 1988. I $\kappa$ B: a specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Science* **242**: 540-546.

- Baker, B.L., F.J. Karsch, D.L. Hoffman, and W.C.J. Beckman. 1977. The presence of gonadotropic and thyrotropic cells in the pituitary pars tuberalis of the monkey (*Macaca mulatta*). *Biol. Repro.* **17**: 232-240.
- Baker, B.L. and Y.Y. Yu. 1975. Immunocytochemical analysis of cells in the pars tuberalis of the rat hypophysis with antisera to hormones of the pars distalis. *Cell Tissue Res.* **156**: 443-449.
- Baldwin, C.T., C.F. Hoth, J.A. Amos, E.O. da-Silva, and A. Milunsky. 1992. An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome [see comments]. *Nature* **355**: 637-638.
- Balling, R., G. Mutter, P. Gruss, and M. Kessel. 1989. Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression of the homeobox gene Hox-1.1 in transgenic mice. *Cell* **58**: 337-347.
- Baniahmad, A., A.C. Köhne, and R. Renkawitz. 1992. A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *EMBO J.* **11**: 1015-1023.
- Bannister, A.J. and T. Kouzarides. 1995. CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO J.* **14**: 4758-4762.
- Bannister, A.J. and T. Kouzarides. 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**: 641-643.
- Barberis, A., J. Pearlberg, N. Simkovich, S. Farrell, P. Reinagel, C. Bamdad, G. Sigal, and M. Ptashne. 1995. Contact with a component of the polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. *Cell* **81**: 359-368.
- Barnhart, K.M. and P.L. Mellon. 1994. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol. Endocrinol.* **8**: 878-885.

- Beelman, C.A. and R. Parker. 1995. Degradation of mRNA in eukaryotes. [Review] [50 refs]. *Cell* **81**: 179-183.
- Behringer, R.R., L.S. Mathews, R.D. Palmiter, and R.L. Brinster. 1988. Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Genes Dev.* **2**: 453-461.
- Ben-Menahem, D. and Z. Naor. 1994. Regulation of gonadotropin mRNA levels in cultured rat pituitary cells by gonadotropin-releasing hormone (GnRH): role for Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C. *Biochemistry* **33**: 3698-3704.
- Benezra, R., R.L. Davis, D. Lockshon, D.L. Turner, and H. Weintraub. 1990. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**: 49-59.
- Bengal, E., O. Flores, A. Krauskopf, D. Reinberg, and Y. Aloni. 1991. Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Biol. Cell* **11**: 1195-1206.
- Berberich, S.J. and M.D. Cole. 1992. Casein kinase II inhibits the DNA-binding activity of Max homodimers but not Myc/Max heterodimers. *Genes Dev.* **6**: 166-176.
- Berleth, T., M. Burri, G. Thoma, D. Bopp, S. Riehlstein, G. Frigerio, M. Noll, and C. Nusslein-Volhard. 1988. The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* **7**: 1749-1756.
- Berthelsen, J., V. Zappavigna, E. Ferretti, F. Mavilio, and F. Blasi. 1998a. The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO J.* **17**: 1434-1445.
- Berthelsen, J., V. Zappavigna, F. Mavilio, and F. Blasi. 1998b. Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *EMBO J.* **17**: 1423-1433.
- Bertuccioli, C., L. Fasano, S. Jun, S. Wang, G. Sheng, and C. Desplan. 1996. *In vivo* requirement for the paired domain and homeodomain of the paired segmentation gene product. *Development* **122**: 2673-2685.

- Bestor, T.H. and G.L. Verdine. 1994. DNA methyltransferases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 380-389.
- Biggin, M.D. and R. Tjian. 1989. A purified drosophila homeodomain protein represses transcription *in vitro*. *Cell* **58**: 433-440.
- Binetruy, B., T. Smeal, and M. Karin. 1991. Ha-ras augments c-jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* **351**: 122-127.
- Blanco, J.C.G., S. Minucci, J. Lu, X.J. Yang, K.K. Walker, H. Chen, R.M. Evans, Y. Nakatani, and K. Ozato. 1998. The histone acetylase PCAF is a nuclear coactivator. *Genes Dev.* **12**: 1638-1651.
- Blau, J., H. Xiao, S. McCracken, P. O'Hare, J. Greenblatt, and D. Bentley. 1996. Three functional classes of transcriptional activation domain. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2044-2055.
- Blochlinger, K., R. Bodmer, J. Jack, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1988. Primary structure and expression of a product from cut, a locus involved in specifying sensory organ identity in Drosophila. *Nature* **333** : 629-635.
- Blum, M., S.J. Gaunt, K.W. Cho, H. Steinbeisser, B. Blumberg, D. Bittner, and E.M. De Robertis. 1992. Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid. *Cell* **69**: 1097-1106.
- Bodner, M., J.L. Castrillo, L.E. Theill, T. Deerinck, M. Ellisman, and M. Karin. 1988. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* **55**: 505-518.
- Bohinski, R.J., R. Di Lauro, and J.A. Whitsett. 1994. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5671-5681.

- Bole-Feysot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binart, P.A. Kelly. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. [Review]. *Endocrine Rev.* **19**:225-268.
- Boncinelli, E., A. Simeone, D. Acampora, and F. Mavilio. 1991. HOX gene activation by retinoic acid. [Review]. *Trends Genet.* **7**: 329-334.
- Bopp, D., M. Burri, S. Baumgartner, G. Frigerio, and M. Noll. 1986. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* **47**: 1033-1040.
- Bopp, D., E. Jamet, S. Baumgartner, M. Burri, and M. Noll. 1989. Isolation of two tissue-specific *Drosophila* paired box genes, Pox meso and Pox neuro. *EMBO J.* **8**: 3447-3457.
- Borrelli, E., R.A. Heyman, C. Arias, P.E. Sawchenko, and R.M. Evans. 1989. Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature* **339**: 538-541.
- Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 1995. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha [see comments]. *Nature* **375**: 377-382.
- Boyes, J. and A. Bird. 1991. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* **64**: 1123-1134.
- Boyes, J. and A. Bird. 1992. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* **11**: 327-333.
- Boyle, W.J., T. Smeal, L.H.K. Kefize, P. Angel, J.R. Woodgett, M. Karin, and T. Hunter. 1991. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* **64**: 573-584.
- Brand-Saber, B., R. Seifert, M. Grim, J. Wilting, M. Kuhlewein, and B. Christ. 1995. Blood vessel formation in the avian limb bud involves angioblastic and angiogenic growth. *Dev. Dynamics* **202**: 181-194.
- Braun, T. and H.H. Arnold. 1995. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J.* **14**: 1176-1186.

- Braun, T., G. Buschhausen-Denker, E. Bober, E. Tannich, and H.H. Arnold. 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from myoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* **8** : 701-709.
- Braun, T., M.A. Rudnicki, H.H. Arnold, and R. Jaenisch. 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* **71**: 369-382.
- Brinkmeier, M.L., D.F. Gordon, J.M. Dowding, T.L. Saunders, S.K. Kendall, V.D. Sarapura, W.M. Wood, E.C. Ridgway, and S.A. Camper. 1998. Cell-specific expression of the mouse glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene requires multiple interacting DNA elements in transgenic mice and cultured cells. *Mol. Endocrinol.* **12**: 622-633.
- Brown, P., J.R. McNeilly, R.M. Wallace, A.S. McNeilly, and A.J. Clark. 1993. Characterization of the ovine LH beta-subunit gene: the promoter directs gonadotrope-specific expression in transgenic mice. *Molecular & Cellular Endocrinology* **93**: 157-165.
- Buratowski, S., S. Hahn, L. Guarente, and P.A. Sharp. 1989. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* **56**: 549-561.
- Bürglin, T.R. and G. Ruvkun. 1992. New motif in PBX genes [letter]. *Nature Genetics* **1**: 319-320.
- Burke, T.W. and J.T. Kadonaga. 1996. Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* **10**: 711-724.
- Burley, S.K. and R.G. Roeder. 1996. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 769-799.
- Bürglin, T.R. 1993. A comprehensive classification of homeobox genes. In: *A guidebook for homeobox genes*. edited by Duboule, D. Oxford University Press England.

- Caceres, J.F., S. Stamm, D.M. Helfman, and A.R. Krainer. 1994. Regulation of alternative splicing *in vivo* by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* **265**: 1706-1709.
- Cadigan, K.M. and R. Nusse. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. [Review] [184 refs]. *Genes Dev.* **11**: 3286-3305.
- Caldwell, B.V. and R.D. Kayne. 1987. Normal endocrine function of the pituitary. In: *The pituitary: clinical aspects of normal and abnormal function*. edited by Goodrich, I. and Lee, K.J. p. 29-33. Elsevier Science Publishers Amsterdam.
- Cao, X., R. Mahendran, G.R. Guy, and Y.H. Tan. 1993. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J. Biol. Chem.* **268**: 16949-16957.
- Carlsson, P., M.L. Waterman, and K.A. Jones. 1993. The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells. *Genes Dev.* **7**: 2418-2430.
- Castrillo, J.L., L.E. Theill, and M. Karin. 1991. Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* **253**: 197-199.
- Cavaillès, V., S. Dauvois, F. L'Horset, G. Lopez, S. Hoare, P.J. Kushner, and M.G. Parker. 1995. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* **14**: 3741-3751.
- Chakravarti, D., V.J. LaMorte, M.C. Nelson, T. Nakajima, I.G. Schulman, H. Juguilon, M. Montminy, and R.M. Evans. 1996. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**: 99-103.
- Chalepakis, G., R. Fritsch, H. Fickenscher, U. Deutsch, M. Goulding, and P. Gruss. 1991. The molecular basis of the undulated/Pax-1 mutation. *Cell* **66**: 873-884.
- Chambers, R.S. and M.E. Dahmus. 1994. Purification and characterization of a phosphatase from HeLa cells which dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **269**: 26243-26248.



- Chambers, R.S. and C.M. Kane. 1996. Purification and characterization of an RNA polymerase II phosphatase from yeast. *J. Biol. Chem.* **271**: 24498-24504.
- Chambers, R.S., B.Q. Wang, Z.F. Burton, and M.E. Dahmus. 1995. The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J. Biol. Chem.* **270**: 14962-14969.
- Chan, S.K., H. Popperl, R. Krumlauf, and R.S. Mann. 1996. An extradenticle-induced conformational change in a HOX protein overcomes an inhibitory function of the conserved hexapeptide motif. *EMBO J.* **15**: 2476-2487.
- Chan, S.K. and G. Struhl. 1997. Sequence-specific RNA binding by bicoid [letter]. *Nature* **388**: 634
- Chandler, S.D., A. Mayeda, J.M. Yeakley, A.R. Krainer, and X.D. Fu. 1997. RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3596-3601.
- Chang, C.P., Y. Jacobs, T. Nakamura, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, and M.L. Cleary. 1997. Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5679-5687.
- Chang, C.P., W.F. Shen, S. Rozenfeld, H.J. Lawrence, C. Largman, and M.L. Cleary. 1995. Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* **9**: 663-674.
- Chao, D.M., E.L. Gadbois, P.J. Murray, S.F. Anderson, M.S. Sonu, J.D. Parvin, and R.A. Young. 1996. A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* **380**: 82-85.
- Chatterjee, V.K.K., J.-K. Lee, A. Rentoumis, and J.L. Jameson. 1989. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone:

- receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9114-9118.
- Chavrier, P., C. Vesque, B. Galliot, M. Vigneron, P. Dolle, D. Duboule, and P. Chamay. 1990. The segment-specific gene Krox-20 encodes a transcription factor with binding sites in the promoter region of the Hox-1.4 gene. *EMBO J.* **9**: 1209-1218.
- Chen, H., R.J. Lin, R.L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M.L. Privalsky, Y. Nakatani, and R.M. Evans. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**: 569-580.
- Chen, J.D. and R.M. Evans. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**: 454-457.
- Chen, J.L., L.D. Attardi, C.P. Verrijzer, K. Yokomori, and R. Tjian. 1994. Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* **79**: 93-105.
- Chen, S., Q.L. Wang, Z. Nie, H. Sun, G. Lennon, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, and D.J. Zack. 1997. Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* **19**: 1017-1030.
- Chi, T., P. Lieberman, K. Ellwood, and M. Carey. 1995. A general mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators. *Nature* **377**: 254-257.
- Cho, E.J., T. Takagi, C.R. Moore, and S. Buratowski. 1997. mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain [see comments]. *Genes Dev.* **11**: 3319-3326.
- Chrivia, J.C., R.P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M.R. Montminy, and R.H. Goodman. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**: 855-859.

- Cianetti, L., A. Di Cristofaro, V. Zappavigna, L. Bottero, G. Boccoli, U. Testa, G. Russo, E. Boncinelli, and C. Peschle. 1990. Molecular mechanisms underlying the expression of the human HOX-5.1 gene. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4361-4368.
- Ciechanover, A. 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. [Review] [61 refs]. *Cell* **79**: 13-21.
- Cohen, S.M. and G. Jurgens. 1990. Mediation of Drosophila head development by gap-like segmentation genes [see comments]. *Nature* **346**: 482-485.
- Colwill, K., L.L. Feng, J.M. Yeakley, G.D. Gish, J.F. Caceres, T. Pawson, and X.D. Fu. 1996. SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J. Biol. Chem.* **271**: 24569-24575.
- Conlon, R.A. and J. Rossant. 1992. Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development* **116**: 357-368.
- Conn, P.M. and W.F.J. Crowley. 1991. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues [see comments]. [Review] [180 refs]. *N. Engl. J. Med.* **324**: 93-103.
- Corden, J.L. 1990. Tails of RNA polymerase II. [Review] [30 refs]. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 383-387.
- Corden, J.L. and M. Patturajan. 1997. A CTD function linking transcription to splicing. [Review] [41 refs]. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 413-416.
- Cortes, P., O. Flores, and D. Reinberg. 1992. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor IIJ. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 413-421.
- Cote, J., J. Quinn, J.L. Workman, and C.L. Peterson. 1994. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**: 53-60.

- Couly, G.F. and N.M. Le Douarin. 1985. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev. Biol.* **110**: 422-439.
- Couly, G.F. and N.M. Le Douarin. 1987. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev. Biol.* **120**: 198-214.
- Crawford, M.J., C. Lanctôt, J.J. Tremblay, N. Jenkins, D. Gilbert, N. Copeland, B. Beatty, and J. Drouin. 1997. Human and murine *PTX1/Ptx1* gene maps to the region for Treacher Collins syndrome. *Mam. Gen.* **8**: 841-845.
- Crawford, P.A., C. Dom, Y. Sadovsky, and J. Milbrandt. 1998. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2949-2956.
- Crawford, P.A., J.A. Polish, G. Ganpule, and Y. Sadovsky. 1997. The activation function-2 hexamer of steroidogenic factor-1 is required, but not sufficient for potentiation by SRC-1. *Mol. Endocrinol.* **11**: 1626-1635.
- Crenshaw, E.B., K. Kalla, D.M. Simmons, L.W. Swanson, and M.G. Rosenfeld. 1989. Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements. *Genes Dev.* **3**: 959-972.
- Crosby, S.D., J.J. Puetz, K.S. Simburger, T.J. Fahrner, and J. Milbrandt. 1991. The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol. Biol. Cell* **11**: 3835-3841.

- Cui, Y., K.W. Hagan, S. Zhang, and S.W. Peltz. 1995. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* **9**: 423-436.
- Czaplinski, K., Y. Weng, K.W. Hagan, and S.W. Peltz. 1995. Purification and characterization of the UPF1 protein: a factor involved in translation and mRNA degradation. *RNA* **1**: 610-623.
- Czerny, T., G. Schaffner, and M. Busslinger. 1993. DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev.* **7**: 2048-2061.
- Dahmus, M.E. 1994. The role of multisite phosphorylation in the regulation of RNA polymerase II activity. [Review] [101 refs]. *Prog. Nucleic Acid. Res. & Mol. Biol.* **48**: 143-179.
- Dahmus, M.E. 1996. Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. [Review] [56 refs]. *J. Biol. Chem.* **271**: 19009-19012.
- Dai, P., H. Akimaru, Y. Tanaka, D.X. Hou, T. Yasukawa, C. Kanei-Ishii, T. Takahashi, and S. Ishii. 1996. CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb. *Genes Dev.* **10**: 528-540.
- Daikoku, S., M. Chikamori, T. Adachi, and Y. Maki. 1982. Effect of the basal diencephalon on the development of Rathke's pouch in rats: a study in combined organ cultures. *Dev. Biol.* **90**: 198-202.
- Dalton, D., R. Chadwick, and W. McGinnis. 1989. Expression and embryonic function of empty spiracles: a *Drosophila* homeo box gene with two patterning functions on the anterior-posterior axis of the embryo. *Genes Dev.* **3**: 1940-1956.

- Damante, G., L. Pellizzari, G. Esposito, F. Fogolari, P. Viglino, D. Fabbro, G. Tell, S. Formisano, and R. Dilauro. 1996. A molecular code dictates sequence-specific DNA recognition by homeodomains. *EMBO J.* **15**: 4992-5000.
- Dantoni, J.C., K.G. Murthy, J.L. Manley, and L. Tora. 1997. Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* **389**: 399-402.
- Dattani, M.T., J.P. Martinez-Barbera, P.Q. Thomas, J.M. Brickman, R. Gupta, I.L. Mårtensson, H. Toresson, M. Fox, J.K.H. Wales, P.C. Hindmarsh, S. Krauss, R.S.P. Beddington, and I.C.A.F. Robinson. 1998. Mutations in the homeobox gene *HESX1/Hesx1* associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nature Genetics* **19**: 125-133.
- Davidson, D. 1995. The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. [Review]. *Trends Genet.* **11**: 405-411.
- Day, R.N. and K.H. Day. 1994. An alternatively spliced form of Pit-1 represses prolactin gene expression. *Mol. Endocrinol.* **8**: 374-381.
- Day, R.N., S. Koike, M. Sakai, M. Muramatsu, and R.A. Maurer. 1990. Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* **4**: 1964-1971.
- Defelice, M., G. Damante, M. Zannini, H. Francislang, and R. Dilauro. 1995. Redundant domains contribute to the transcriptional activity of the thyroid transcription factor 1. *J. Biol. Chem.* **270**: 26649-26656.
- Desplan, C., J. Theis, and P. O'Farrell. 1988. The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* **54**: 1081-1090.
- Desplan, C., J. Theis, and P.H. O'Farrell. 1985. The *Drosophila* developmental gene, *engrailed*, encodes a sequence-specific DNA binding activity. *Nature* **318**: 630-635.
- Devault, A., A.M. Martinez, D. Fesquet, J.C. Labbe, N. Morin, J.P. Tassan, E.A. Nigg, J.C. Cavadore, and M. Doree. 1995. MAT1 ('menage a trois') a new RING finger

- protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. *EMBO J.* **14**: 5027-5036.
- Dikstein, R., S. Ruppert, and R. Tjian. 1996. TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell* **84**: 781-790.
- Drapkin, R., G. Le Roy, H. Cho, S. Akoulitchev, and D. Reinberg. 1996. Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6488-6493.
- Drapkin, R. and D. Reinberg. 1994. The multifunctional TFIID complex and transcriptional control. [Review] [54 refs]. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 504-508.
- Driever, W., J. Ma, C. Nusslein-Volhard, and M. Ptashne. 1989b. Rescue of bicoid mutant *Drosophila* embryos by bicoid fusion proteins containing heterologous activating sequences. *Nature* **342**: 149-154.
- Driever, W. and C. Nusslein-Volhard. 1988. The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* **54**: 95-104.
- Driever, W. and C. Nusslein-Volhard. 1989a. The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **337**: 138-143.
- Dubnau, J. and G. Struhl. 1996. RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature* **379**: 694-699.
- Duboule, D. 1991. Patterning in the vertebrate limb. [Review]. *Curr. Genetics Dev.* **1**: 211-216.
- Duboule, D. 1994. Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Development Suppl.* 135-142.
- Duboule, D. and P. Dolle. 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* **8**: 1497-1505.

- Durocher, D., F. Charron, R. Warren, R.J. Schwartz, and M. Nemer. 1997. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* **16**: 5687-5696.
- Durocher, D., C.Y. Chen, A. Arditi, R.J. Schwartz, and M. Nemer. 1996. The ANF promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Mol. Biol. Cell* **16**: 4648-4655.
- Dynlacht, B.D., T. Hoey, and R. Tjian. 1991. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* **66**: 563-576.
- Eberle, A.N. *The melanotropins: chemistry, physiology, and mechanisms of action*, Basel:Karger,S., 1988.
- Eipper, B. and R. Mains. 1980. Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr. Rev.* **1**: 1-27.
- Ekker, S.C., D.G. Jackson, D.P. von Kessler, B.I. Sun, K.E. Young, and P.A. Beachy. 1994. The degree of variation in DNA sequence recognition among four Drosophila homeotic proteins. *EMBO J.* **13**: 3551-3560.
- Epstein, D.J., M. Vekemans, and P. Gros. 1991. Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* **67**: 767-774.
- Epstein, D.J., K.J. Vogan, D.G. Trasler, and P. Gros. 1993. A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 532-536.



- Epstein, J.A., T. Glaser, J. Cai, L. Jepeal, D.S. Walton, and R.L. Maas. 1994. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev.* **8**: 2022-2034.
- Ericson, J., S. Norlin, T.M. Jessell, and T. Edlund. 1998. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* **125**: 1005-1015.
- Evans, S.M., W. Yan, M.P. Murillo, J. Ponce, and N. Papalopulu. 1995. Tinman, a drosophila homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of genes in vertebrates - *xnkx-2.3*, a second vertebrate homologue of tinman. *Development* **121**: 3889-3899.
- Fallest, P.C., G.L. Trader, J.M. Darrow, and M.A. Shupnik. 1995. Regulation of rat luteinizing hormone beta gene expression in transgenic mice by steroids and a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Biol. Repro.* **53**: 103-109.
- Fang, S.M. and Z.F. Burton. 1996. RNA polymerase II-associated protein (RAP) 74 binds transcription factor (TF) IIB and blocks TFIIB-RAP30 binding. *J. Biol. Chem.* **271**: 11703-11709.
- Farrell, S., N. Simkovich, Y. Wu, A. Barberis, and M. Ptashne. 1996. Gene activation by recruitment of the RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev.* **10**: 2359-2367.
- Feaver, W.J., J.Q. Svejstrup, L. Bardwell, A.J. Bardwell, S. Buratowski, K.D. Gulyas, T.F. Donahue, E.C. Friedberg, and R.D. Komberg. 1993. Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell* **75**: 1379-1387.
- Feaver, W.J., J.Q. Svejstrup, N.L. Henry, and R.D. Komberg. 1994. Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK. *Cell* **79**: 1103-1109.

- Finkelstein, R. and E. Boncinelli. 1994. From fly head to mammalian forebrain: the story of *otd* and *Otx*. *Trends Genet.* **10**: 310-315.
- Finkelstein, R., D. Smouse, T.M. Capaci, A.C. Spradling, and N. Perrimon. 1990. The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* **4**: 1516-1527.
- Finney, M., G. Ruvkun, and H.R. Horvitz. 1988. The *C. elegans* cell lineage and differentiation gene *unc-86* encodes a protein with a homeodomain and extended similarity to transcription factors. *Cell* **55**: 757-769.
- Flegel, W.A., A.W. Singson, J.S. Margolis, A.G. Bang, J.W. Posakony, and C. Murre. 1993. *Dpbx*, a new homeobox gene closely related to the human proto-oncogene *pbx1* molecular structure and developmental expression. *Mech. Dev.* **41**: 155-161.
- Flores, O., I. Ha, and D. Reinberg. 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Purification and subunit composition of transcription factor IIF. *J. Biol. Chem.* **265**: 5629-5634.
- Flores, O., H. Lu, M. Killeen, J. Greenblatt, Z.F. Burton, and D. Reinberg. 1991. The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9999-10003.
- Folberg, A., E.N. Kovacs, and M.S. Featherstone. 1997. Characterization and retinoic acid responsiveness of the murine *Hoxd4* transcription unit. *J. Biol. Chem.* **272**: 29151-29157.
- Fondell, J.D., F. Brunel, K. Hisatake, and R.G. Roeder. 1996. Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 281-287.

- Fondell, J.D., H. Ge, and R.G. Roeder. 1996. Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8329-8333.
- Fondell, J.D., A.L. Roy, and R.G. Roeder. 1993. Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev.* **7**: 1400-1410.
- Forman, B.M., K. Umesono, J. Chen, and R.M. Evans. 1995. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **81**: 541-550.
- Forman, B.M., C. Yang, M. Au, J. Casanova, J. Ghysdael, and H.H. Samules. 1989. A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel in vivo interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol. Endocrinol.* **335**: 1610-1626.
- Fox, S.R., M.T. Jong, J. Casanova, Z.S. Ye, F. Stanley, and H.H. Samuels. 1990. The homeodomain protein, Pit-1/GHF-1, is capable of binding to and activating cell-specific elements of both the growth hormone and prolactin gene promoters. *Mol. Endocrinol.* **4**: 1069-1080.
- Freund, C.L., C.Y. Gregory-Evans, T. Furukawa, M. Papaioannou, J. Looser, L. Ploder, J. Bellingham, D. Ng, J.A. Herbrick, A. Duncan, S.W. Scherer, L.C. Tsui, A. Loutradis-Anagnostou, S.G. Jacobson, C.L. Cepko, S.S. Bhattacharya, and R.R. McInnes. 1997. Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* **91**: 543-553.
- Frohnhofer, H.G., R. Lehmann, and C. Nusslein-Volhard. 1986. Manipulating the anteroposterior pattern of the Drosophila embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **97 (Suppl)**: 169-179.

- Fu, X.D. 1995. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. [Review] [160 refs]. *RNA* **1**: 663-680.
- Furukawa, T., E.M. Morrow, and C.L. Cepko. 1997. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* **91**: 531-541.
- Gage, P.J., M.L. Brinkmeier, L.M. Scarlett, L.T. Knapp, S.A. Camper, and K.A. Mahon. 1996a. The ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of *rpx* transcription and initiation of lineage-specific cell proliferation. *Mol. Endocrinol.* **10**: 1570-1581.
- Gage, P.J. and S.A. Camper. 1997. Pituitary homeobox 2, a novel member of the *bicoid*-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 457-464.
- Gage, P.J., M.L. Roller, T.L. Saunders, L.M. Scarlett, and S.A. Camper. 1996b. Anterior pituitary cells defective in the cell-autonomous factor, *df*, undergo cell lineage specification but not expansion. *Development* **122**: 151-160.
- Gashler, A. and V.P. Sukhatme. 1995. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic Acid. Res. & Mol. Biol.* **50**: 191-224.
- Gaudreau, L., M. Adam, and M. Ptashne. 1998. Activation of transcription *in vitro* by recruitment of the yeast RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell* **1**: 913-916.
- Gaunt, S.J. 1988. Mouse homeobox gene transcripts occupy different but overlapping domains in embryonic germ layers and organs: a comparison of Hox-3.1 and Hox-1.5. *Development* **103**: 135-144.
- Gehring, W.J. 1993. A History of the Homeobox. In: *A guidebook for homeobox genes*. edited by Duboule, D. p. 3-10. Oxford University Press England.

- Gehring, W.J., Y.Q. Qian, M. Billeter, K. Furukubo-Tokunaga, A.F. Schier, D. Resendez-Perez, M. Affolter, G. Otting, and K. Wüthrich. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78**: 211-223.
- Gerber, H.P., K. Seipel, O. Georgiev, M. Hofferer, M. Hug, S. Rusconi, and W. Schaffner. 1994. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**: 808-811.
- Ghosh, S. and D. Baltimore. 1990. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* **344**: 678-682.
- Giese, K., J. Cox, and R. Grosschedl. 1992. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* **69**: 185-195.
- Giese, K. and R. Grosschedl. 1993. LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. *EMBO J.* **12**: 4667-4676.
- Gill, G., E. Pascal, Z.H. Tseng, and R. Tjian. 1994. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 192-196.
- Giulli, G., W.H. Shen, and H.A. Ingraham. 1997. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development* **124**: 1799-1807.
- Glaser, T., D.S. Walton, and R.L. Maas. 1992. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human pax6 gene. *Nature Genetics* **2**: 232-239.
- Glass, C.K. 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. [Review] [165 refs]. *Endocr. Rev.* **15**: 391-407.

- Glass, C.K., R. Franco, C. Weinberger, V.R. Albert, R.M. Evans, and M.G. Rosenfeld. 1987. A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature* **329**: 738-741.
- Goluboff, L.G. and C. Ezrin. 1969. Effect of pregnancy on the somatotroph and the prolactin cell of the human adenohypophysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **29**: 1533-1538.
- Gonzalez-reyes, A., N. Urquia, W.J. Gehring, G. Struhl, and G. Morata. 1990. Are cross-regulatory interactions between homoeotic genes functionally significant? *Nature* **344**: 78-80.
- Goodrich, J.A. and R. Tjian. 1994. Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* **77**: 145-156.
- Gordon, D.F., B.R. Haugen, V.D. Sarapura, A.R. Nelson, W.M. Wood, and E.C. Ridgway. 1993. Analysis of Pit-1 in regulating mouse TSH beta promoter activity in thyrotropes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **96**: 75-84.
- Gordon, D.F., S.R. Lewis, B.R. Haugen, R.A. James, M.T. Mcdermott, W.M. Wood, and E.C. Ridgway. 1997. Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin  $\beta$ -subunit promoter. *J. Biol. Chem.* **272**: 24339-24347.
- Gothard, L.Q., J.C. Hibbard, and M.A. Seyfred. 1996. Estrogen-mediated induction of rat prolactin gene transcription requires the formation of a chromatin loop between the distal enhancer and proximal promoter regions. *Mol. Endocrinol.* **10**: 185-195.
- Gould, A., A. Morrison, G. Sproat, R.A. White, and R. Krumlauf. 1997. Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes Dev.* **11**: 900-913.
- Goulding, M., S. Sterrer, J. Fleming, R. Balling, J. Nadeau, K.J. Moore, S.D. Brown, K.P. Steel, and P. Gruss. 1993. Analysis of the Pax-3 gene in the mouse mutant splotch. *Genomics* **17**: 355-363.

- Graba, Y., D. Aragnol, and J. Pradel. 1997. Drosophila Hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. [Review] [72 refs]. *Bioessays* **19**: 379-388.
- Graham, A., N. Papalopulu, and R. Krumlauf. 1989. The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* **57**: 367-378.
- Graveley, B.R. and T. Maniatis. 1998. Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* **1**: 765-771.
- Grondin, B., M. Bazinet, and M. Aubry. 1996. The KRAB zinc finger gene ZNF74 encodes an RNA-binding protein tightly associated with the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **271**: 15458-15467.
- Grondin, B., F. Cote, M. Bazinet, M. Vincent, and M. Aubry. 1997. Direct interaction of the KRAB/Cys2-His2 zinc finger protein ZNF74 with a hyperphosphorylated form of the RNA polymerase II largest subunit. *J. Biol. Chem.* **272**: 27877-27885.
- Gross, D.S. 1983. Hormone production in the hypophysial pars tuberalis of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* **112**: 733-744.
- Gruber, K.A. and M.F. Callahan. 1989. ACTH-(4-10) through gamma-MSH: evidence for a new class of central autonomic nervous system-regulating peptides. [Review]. *Am. J. Physiol.* **257**: R681-R694
- Gruenbaum, Y., R. Stein, H. Cedar, and A. Razin. 1981. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett.* **124**: 67-71.
- Grunstein, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. [Review] [75 refs]. *Nature* **389**: 349-352.
- Gruss, P. and C. Walther. 1992. Pax in development. *Cell* **69**: 719-722.
- Gu, W., X.L. Shi, and R.G. Roeder. 1997. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**: 819-823.

- Guazzi, S., M. Price, M. De Felice, G. Damante, M.G. Mattei, and R. Di Lauro. 1990. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J.* **9**: 3631-3639.
- Gunnery, S. and M.B. Mathews. 1995. Functional mRNA can be generated by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3597-3607.
- Guo, B., P.R. Odgren, A.J. van Wijnen, T.J. Last, J. Nickerson, S. Penman, J.B. Lian, J.L. Stein, G.S. Stein, P.J. Farnham, and A.L. Means. 1990. The nuclear matrix protein NMP-1 is the transcription factor YY1. Sequences downstream of the transcription initiation site modulate the activity of the murine dihydrofolate reductase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **10**: 1390-1398.
- Guz, Y., M.R. Montminy, R. Stein, J. Leonard, L.W. Gamer, C.V. Wright, and G. Teitelman. 1995. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* **121**: 11-18.
- Ha, I., S. Roberts, E. Maldonado, X. Sun, L.U. Kim, M. Green, and D. Reinberg. 1993. Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev.* **7**: 1021-1032.
- Haghighat, A. and N. Sonenberg. 1997. eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure [published erratum appears in J Biol Chem 1997 Nov 14;272(46):29398]. *J. Biol. Chem.* **272**: 21677-21680.
- Halachmi, S., E. Marden, G. Martin, H. MacKay, C. Abbondanza, and M. Brown. 1994. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* **264**: 1455-1458.
- Halder, G., P. Callaerts, and W.J. Gehring. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267**: 1788-1792.



- Halle, J.P. and M. Meisterernst. 1996. Gene expression: increasing evidence for a transcriptosome. [Review] [22 refs]. *Trends Genet.* **12**: 161-163.
- Halvorson, L.M., U.B. Kaiser, and W.W. Chin. 1996. Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1. *J. Biol. Chem.* **271**: 6645-6650.
- Hamernik, D.L., R.A. Keri, C.M. Clay, J.N. Clay, G.B. Sherman, H.R.J. Sawyer, T.M. Nett, and J.H. Nilson. 1992. Gonadotrope- and thyrotrope-specific expression of the human and bovine glycoprotein hormone alpha-subunit genes is regulated by distinct cis-acting elements. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1745-1755.
- Han, K., M.S. Levine, and J.L. Manley. 1989. Synergistic activation and repression of transcription by Drosophila homeobox proteins. *Cell* **56**: 573-583.
- Hanes, S.D. and R. Brent. 1989. DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. *Cell* **57**: 1275-1283.
- Hanes, S.D. and R. Brent. 1991. A genetic model for interaction of the homeodomain recognition helix with DNA. *Science* **251**: 426-430.
- Hanes, S.D., G. Riddihough, D. Ish-Horowicz, and R. Brent. 1994. Specific DNA recognition and intersite spacing are critical for action of the bicoid morphogen. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3364-3375.
- Hanson, I.M., J.M. Fletcher, T. Jordan, A. Brown, D. Taylor, R.J. Adams, H.H. Punnett, and H. van, V. 1994. Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly. *Nature Genetics* **6**: 168-173.
- Harding, H.P. and M.A. Lazar. 1993. The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3113-3121.

- Hashimoto, S., G. Fumagalli, A. Zanini, and J. Meldolesi. 1987. Sorting of three secretory proteins to distinct secretory granules in acidophilic cells of cow anterior pituitary. *J. Cell Biol.* **105**: 1579-1586.
- Haugen, B.R., D.F. Gordon, A.R. Nelson, W.M. Wood, and E.C. Ridgway. 1994. The combination of Pit-1 and Pit-1T have a synergistic stimulatory effect on the thyrotropin beta-subunit promoter but not the growth hormone or prolactin promoters. *Mol. Endocrinol.* **8**: 1574-1582.
- Haugen, B.R., W.M. Wood, D.F. Gordon, and E.C. Ridgway. 1993. A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin beta promoter. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 20818-20824.
- Hayes, J.J., T.D. Tullius, and A.P. Wolffe. 1990. The structure of DNA in a nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7405-7409.
- Hebbes, T.R., A.W. Thorne, and C. Crane-Robinson. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**: 1395-1402.
- Heckert, L.L., K. Schultz, and J.H. Nilson. 1996. The cAMP response elements of the alpha subunit gene bind similar proteins in trophoblasts and gonadotropes but have distinct functional sequence requirements. *J. Biol. Chem.* **271**: 31650-31656.
- Heckert, L.L., E.M. Wilson, and J.H. Nilson. 1997. Transcriptional repression of the alpha-subunit gene by androgen receptor occurs independently of DNA binding but requires the DNA-binding and ligand-binding domains of the receptor. *Mol. Endocrinol.* **11**: 1497-1506.
- Heinzel, T., R.M. Lavinsky, T.M. Mullen, M. Soderstrom, C.D. Laherty, J. Torchia, W.M. Yang, G. Brard, S.D. Ngo, J.R. Davie, E. Seto, R.N. Eisenman, D.W. Rose, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 1997. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression [see comments]. *Nature* **387**: 43-48.

- Helms, J.A., C.H. Kim, D. Hu, R. Minkoff, C. Thaller, and G. Eichele. 1997. Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev. Biol.* **187**: 25-35.
- Hengartner, C.J., C.M. Thompson, J. Zhang, D.M. Chao, S.M. Liao, A.J. Koleske, S. Okamura, and R.A. Young. 1995. Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev.* **9**: 897-910.
- Hermesz, E., S. Mackem, and K.A. Mahon. 1996. Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* **122**: 41-52.
- Hernandez, N. 1993. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.* **7**: 1291-1308.
- Herr, W., R.A. Sturm, R.G. Clerc, L.M. Corcoran, D. Baltimore, P.A. Sharp, H.A. Ingraham, M.G. Rosenfeld, M. Finney, G. Ruvkun, and H.R. Horvitz. 1988. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev.* **2**: 1513-1516.
- Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**: 2135-2148.
- Hill, R.E., J. Favor, B.L. Hogan, C.C. Ton, G.F. Saunders, I.M. Hanson, J. Prosser, T. Jordan, N.D. Hastie, and H. van, V. 1991. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene [published erratum appears in Nature 1992 Feb 20;355(6362):750]. *Nature* **354**: 522-525.
- Hoeffler, J.P., F.R. Boockfor, and L.S. Frawley. 1985. Ontogeny of prolactin cells in neonatal rats: initial prolactin secretors also release growth hormone. *Endocrinology* **117**: 187-195.

- Hoey, T. and M. Levine. 1988. Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* **332** : 858-861.
- Hoey, T., R.O. Weinzierl, G. Gill, J.L. Chen, B.D. Dynlacht, and R. Tjian. 1993. Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* **72**: 247-260.
- Hogan, B.L.M. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* **10**: 1580-1594.
- Holdstock, J.G., S.J. Aylwin, and J.M. Burrin. 1996. Calcium and glycoprotein hormone alpha-subunit gene expression and secretion in alpha T3-1 gonadotropes. *Mol. Endocrinol.* **10**: 1308-1317.
- Holstege, F.C., P.C. van der Vliet , and H.T. Timmers. 1996. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J.* **15**: 1666-1677.
- Hong, H., K. Kohli, A. Trivedi, D.L. Johnson, and M.R. Stallcup. 1996. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4948-4952.
- Hong, L., G.P. Schroth, H.R. Matthews, P. Yau, and E.M. Bradbury. 1993. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J. Biol. Chem.* **268**: 305-314.
- Horan, G.S., E.N. Kovacs, R.R. Behringer, and M.S. Featherstone. 1995. Mutations in paralogous Hox genes result in overlapping homeotic transformations of the axial skeleton: evidence for unique and redundant function. *Dev. Biol.* **169**: 359-372.
- Horan, G.S., R. Ramirez-Solis, M.S. Featherstone, D.J. Wolgemuth, A. Bradley, and R.R. Behringer. 1995. Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and

- hoxd-4 genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev.* **9**: 1667-1677.
- Horlein, A.J., A.M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C.K. Glass, and et al. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**: 397-404.
- Horwitz, K.B., T.A. Jackson, D.L. Bain, J.K. Richer, G.S. Takimoto, and L. Tung. 1996. Nuclear receptor coactivators and corepressors. [Review] [87 refs]. *Mol. Endocrinol.* **10**: 1167-1177.
- Hsieh, C.L. 1994. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5487-5494.
- Huang, R.P. and E.D. Adamson. 1994. The phosphorylated forms of the transcription factor, Egr-1, bind to DNA more efficiently than non-phosphorylated. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 1271-1276.
- Hunt, P. and R. Krumlauf. 1991. Deciphering the Hox code: clues to patterning branchial regions of the head. [Review] [26 refs]. *Cell* **66**: 1075-1078.
- Hunt, P. and R. Krumlauf. 1992. Hox codes and positional specification in vertebrate embryonic axes. [Review]. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 227-256.
- Ido, A., Y. Miura, and T. Tamaoki. 1994. Activation of ATBF1, a multiple-homeodomain zinc-finger gene, during neuronal differentiation of murine embryonal carcinoma cells. *Dev. Biol.* **163**: 184-187.
- Ikeda, H. and T. Yoshimoto. 1991. Developmental changes in proliferative activity of cells of the murine Rathke's pouch. *Cell Tissue Res.* **263**: 41-47.
- Ikeda, Y., D.S. Lala, X. Luo, E. Kim, M.P. Moisan, and K.L. Parker. 1993. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.* **7**: 852-860.

- Ikeda, Y., X. Luo, R. Abbud, J.H. Nilson, and K.L. Parker. 1995. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* **9**: 478-486.
- Imbalzano, A.N., K.S. Zaret, and R.E. Kingston. 1994. Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J. Biol. Chem.* **269**: 8280-8286.
- Ingraham, H.A., R. Chen, H.J. Mangalam, H.P. Elsholtz, S.E. Flynn, C.R. Lin, D.M. Simmons, L. Swanson, and M.G. Rosenfeld. 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* **55**: 519-529.
- Ingraham, H.A., S.E. Flynn, J.W. Voss, R.V. Albert, M.S. Kapiloff, L. Wilson, and M.G. Rosenfeld. 1990. The Pou-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interactions. *Cell* **61**: 1021-1033.
- Ingraham, H.A., D.S. Lala, Y. Ikeda, X. Luo, W.H. Shen, M.W. Nachtigal, R. Abbud, J.H. Nilson, and K.L. Parker. 1994. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* **8**: 2302-2312.
- Inostroza, J.A., F.H. Mermelstein, I. Ha, W.S. Lane, and D. Reinberg. 1992. Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell* **70**: 477-489.
- Ito, M., R.N. Yu, and J.L. Jameson. 1998. Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol. Endocrinol.* **12**: 290-301.
- Ito, T., J.K. Tyler, and J.T. Kadonaga. 1997. Chromatin assembly factors: a dual function in nucleosome formation and mobilization?. [Review] [70 refs]. *Genes Cells* **2**: 593-600.

- Jabs, E.W., U. Muller, X. Li, L. Ma, W. Luo, I.S. Haworth, I. Klisak, R. Sparkes, M.L. Warman, J.B. Mulliken, and et al. 1993. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* **75**: 443-450.
- Jackson, S.M., A. Gutierrez-Hartmann, and J.P. Hoeffler. 1995. Upstream stimulatory factor, a basic-helix-loop-helix-zipper protein, regulates the activity of the alpha-glycoprotein hormone subunit gene in pituitary cells. *Mol. Endocrinol.* **9**: 278-291.
- Jacobson, A. and S.W. Peltz. 1996. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 693-739.
- Jacobson, L. and J. Drouin. 1994. Regulation of proopiomelanocortin gene transcription. In: *The pituitary gland*. edited by Imura, H. p. 117-138. Raven Press, Ltd. New York.
- Jameson, J.L., L.D. Madison, S. Datta, B. Krishna, K. Chatterjee, and T. Nagaya. 1992. Transcriptional repression of the thyroid stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone. *J. Cell. Biochem.* **16C**: 12
- Janknecht, R., R.A. Hipskind, T. Houthaeve, A. Nordheim, and H.G. Stunnenberg. 1992. Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties. *EMBO J.* **11**: 1045-1054.
- Japon, M.A., M. Rubinstein, and M.J. Low. 1994. In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J. Histochem. Cytochem.* **42**: 1117-1125.
- Javahery, R., A. Khachi, K. Lo, B. Zenzie-Gregory, and S.T. Smale. 1994. DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 116-127.
- Jaynes, J.B. and P.H. O'Farrell. 1988. Activation and repression of transcription by homeodomain- containing proteins that bind a common site. *Nature* **336**: 744-749.

- Jaynes, J.B. and P.H. O'Farrell. 1991. Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *EMBO J.* **10**: 1427-1433.
- Jeannotte, L., M.A. Trifiro, R.K. Plante, M. Chamberland, and J. Drouin. 1987. Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4058-4064.
- Jiang, G., L. Nepomuceno, K. Hopkins, and F.M. Sladek. 1995. Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5131-5143.
- Johnson, A.D. 1995. The price of repression. *Cell* **81**: 655-658.
- Johnson, F.B. and M.A. Krasnow. 1992. Differential regulation of transcription preinitiation complex assembly by activator and repressor homeo domain proteins. *Genes & Development* **6**: 2177-2189.
- Jones, P.A. 1985. Altering gene expression with 5-azacytidine. [Review] [21 refs]. *Cell* **40**: 485-486.
- Jones, P.L., G.J.C. Veenstra, P.A. Wade, D. Vermaak, S.U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A.P. Wolffe. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* **19**: 187-191.
- Jonsson, J., L. Carisson, T. Edlund, and H. Edlund. 1994. Insuling-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**: 606-609.
- Jordan, T., I. Hanson, D. Zaletayev, S. Hodgson, J. Prosser, A. Seawright, N. Hastie, and H. van, V. 1992. The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genetics* **1**: 328-332.
- Jun, S. and C. Desplan. 1996. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* **122**: 2639-2650.
- Jurata, L.W. and G.N. Gill. 1997. Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5688-5698.



- Jurata, L.W., S.L. Pfaff, and G.N. Gill. 1998. The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerization of LIM domain transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**: 3152-3157.
- Kaestner, K.H., H. Hiemisch, and G. Schutz. 1998. Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3 $\gamma$  results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 4245-4251.
- Kaiser, U.B., P.M. Conn, and W.W. Chin. 1997. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr. Rev.* **18**: 46-70.
- Kaiser, U.B., E. Sabbagh, B.D. Saunders, and W.W. Chin. 1998. Identification of *cis*-acting deoxyribonucleic acid element that mediate gonadotropin-releasing hormone stimulation of the rat luteinizing hormone  $\beta$ -subunit gene. *Endocrinology* **139**: 2443-2451.
- Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S.C. Lin, R.A. Heyman, D.W. Rose, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**: 403-414.
- Kamps, M.P., C. Murre, X.H. Sun, and D. Baltimore. 1990. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* **60**: 547-555.
- Kapiloff, M.S., Y. Farkash, M. Wegner, and M.G. Rosenfeld. 1991. Variable effects of phosphorylation of Pit-1 dictated by the DNA response elements. *Science* **253**: 786-789.
- Kass, S.U., J.P. Goddard, and R.L. Adams. 1993. Inactive chromatin spreads from a focus of methylation. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7372-7379.

- Kastner, P., A. Krust, B. Turcotte, U. Stropp, L. Tora, H. Gronemeyer, and P. Chambon. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* **9**: 1603-1614.
- Kaufmann, J. and S.T. Smale. 1994. Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev.* **8**: 821-829.
- Kay, T.W. and J.L. Jameson. 1992. Identification of a gonadotropin-releasing hormone-responsive region in the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1767-1773.
- Keaveney, M. and K. Struhl. 1998. Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase II machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol. Cell* **1**: 917-924.
- Kendall, S.K., D.F. Gordon, T.S. Birkmeier, D. Petrey, V.D. Sarapura, K.S. O'Shea, W.M. Wood, R.V. Lloyd, E.C. Ridgway, and S.A. Camper. 1994. Enhancer-mediated high level expression of mouse pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit transgene in thyrotropes, gonadotropes, and developing pituitary gland. *Mol. Endocrinol.* **8**: 1420-1433.
- Kendall, S.K., T.L. Saunders, L. Jin, R.V. Lloyd, L.M. Glode, T.M. Nett, R.A. Keri, J.H. Nilson, and S.A. Camper. 1991. Targeted ablation of pituitary gonadotropes in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **5**: 2025-2036.
- Kennison, J.A. 1995. The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 289-303.
- Keri, R.A., B. Andersen, G.C. Kennedy, D.L. Hamemik, C.M. Clay, A.D. Brace, T.M. Nett, A.C. Notides, and J.H. Nilson. 1991. Estradiol inhibits transcription of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene despite the absence of a high affinity binding site for estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* **5**: 725-733.

- Keri, R.A. and J.H. Nilson. 1996. A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone beta subunit promoter in gonadotropes of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **271**: 10782-10785.
- Keri, R.A., M.W. Wolfe, T.L. Saunders, I. Anderson, S.K. Kendall, T. Wagner, J. Yeung, J. Gorski, T.M. Nett, and S.A. Camper. 1994. The proximal promoter of the bovine luteinizing hormone beta-subunit gene confers gonadotrope-specific expression and regulation by gonadotropin-releasing hormone, testosterone, and 17 beta-estradiol in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **8**: 1807-1816.
- Keshet, I., J. Lieman-Hurwitz, and H. Cedar. 1986. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* **44**: 535-543.
- Khachigian, L.M., V. Lindner, A.J. Williams, and T. Collins. 1996. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* **271**: 1427-1431.
- Killeen, M., B. Coulombe, and J. Greenblatt. 1992. Recombinant TBP, transcription factor IIB, and RAP30 are sufficient for promoter recognition by mammalian RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **267**: 9463-9466.
- Kim, M.K., J.H. McClaskey, D.L. Bodenner, and B.D. Weintraub. 1993. An AP-1-like factor and the pituitary-specific factor Pit-1 are both necessary to mediate hormonal induction of human thyrotropin beta gene expression. *J. Biol. Chem.* **268**: 23366-23375.
- Kim, Y.J., S. Bjorklund, Y. Li, M.H. Sayre, and R.D. Kornberg. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* **77**: 599-608.

- Kimura, S., Y. Hara, T. Pineau, P. Fernandez-Salguero, C.H. Fox, J.M. Ward, and F.J. Gonzalez. 1996. The *T/ebp* null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* **10**: 60-69.
- Kingsley, D.M. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. [Review] [112 refs]. *Genes Dev.* **8**: 133-146.
- Kissinger, C.R., B.S. Liu, E. Martin-Blanco, T.B. Kornberg, and C.O. Pabo. 1990. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* **63**: 579-590.
- Klemm, J.D. and C.O. Pabo. 1996. Oct-1 POU domain-DNA interactions: cooperative binding of isolated subdomains and effects of covalent linkage. *Genes Dev.* **10**: 27-36.
- Kliwer, S.A., K. Umesono, D.J. Mangelsdorf, and R.M. Evans. 1992. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* **355**: 446-449.
- Kliwer, S.A., K. Umesono, D.J. Noonan, R.A. Heyman, and R.M. Evans. 1992. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**: 771-774.
- Knoepfler, P.S. and M.P. Kamps. 1995. The pentapeptide motif of Hox proteins is required for cooperative DNA binding with Pbx1, physically contacts Pbx1, and enhances DNA binding by Pbx1. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5811-5819.

- Koleske, A.J. and R.A. Young. 1994. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* **368**: 466-469.
- Koleske, A.J. and R.A. Young. 1995. The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 113-116.
- Kondo, T., J. Zákány, and D. Duboule. 1998. Control of colinearity in *AbdB* genes of the mouse *HoxD* complex. *Mol. Cell* **1**: 289-300.
- Konzak, K.E. and D.D. Moore. 1992. Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing. *Mol. Endocrinol.* **6**: 241-247.
- Kowenz-Leutz, E., G. Twamley, S. Ansieau, and A. Leutz. 1994. Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev.* **8**: 2781-2791.
- Kozak, M. 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**: 857-872.
- Kroon, E., J. Kros, U. Thorsteinsdottir, S. Baban, A.M. Buchberg, and G. Sauvageau. 1998. *Hoxa9* transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with *Meis1a* but not *Pbx1b*. *EMBO J.* **17**: 3714-3725.
- Krude, H., H. Biebermann, W. Luck, R. Horn, G. Brabant, and A. Grüters. 1998. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by *POMC* mutations in humans. *Nature Genetics* **19**: 155-157.
- Krumlauf, R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**: 191-201.
- Krumm, A., L.B. Hickey, and M. Groudine. 1995. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. *Genes Dev.* **9**: 559-572.
- Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet, and K. Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**: 1427-1429.

- Kulak, S.C., K. Kozlowski, E.V. Semina, W.G. Pearce, and M.A. Walter. 1998. Mutation in the *RIEG1* gene in patients with iridogoniodysgenesis syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 1113-1117.
- Kumar, T.R., V. Fairchild-Huntress, and M.J. Low. 1992. Gonadotrope-specific expression of the human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene in pituitaries of transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **6**: 81-90.
- Kurant, E., C.Y. Pai, R. Sharf, N. Halachmi, Y.H. Sun, and A. Salzberg. 1998. Dorsotonal/homothorax, the *Drosophila* homologue of *meis1*, interacts with extradenticle in patterning of the embryonic PNS. *Development* **125**: 1037-1048.
- Kurokawa, R., J. DiRenzo, M. Boehm, J. Sugarman, B. Gloss, M.G. Rosenfeld, R.A. Heyman, and C.K. Glass. 1994. Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* **371**: 528-531.
- Kurokawa, R., M. Soderstrom, A. Horlein, S. Halachmi, M. Brown, M.G. Rosenfeld, and C.K. Glass. 1995. Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor [see comments]. *Nature* **377**: 451-454.
- Kurokawa, R., V.C. Yu, A. Naar, S. Kyakumoto, Z. Han, S. Silverman, M.G. Rosenfeld, and C.K. Glass. 1993. Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev.* **7**: 1423-1435.
- Kwok, R.P.S., J.R. Lundblad, J.C. Chrivia, J.P. Richards, H.P. Bächinger, R.G. Brennan, S.G.E. Roberts, M.R. Green, and R.H. Goodman. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**: 223-226.
- Lai, Z.C., M.E. Fortini, and G.M. Rubin. 1991. The embryonic expression patterns of *zfh-1* and *zfh-2*, two *Drosophila* genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins. *Mech. Dev.* **34**: 123-134.

- Lala, D.S., R. Mukherjee, I.G. Schulman, S.S. Koch, L.J. Dardashti, A.M. Nadzan, G.E. Croston, R.M. Evans, and R.A. Heyman. 1996. Activation of specific RXR heterodimers by an antagonist of RXR homodimers. *Nature* **383**: 450-453.
- Lala, D.S., D.A. Rice, and K.L. Parker. 1992. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1249-1258.
- Lala, D.S., P.M. Syka, S.B. Lazarchik, D.J. Mangelsdorf, K.L. Parker, and R.A. Heyman. 1997. Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4895-4900.
- Lamonerie, T., J.J. Tremblay, C. Lanctôt, M. Therrien, Y. Gauthier, and J. Drouin. 1996. PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* **10**: 1284-1295.
- Lanctôt, C., Y. Gauthier, and J. Drouin. 1998. Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Submitted*
- Lanctôt, C., B. Lamolet, and J. Drouin. 1997. The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**: 2807-2817.
- Langston, A.W. and L.J. Gudas. 1992. Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mech. Dev.* **38**: 217-227.
- Langston, A.W. and L.J. Gudas. 1994. Retinoic acid and homeobox gene regulation. [review] [82 refs]. *Curr. Genetics Dev.* **4**: 550-555.
- Laoide, B.M., N.S. Foulkes, F. Schlotter, and P. Sassone-Corsi. 1993. The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J.* **12**: 1179-1191.
- Latchman, D.S. *Eukaryotic transcription factors*, San Diego USA:Harcourt Brace Jovanovich, 1994. Ed.1 pp. 1-270.

- Laybourn, P.J. and M.E. Dahmus. 1989. Transcription-dependent structural changes in the C-terminal domain of mammalian RNA polymerase subunit IIa/o. *J. Biol. Chem.* **264**: 6693-6698.
- Layman, L.C., D.P. Cohen, M. Jin, J. Xie, Z. Li, R.H. Reindollar, S. Bolbolan, D.P. Bick, R.R. Sherins, L.W. Duck, L.C. Musgrove, J.C. Sellers, and J.D. Neill. 1998. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nature Genetics* **18**: 14-15.
- Lazzaro, D., M. Price, M. De Felice, and R. Di Lauro. 1991. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* **113**: 1093-1104.
- Le Drian, Y., D. Liu, F. Xiong, and C.L. Hew. 1997. Presence of distinct cis-acting elements on gonadotropin gene promoters in diverse species dictates the selective recruitment of different transcription factors by steroidogenic factor-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **135**: 31-40.
- LeDouarin, B., C. Zechel, J.M. Garnier, Y. Lutz, L. Tora, P. Pierrat, D. Heery, H. Gronemeyer, P. Chambon, and R. Losson. 1995. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* **14**: 2020-2033.
- Lee, D.K., J. DeJong, S. Hashimoto, M. Horikoshi, and R.G. Roeder. 1992. TFIIA induces conformational changes in TFIID via interactions with the basic repeat. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5189-5196.
- Lee, D.Y., J.J. Hayes, D. Pruss, and A.P. Wolffe. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**: 73-84.
- Lee, J.S., R.H. See, T. Deng, and Y. Shi. 1996. Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4312-4326.



- Lee, J.W., F. Ryan, J.C. Swaffield, S.A. Johnston, and D.D. Moore. 1995. Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature* **374**: 91-94.
- Lee, S.L., Y. Sadovsky, A.H. Swinoff, J.A. Polish, P. Goda, G. Gavrilina, and J. Milbrandt. 1996a. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* **273**: 1219-1221.
- Lee, S.L., Y. Wang, and J. Milbrandt. 1996b. Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transcription factor NGFI-A (EGR1). *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4566-4572.
- Lee, Y.H., B. Sauer, P.F. Johnson, and F.J. Gonzalez. 1997. Disruption of the c/ebp alpha gene in adult mouse liver. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6014-6022.
- Lefebvre, C., M. Imagawa, S. Dana, J. Grindlay, M. Bodner, and M. Karin. 1987. Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J.* **6**: 971-981.
- Leid, M., P. Kastner, and P. Chambon. 1992. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. [Review]. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 427-433.
- Leonard, J., B. Peers, T. Johnson, K. Ferreri, S. Lee, and M.R. Montminy. 1993. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol. Endocrinol.* **7**: 1275-1283.
- Lew, D., H. Brady, K. Klausning, K. Yaginuma, L.E. Theill, C. Stauber, M. Karin, and P.L. Mellon. 1992. GHF-1 promoter-targeted immortalization of a somatotrophic progenitor cell results in dwarfism in transgenic mice. *Genes Dev.* **7**: 683-693.
- Lewis, E.B. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-570.

- Lewis, J.D. and E. Izaurralde. 1997. The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. [Review] [70 refs]. *Eur. J. Biochem.* **247**: 461-469.
- Lewis, J.D., R.R. Meehan, W.J. Henzel, I. Maurer-Fogy, P. Jeppesen, F. Klein, and A. Bird. 1992. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**: 905-914.
- Li, E., C. Beard, and R. Jaenisch. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting [see comments]. *Nature* **366**: 362-365.
- Li, E., C. Beard, A.C. Forster, T.H. Bestor, R. Jaenisch. 1993b. DNA methylation, genomic imprinting, and mammalian development. *CSH Symp. Quant. Biol.* **58**: 297.
- Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**: 915-926.
- Li, S., E.B.I. Crenshaw, E.J. Rawson, D.M. Simmons, L.W. Swanson, and M.G. Rosenfeld. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* **347**: 528-533.
- Li, T., M.R. Stark, A.D. Johnson, and C. Wolberger. 1995. Crystal structure of the MATa1/MAT alpha 2 homeodomain heterodimer bound to DNA. *Science* **270**: 262.
- Li, Y., P.M. Flanagan, H. Tschochner, and R.D. Komberg. 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* **263**: 805.
- Liao, S.M., J. Zhang, D.A. Jeffery, A.J. Koleske, C.M. Thompson, D.M. Chao, M. Viljoen, H.J. van Vuuren, and R.A. Young. 1995. A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* **374**: 193-196.
- Lill, N.L., S.R. Grossman, D. Ginsberg, J. DeCaprio, and D.M. Livingston. 1997. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**: 823-827.
- Lin, A., J. Frost, T. Deng, T. Smeal, N. al-Alawi, U. Kikkawa, T. Hunter, D. Brenner, and M. Karin. 1992. Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and

- AP-1 activity [published erratum appears in *Cell* 1992 Nov 27;71(5):following 886].  
*Cell* **70**: 777-789.
- Lin, S.C., S. Li, D.W. Drolet, and M.G. Rosenfeld. 1994. Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1- independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development* **120**: 515-522.
- Lin, Y.-S. and M.R. Green. 1991. Mechanism of action of an acidic transcriptional activator in vitro. *Cell* **64**: 971-981.
- Lints, T.J., L.M. Parsons, L. Hartley, I. Lyons, and R.P. Harvey. 1993. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* **119**: 419-431.
- Lipkin, S.M., A.M. Näär, K.A. Kalla, R.A. Sack, and M.G. Rosenfeld. 1993. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. *Genes Dev.* **7**: 1674-1687.
- Liu, H.X., M. Zhang, and A.R. Krainer. 1998. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev.* **12**: 1998-2012.
- Logan, M., S.M. Pagán-Westphal, D.M. Smith, L. Paganessi, and C.J. Tabin. 1998b. The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* **94**: 307-317.
- Logan, M., H.G. Simon, and C. Tabin. 1998a. Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. *Development* **125**: 2825-2835.
- Lohnes, D., P. Kastner, A. Dierich, M. Mark, M. LeMeur, and P. Chambon. 1993. Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**: 643-658.
- Lohnes, D., M. Mark, C. Mendelsohn, P. Dollé, A. Dierich, P. Gorry, A. Gansmuller, and P. Chambon. 1994. Functional of the retinoic acid receptors (RARs) during

- development. (I) Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**: 2723-2748.
- Lopez, A.J. 1995. Developmental role of transcription factor isoforms generated by alternative splicing. *Dev. Biol.* **172**: 396-411.
- Lu, H., O. Flores, R. Weinmann, and D. Reinberg. 1991. The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10004-10008.
- Lu, H., L. Zawel, L. Fisher, J.M. Egly, and D. Reinberg. 1992. Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358**: 641-645.
- Lu, Q. and M.P. Kamps. 1996. Structural determinants within Pbx1 that mediate cooperative DNA binding with pentapeptide-containing Hox proteins: proposal for a model of a Pbx1-Hox-DNA complex. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1632-1640.
- Lundell, M.J. and J. Hirsh. 1992. The zfh-2 gene product is a potential regulator of neuron-specific dopa decarboxylase gene expression in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **154**: 84-94.
- Lusser, A., G. Brosch, A. Loidl, H. Haas, and P. Loidl. 1997. Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. *Science* **277**: 88-91.
- Lyons, I., L.M. Parsons, L. Hartley, R. Li, J.E. Andrews, L. Robb, and R.P. Harvey. 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev.* **9**: 1654-1666.
- Ma, D., I. Olave, A. Merino, and D. Reinberg. 1996. Separation of the transcriptional coactivator and antirepression functions of transcription factor IIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6583-6588.

- Ma, D., H. Watanabe, F. Mermelstein, A. Admon, K. Oguri, X. Sun, T. Wada, T. Imai, T. Shiroya, and D. Reinberg. 1993. Isolation of a cDNA encoding the largest subunit of TFIIA reveals functions important for activated transcription. *Genes Dev.* **7** : 2246-2257.
- Ma, X., D. Yuan, K. Diepold, T. Scarborough, and J. Ma. 1996. The drosophila morphogenetic protein bicoid binds dna cooperatively. *Development* **122**: 1195-1206.
- Macchia, P.E., P. Lapi, H. Krude, M.T. Pirro, C. Missero, L. Chiovato, A. Souabni, M. Baserga, V. Tassi, A. Pinchera, G. Fenzi, A. Grütters, M. Busslinger, and R. Di Lauro. 1998. *PAX8* mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nature Genetics* **19**: 83
- Mader, S., P. Leroy, J.Y. Chen, and P. Chambon. 1993. Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J. Biol. Chem.* **268**: 591-600.
- Mader, S. and N. Sonenberg. 1995. Cap binding complexes and cellular growth control. [Review] [77 refs]. *Biochimie* **77** : 40-44.
- Maldonado, E., I. Ha, P. Cortes, L. Weis, and D. Reinberg. 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6335-6347.
- Maldonado, E., R. Shiekhattar, M. Sheldon, H. Cho, R. Drapkin, P. Rickert, E. Lees, C.W. Anderson, S. Linn, and D. Reinberg. 1996. A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins [published erratum appears in Nature 1996 Nov 28;384(6607):384]. *Nature* **381**: 86-89.

- Mangalam, H.J., V.R. Albert, H.A. Ingraham, M. Kapiloff, L. Wilson, C. Nelson, H. Elsholtz, and M.G. Rosenfeld. 1989. A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev.* **3**: 946-958.
- Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and et al. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835-839.
- Mann, R.S. and M. Abu-Shaar. 1996. Nuclear import of the homeodomain protein extradenticle in response to Wg and Dpp signalling. *Nature* **383**: 630-633.
- Mann, R.S. and S.K. Chan. 1996. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins [published erratum appears in Trends Genet 1996 Aug;12(8):328]. *Trends Genet.* **12**: 258-262.
- Mansouri, A., K. Chowdhury, and P. Gruss. 1998. Follicular cells of the thyroid gland require *Pax8* gene function. *Nature Genetics* **19**: 87
- Marakami, T., A. Ohtsuka, T. Taguchi, and O. Ohtani. 1985. Blood vascular bed in the rat pituitary intermediate lobe, with special reference to its development and portal drainage into the anterior lobe. A scanning electron microscopic study of vascular casts. *Arch. Histol. Jpn.* 48-69.
- Marcu, K.B., S.A. Bossone, and A.J. Patel. 1992. myc function and regulation. [Review] [432 refs]. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 809-860.
- Marshall, N.F., J. Peng, Z. Xie, and D.H. Price. 1996. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 27176-27183.
- Marshall, N.F. and D.H. Price. 1995. Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* **270**: 12335-12338.

- Mason, A.J., J.S. Hayflick, R.T. Zoeller, W.S. Young, H.S. Phillips, K. Nikolics, and P.H. Seeburg. 1986. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse. *Science* **234**: 1366-1371.
- Matsuo, I., S. Kuratani, C. Kimura, N. Takeda, and S. Aizawa. 1995. Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev.* **9**: 2646-2658.
- Maulbecker, C.C. and P. Gruss. 1993. The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO J.* **12**: 2361-2367.
- Maurer, R.A. and A.C. Notides. 1987. Identification of an estrogen-responsive element from the 5'-flanking region of the rat prolactin gene. *Mol. Biol. Cell* **7**: 4247-4254.
- Maxon, M.E., J.A. Goodrich, and R. Tjian. 1994. Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promoter clearance. *Genes Dev.* **8**: 515-524.
- McBroom, L.D., G. Flock, and V. Giguere. 1995. The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 796-808.
- McCracken, S., N. Fong, E. Rosonina, K. Yankulov, G. Brothers, D. Siderovski, A. Hessel, S. Foster, S. Shuman, and D.L. Bentley. 1997. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II [see comments]. *Genes Dev.* **11**: 3306-3318.
- McCracken, S., N. Fong, K. Yankulov, S. Ballantyne, G. Pan, J. Greenblatt, S.D. Patterson, M. Wickens, and D.L. Bentley. 1997. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385**: 357-361.
- McGinnis, W., R.L. Garber, J. Wirz, A. Kuroiwa, and W.J. Gehring. 1984. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* **37**: 403-408.

- McGinnis, W., C.P. Hart, W.J. Gehring, and F.H. Ruddle. 1984. Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* **38**: 675-680.
- McGinnis, W., M.S. Levine, E. Hafen, A. Kuroiwa, and W.J. Gehring. 1984. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**: 428-433.
- McNeilly, J.R., P. Brown, J. Mullins, A.J. Clark, and A.S. McNeilly. 1996. Characterization of the ovine LH beta-subunit gene: the promoter is regulated by GnRH and gonadal steroids in transgenic mice. *J. Endocrinol.* **151**: 481-489.
- McPherson, C.E., E.Y. Shim, D.S. Friedman, and K.S. Zaret. 1993. An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array. *Cell* **75**: 387-398.
- Meehan, R.R., J.D. Lewis, S. McKay, E.L. Kleiner, and A.P. Bird. 1989. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* **58**: 499-507.
- Mellon, I. and P.C. Hanawalt. 1989. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* **342**: 95-98.
- Mellon, S.H. and S.R. Bair. 1998. 25-Hydroxycholesterol is not a ligand for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 (SF-1). *Endocrinology* **139**: 3026-3029.
- Mendelsohn, C., D. Lohnes, D. Décimo, T. Lufkin, M. LeMeur, P. Chambon, and M. Mark. 1994b. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* **120**: 2749-2771.
- Mendelsohn, C., M. Mark, P. Dollé, A. Dierich, M.P. Gaub, A. Krust, C. Lampron, and P. Chambon. 1994a. Retinoic acid receptor  $\beta$ 2 (RAR $\beta$ 2) null mutant mice appear normal. *Dev. Biol.* **166**: 246-258



- Merino, A., K.R. Madden, W.S. Lane, J.J. Champoux, and D. Reinberg. 1993. DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature* **365**: 227-232.
- Mermelstein, F., K. Yeung, J. Cao, J.A. Inostroza, H. Erdjument-Bromage, K. Egelson, D. Landsman, P. Levitt, P. Tempst, and D. Reinberg. 1996. Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription. *Genes Dev.* **10**: 1033-1048.
- Miller, C.D. and W.L. Miller. 1996. Transcriptional repression of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene by 17 beta-estradiol. *Endocrinology* **137**: 3437-3446.
- Miller, C.P., R.E. McGehee, Jr., and J.F. Habener. 1994. IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J.* **13**: 1145-1156.
- Miskiewicz, P., D. Morrissey, Y. Lan, L. Raj, S. Kessler, M. Fujioka, T. Goto, and M. Weir. 1996. Both the paired domain and homeodomain are required for in vivo function of *Drosophila* Paired. *Development* **122**: 2709-2718.
- Mizzen, C.A., X.J. Yang, T. Kokubo, J.E. Brownell, A.J. Bannister, T. Owen-Hughes, J. Workman, L. Wang, S.L. Berger, T. Kouzarides, Y. Nakatani, and C.D. Allis. 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**: 1261-1270.
- Monica, K., N. Galili, J. Nourse, D. Saltman, and M.L. Cleary. 1991. PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 6149-6157.
- Morinaga, T., H. Yasuda, T. Hashimoto, K. Higashio, and T. Tamaoki. 1991. A human alpha-fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeodomains and seventeen zinc fingers. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 6041-6049.

- Morris, A.E., B. Kloss, R.E. McChesney, C. Bancroft, and L.A. Chasin. 1992. An alternatively spliced Pit-1 isoform altered in its ability to trans-activate. *Nucleic Acids Research* **20**: 1355-1361.
- Morriss-Kay, G.M., P. Murphy, R.E. Hill, and D.R. Davidson. 1991. Effects of retinoic acid excess on expression of Hox-2.9 and Krox-20 and on morphological segmentation in the hindbrain of mouse embryos. *EMBO J.* **10**: 2985-2995.
- Mucchielli, M.L., S. Martinez, A. Pattyn, C. Golidis, and J.F. Brunet. 1996. *Otx2*, an *Otx*-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**: 258-271.
- Mucchielli, M.L., T.A. Mitsiadis, S. Raffo, J.F. Brunet, J.P. Proust, and C. Golidis. 1997. Mouse *Otx2*/RIEG expression in the odontogenic epithelium precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signal for its maintenance. *Dev. Biol.* **189**: 275-284.
- Murphy, E.P., A.D. Dobson, C. Keller, and O.M. Conneely. 1996. Differential regulation of transcription by the NURR1/NUR77 subfamily of nuclear transcription factors. *Gene Expr.* **5**: 169-179.
- Nachtigal, M.W., Y. Hirokawa, D.L. Enyeart-VanHouten, J.N. Flanagan, G.D. Hammer, and H.A. Ingraham. 1998. Wilms' Tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* **93**: 445-454.
- Nagao, T., S. Leuzinger, D. Acampora, A. Simeone, R. Finkelstein, H. Reichert, and K. Furukubo-Tokunaga. 1998. Developmental rescue of *Drosophila* cephalic defects by the human *Otx* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3737-3742.
- Nagy, L., H.Y. Kao, D. Chakravarti, R.J. Lin, C.A. Hassig, D.E. Ayer, S.L. Schreiber, and R.M. Evans. 1997. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**: 373-380.

- Nakajima, T., C. Uchida, S.F. Anderson, J.D. Parvin, and M. Montminy. 1997. Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. *Genes Dev.* **11**: 738-747.
- Nan, X., F.J. Campoy, and A. Bird. 1997. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**: 471-481.
- Nan, X., R.R. Meehan, and A. Bird. 1993. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4886-4892.
- Nan, X., P. Tate, E. Li, and A. Bird. 1996. DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 414-421.
- Naor, Z., D. Harris, and S. Shacham. 1998. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C. [Review] [104 refs]. *F. Neuroendocrinol.* **19**: 1-19.
- Naya, F.J., C.M.M. Stellrecht, and M.J. Tsai. 1995. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* **9**: 1009-1019.
- Nelson, C., V.R. Albert, H.P. Elsholtz, L.I.W. Lu, and M.G. Rosenfeld. 1988. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* **239**: 1400-1405.
- Neufeld, E.J., D.G. Skalnik, P.M. Lievens, and S.H. Orkin. 1992. Human CCAAT displacement protein is homologous to the *Drosophila* homeoprotein, cut. *Nature Genetics* **1**: 50-55.
- Neugebauer, K.M. and M.B. Roth. 1997. Transcription units as RNA processing units [comment]. [Review] [80 refs]. *Genes Dev.* **11**: 3279-3285.
- Neuteboom, S.T. and C. Murre. 1997. Pbx raises the DNA binding specificity but not the selectivity of antennapedia Hox proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4696-4706.

- Neuteboom, S.T., L.T. Peltenburg, M.A. Van Dijk, and C. Murre. 1995. The hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9166-9170.
- Nguyen, H.Q., B. Hoffman-Liebermann, and D.A. Liebermann. 1993. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* **72**: 197-209.
- Nikitovitch-Winer, M.B., J. Atkin, and B.E. Maley. 1987. Colocalization of prolactin and growth hormone within specific adenohypophyseal cells in male, female, and lactating female rats. *Endocrinology* **121**: 625-630.
- Norman, M.F., T.N. Lavin, J.D. Baxter, and B.L. West. 1989. The rat growth hormone gene contains multiple thyroid response elements. *J. Biol. Chem.* **264**: 12063-12073.
- Norton, V.G., B.S. Imai, P. Yau, and E.M. Bradbury. 1989. Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* **57**: 449-457.
- Nourse, J., J.D. Mellentin, N. Galili, J. Wilkinson, E. Stanbridge, S.D. Smith, and M.L. Cleary. 1990. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* **60**: 535-545.
- O'Brien, T., S. Hardin, A. Greenleaf, and J.T. Lis. 1994. Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* **370**: 75-77.
- Ocran, K.W., V.D. Sarapura, W.M. Wood, D.F. Gordon, A. Gutierrez-Hartmann, and E.C. Ridgway. 1990. Identification of cis-acting promoter elements important for expression of the mouse glycoprotein hormone alpha-subunit gene in thyrotropes. *Mol. Endocrinol.* **4**: 766-772.

- Offield, M.F., T.L. Jetton, P.A. Labosky, M. Ray, R.W. Stein, M.A. Magnuson, B.L. Hogan, and C.V. Wright. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**: 983-995.
- Ogryzko, V.V., R.L. Schiltz, V. Russanova, B.H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**: 953-959.
- Ohlsson, H., K. Karlsson, and T. Edlund. 1993. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J.* **12**: 4251-4259.
- Ohta, K., Y. Nobukuni, H. Mitsubuchi, S. Fujimoto, N. Matsuo, H. Inagaki, F. Endo, and I. Matsuda. 1992. Mutations in the Pit-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 851-855.
- Oliver, G., A. Mailhos, R. Wehr, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and P. Gruss. 1995. Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* **121**: 4045-4055.
- Onate, S.A., S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and B.W. O'Malley. 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**: 1354-1357.
- Ossipow, V., J.P. Tassan, E.A. Nigg, and U. Schibler. 1995. A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell* **83**: 137-146.

- Otting, G., Y.Q. Qian, M. Billeter, M. Muller, M. Affolter, W.J. Gehring, and K. Wuthrich. 1990. Protein--DNA contacts in the structure of a homeodomain--DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J.* **9**: 3085-3092.
- Pabo, C.O. and R.T. Sauer. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 1053-1095.
- Pai, C.Y., T.S. Kuo, T.J. Jaw, E. Kurant, C.T. Chen, D.A. Bessarab, A. Salzberg, and Y.H. Sun. 1998. The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**: 435-446.
- Pan, G., T. Aso, and J. Greenblatt. 1997. Interaction of elongation factors TFIIIS and elongin A with a human RNA polymerase II holoenzyme capable of promoter-specific initiation and responsive to transcriptional activators. *J. Biol. Chem.* **272**: 24563-24571.
- Panning, B. and R. Jaenisch. 1996. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev.* **10**: 1991-2002.
- Parada, C.A. and R.G. Roeder. 1996. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature* **384**: 375-378.
- Parker, K.L. and B.P. Schimmer. 1997. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* **18**: 361-377.
- Patapoutian, A., J.K. Yoon, J.H. Miner, S. Wang, K. Stark, and B. Wold. 1995. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development* **121**: 3347-3358.

- Patturajan, M., X. Wei, R. Berezney, and J.L. Corden. 1998. A nuclear matrix protein interacts with the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2406-2415.
- Patwardhan, S., A. Gashler, M.G. Siegel, L.C. Chang, L.J. Joseph, T.B. Shows, M.M. Le Beau, and V.P. Sukhatme. 1991. EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* **6**: 917-928.
- Peers, B., J. Leonard, S. Sharma, G. Teitelman, and M.R. Montminy. 1994. Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol. Endocrinol.* **8**: 1798-1806.
- Peers, B., S. Sharma, T. Johnson, M. Kamps, and M. Montminy. 1995. The pancreatic islet factor STF-1 binds cooperatively with Pbx to a regulatory element in the somatostatin promoter: importance of the FPWMK motif and of the homeodomain. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 7091-7097.
- Peltenburg, L.T. and C. Murre. 1996. Engrailed and Hox homeodomain proteins contain a related Pbx interaction motif that recognizes a common structure present in Pbx. *EMBO J.* **15**: 3385-3393.
- Peltenburg, L.T.C. and C. Murre. 1997. Specific residues in the PBX homeodomain differentially modulate the DNA-binding activity of Hox and engrailed proteins. *Development* **124**: 1089-1098.
- Peltz, S.W., G. Brewer, P. Bernstein, P.A. Hart, and J. Ross. 1991. Regulation of mRNA turnover in eukaryotic cells. [Review] [363 refs]. *Crit. Rev. Euk. Gene Expr.* **1**: 99-126.
- Pennathur, S., L.D. Madison, T.W. Kay, and J.L. Jameson. 1993. Localization of promoter sequences required for thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormone

- responsiveness of the glycoprotein hormone alpha-gene in primary cultures of rat pituitary cells. *Mol. Endocrinol.* **7**: 797-805.
- Percival-Smith, A., M. Muller, M. Affolter, and W.J. Gehring. 1990. The interaction with DNA of wild-type and mutant fushi tarazu homeodomains [published erratum appears in EMBO J 1992 Jan;11(1):382]. *EMBO J.* **9**: 3967-3974.
- Perez-Castillo, A., C. Pipaon, I. Garcia, and S. Alemany. 1993. NGFI-A gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* **268**: 19445-19450.
- Perlmann, T., P.N. Rangarajan, K. Umesono, and R.M. Evans. 1993. Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* **7**: 1411-1422.
- Perlmann, T. and B. Vennstrom. 1995. The sound of silence [news; comment]. *Nature* **377**: 387-388.
- Perlmann, T. and Ö. Wrangé. 1988. Specific glucocorticoid receptor binding to DNA reconstituted in a nucleosome. *EMBO J.* **7**: 3073-3079.
- Pfaff, S.L., M. Mendelsohn, C.L. Stewart, T. Edlund, and T.M. Jessell. 1996. Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**: 309-320.
- Pfaffle, R.W., G.E. DiMattia, J.S. Parks, M.R. Brown, J.M. Wit, M. Jansen, H. Van der Nat, J.L. Van den Brande, M.G. Rosenfeld, and H.A. Ingraham. 1992. Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. *Science* **257**: 1118-1121.
- Phelan, M.L. and M.S. Featherstone . 1997. Distinct HOX N-terminal arm residues are responsible for specificity of DNA recognition by HOX monomers and HOX.PBX heterodimers . *J. Biol. Chem.* **272**: 8635-8643.
- Phelan, M.L., I. Rambaldi, and M.S. Featherstone. 1995. Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3989-3997.



- Phelan, M.L., R. Sadoul, and M.S. Featherstone. 1994. Functional differences between HOX proteins conferred by two residues in the homeodomain N-terminal arm. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5066-5075.
- Philips, A., S. Lesage, R. Gingras, M.H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo, and J. Drouin. 1997a. Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5946-5951.
- Philips, A., M.H. Maira, A. Mullick, M. Chamberland, S. Lesage, P. Hugo, and J. Drouin. 1997b. Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol. Biol. Cell* **17**: 5952-5959.
- Picard, D., S.J. Salser, and K.R. Yamamoto. 1988. A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* **54**: 1073-1080.
- Piedra, M.E., J.M. Icardo, M. Albajar, J.C. Rodriguez-Rey, and M.A. Ros. 1998. *Pitx2* participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* **94**: 319-324.
- Pierce, J.G. and T.F. Parsons. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 465-495.
- Pina, B., U. Bruggemeier, and M. Beato. 1990. Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* **60**: 719-731.
- Pinsonneault, J., B. Florence, H. Vaessin, and W. McGinnis. 1997. A model for extradenticle function as a switch that changes HOX proteins from repressors to activators. *EMBO J.* **16**: 2032-2042.
- Porter, T.E., J.B. Hill, C.D. Wiles, and L.S. Frawley. 1990. Is the mammosomatotrope a transitional cell for the functional interconversion of growth hormone- and prolactin-

- secreting cells? Suggestive evidence from virgin, gestating, and lactating rats. *Endocrinology* **127**: 2789-2794.
- Porter, T.E., C.D. Wiles, and L.S. Frawley. 1991. Evidence for bidirectional interconversion of mammatropes and somatotropes: rapid reversion of acidophilic cell types to pregestational proportions after weaning. *Endocrinology* **129**: 1215-1220.
- Porteus, M.H., A. Bulfone, R.D. Ciaranello, and J.L. Rubenstein. 1991. Isolation and characterization of a novel cDNA clone encoding a homeodomain that is developmentally regulated in the ventral forebrain [published erratum appears in *Neuron* 1992 Jul;9(1):187]. *Neuron* **7**: 221-229.
- Poulin, G., B. Turgeon, and J. Drouin. 1997. NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6673-6682.
- Pratt, W.B. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. [Review] [79 refs]. *J. Biol. Chem.* **268**: 21455-21458.
- Price, D.H., A.E. Sluder, and A.L. Greenleaf. 1989. Dynamic interaction between a *Drosophila* transcription factor and RNA polymerase II. *Mol. Biol. Cell* **9**: 1465-1475.
- Price, M., D. Lazzaro, T. Pohl, M.G. Mattei, U. Ruther, J.C. Olivo, D. Duboule, and R. Di Lauro. 1992. Regional expression of the homeobox gene *Nkx-2.2* in the developing mammalian forebrain. *Neuron* **8**: 241-255.
- Price, M., M. Lemaistre, M. Pischetola, R. Di Lauro, and D. Duboule. 1991. A mouse gene related to *Distal-less* shows a restricted expression in the developing forebrain. *Nature* **351**: 748-751.
- Puelles, L. and J.L.R. Rubenstein. 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* **16**: 472-479.

- Pugh, B.F. and R. Tjian. 1991. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* **5**: 1935-1945.
- Pulverer, B.J., J.M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J.R. Woodgett. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**: 670-674.
- Purnell, B.A., P.A. Emanuel, and D.S. Gilmour. 1994. TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in *Drosophila* class II genes. *Genes Dev.* **8**: 830-842.
- Qian, Y.Q., M. Billeter, G. Otting, M. Muller, W.J. Gehring, and K. Wuthrich. 1989. The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors [published erratum appears in *Cell* 1990 May 4;61(3):548]. *Cell* **59**: 573-580.
- Quiring, R., U. Walldorf, U. Kloter, and W.J. Gehring. 1994. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans [see comments]. *Science* **265**: 785-789.
- Rachez, C., Z. Suldan, J. Ward, C.P. Betty Chang, D. Burakov, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and L.P. Freedman. 1998. A novel complex that interacts with the vitamin D<sub>3</sub> receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* **12**: 1787-1800.
- Radovick, S., M. Nations, Y. Du, L.A. Berg, B.D. Weintraub, and F.E. Wondisford. 1992. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science* **257**: 1115-1118.
- Rasmussen, E.B. and J.T. Lis. 1993. In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7923-7927.
- Rathke, M.H. 1838. Uber die entstehung der glandula pituitaria. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.* 482-485.

- Rauskolb, C., M. Peifer, and E. Wieschaus. 1993. extradenticle, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene pbx1. *Cell* **74**: 1101-1112.
- Reines, D., M.J. Chamberlin, and C.M. Kane. 1989. Transcription elongation factor SII (TFIIS) enables RNA polymerase II to elongate through a block to transcription in a human gene in vitro. *J. Biol. Chem.* **264**: 10799-10809.
- Reines, D., J.W. Conaway, and R.C. Conaway. 1996. The RNA polymerase II general elongation factors. [Review] [37 refs]. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 351-355.
- Renaud, J.P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 1995. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**: 681-689.
- Rhodes, S.J., R. Chen, G.E. DiMattia, K.M. Scully, K.A. Kalla, S.C. Lin, V.C. Yu, and M.G. Rosenfeld. 1993. A tissue-specific enhancer confers Pit-1-dependent morphogen inducibility and autoregulation on the pit-1 gene. *Genes Dev.* **7**: 913-932.
- Rieckhof, G.E., F. Casares, H.D. Ryoo, M. Abu-Shaar, and R.S. Mann. 1997. Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**: 171-183.
- Rivera-Perez, J.A., M. Mallo, M. Gendron-Maguire, T. Gridley, and R.R. Behringer. 1995. Goosecoid is not an essential component of the mouse gastrula organizer but is required for craniofacial and rib development. *Development* **121**: 3005-3012.
- Rivera-Pomar, R., D. Niessing, U. Schmidt-Ott, W.J. Gehring, and H. Jackle. 1996. RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature* **379**: 746-749.
- Roberson, M.S., A. Misra-Press, M.E. Laurance, P.J. Stork, and R.A. Maurer. 1995. A role for mitogen-activated protein kinase in mediating activation of the glycoprotein

- hormone alpha-subunit promoter by gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3531-3539.
- Roberson, M.S., W.E. Schoderbek, G. Tremml, and R.A. Maurer. 1994. Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 2985-2993.
- Roberts, S.G., I. Ha, E. Maldonado, D. Reinberg, and M.R. Green. 1993. Interaction between an acidic activator and transcription factor TFIIB is required for transcriptional activation. *Nature* **363**: 741-744.
- Roy, R., J.P. Adamczewski, T. Seroz, W. Vermeulen, J.P. Tassan, L. Schaeffer, E.A. Nigg, J.H. Hoeijmakers, and J.M. Egly. 1994. The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* **79**: 1093-1101.
- Rozen, F., I. Edery, K. Meerovitch, T.E. Dever, W.C. Merrick, and N. Sonenberg. 1990. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1134-1144.
- Rubenstein, J.L.R., S. Martinez, K. Shimamura, and L. Puelles. 1994. The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* **266**: 578-580.
- Rudnicki, M.A., T. Braun, S. Hinuma, and R. Jaenisch. 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**: 383-390.
- Rudnicki, M.A. and R. Jaenisch. 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. [Review]. *Bioessays* **17**: 203-209.
- Rudnicki, M.A., P.N. Schnegelsberg, R.H. Stead, T. Braun, H.H. Arnold, and R. Jaenisch. 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**: 1351-1359.
- Ruiz-Echevarria, M.J., K. Czaplinski, and S.W. Peltz. 1996. Making sense of nonsense in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 433-438.

- Russo, M.W., B.R. Sevetson, and J. Milbrandt. 1995. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6873-6877.
- Ryan, A.K., B. Blumberg, C. Rodriguez-Esteban, S. Yonei-Tamura, K. Tamura, T. Tsukui, J. de la Peña, W. Sabbagh, J. Greenwald, S. Choe, D.P. Norris, E.J. Robertson, R.M. Evans, M.G. Rosenfeld, and J.C. Izpisúa-Belmonte. 1998. Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**: 545
- Ryan, A.K. and M.G. Rosenfeld. 1997. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. [Review] [176 refs]. *Genes Dev.* **11**: 1207-1225.
- Sachs, A. 1990. The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**: 1092-1098.
- Sadovsky, Y., P.A. Crawford, K.G. Woodson, J.A. Polish, M.A. Clements, L.M. Tourtellotte, K. Simburger, and J. Milbrandt. 1995. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain- cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10939-10943.
- Sanchez, M., P.A. Jennings, and C. Murre. 1997. Conformational changes induced in Hoxb-8/Pbx-1 heterodimers in solution and upon interaction with specific DNA. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5369-5376.
- Sande, S. and M.L. Privalsky. 1996. Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* **10**: 813-825.
- Sarapura, V.D., H.L. Strouth, D.F. Gordon, W.M. Wood, and E.C. Ridgway. 1997. Msx1 is present in thyrotropic cells and binds to a consensus site on the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter. *Mol. Endocrinol.* **11**: 1782-1794.

- Sarapura, V.D., W.M. Wood, D.F. Gordon, K.W. Ocran, M.Y. Kao, and E.C. Ridgway. 1990. Thyrotrope expression and thyroid hormone inhibition map to different regions of the mouse glycoprotein hormone alpha-subunit gene promoter. *Endocrinology* **127**: 1352-1361.
- Sasaki, F., P. Wu, D. Rougeau, G. Unabia, and G.V. Childs. 1990. Cytochemical studies of responses of corticotropes and thyrotropes to cold and novel environment stress. *Endocrinology* **127**: 285-297.
- Satokata, I. and R. Maas. 1994. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development [see comments]. *Nature Genetics* **6**: 348-356.
- Sauer, F., J.D. Fondell, Y. Ohkuma, R.G. Roeder, and H. Jackle. 1995b. Control of transcription by kruppel through interactions with TFIIB and TFIIE beta. *Nature* **375**: 162-164.
- Sauer, F., S.K. Hansen, and R. Tjian. 1995a. DNA template and activator-coactivator requirements for transcriptional synergism by *Drosophila* bicoid. *Science* **270**: 1825-1828.
- Saunders, B.D., E. Sabbagh, W.W. Chin, and U.B. Kaiser. 1998. Differential use of signal transduction pathways in the gonadotropin-releasing hormone-mediated regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Endocrinology* **139**: 1835-1843.
- Sauvageau, G., U. Thorsteinsdottir, C.J. Eaves, H.J. Lawrence, C. Largman, P.M. Lansdorp, and R.K. Humphries. 1995. Overexpression of HoxB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations *in vitro* and *in vivo*. *Genes Dev.* **9**: 1753-1765.
- Scafe, C., D. Chao, J. Lopes, J.P. Hirsch, S. Henry, and R.A. Young. 1990. RNA polymerase II C-terminal repeat influences response to transcriptional enhancer signals. *Nature* **347**: 491-494.

- Schier, A.F. and W.J. Gehring. 1992. Direct homeodomain-DNA interaction in the autoregulation of the fushi tarazu gene. *Nature* **356**: 804-807.
- Schild, C., F.X. Claret, W. Wahli, and A.P. Wolffe. 1993. A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from the *Xenopus* vitellogenin B1 promoter in vitro. *EMBO J.* **12**: 423-433.
- Schmitt, M., P. Bausero, P. Simoni, D. Queuche, V. Geoffroy, C. Marschal, J. Kempf, and C. Quirin-Stricker. 1995. Positive and negative effects of nuclear receptors on transcription activation by AP-1 of the human choline acetyltransferase proximal promoter. *J. Neurosci. Res.* **40**: 152-164.
- Schoderbek, W.E., M.S. Roberson, and R.A. Maurer. 1993. Two different DNA elements mediate gonadotropin releasing hormone effects on expression of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene. *J. Biol. Chem.* **268**: 3903-3910.
- Schulman, I.G., C. Li, J.W. Schwabe, and R.M. Evans. 1997. The phantom ligand effect: allosteric control of transcription by the retinoid X receptor. *Genes Dev.* **11**: 299-308.
- Schumacher, A. and T. Magnuson. 1997. Murine Polycomb- and trithorax-group genes regulate homeotic pathways and beyond. *Trends Genet.* **13**: 167-170.
- Schwind, J. 1928. The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Am. J. Anat.* **41**: 295-319.
- Scott, M.P. 1992. Vertebrate homeobox gene nomenclature [letter]. *Cell* **71**: 551-553.
- Scott, M.P. and A.J. Weiner. 1984. Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4115-4119.
- Sealy, L. and R. Chalkley. 1978. DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I. *Nucl. Acids. Res.* **5**: 1863-1876.



- Seidah, N.G., J.C. Barale, M. Marcinkiewicz, M.G. Mattei, R. Day, and M. Chretien. 1994. The mouse homeoprotein mlim-3 is expressed early in cells derived from the neuroepithelium and persists in adult pituitary. *DNA Cell. Biol.* **13**: 1163-1180.
- Semina, E.V., R.E. Ferrell, H.A. Mintz-Hittner, P. Bitoun, W.L.M. Alward, R.S. Reiter, C. Funkhauser, S. Daack-Hirsch, and J.C. Murray. 1998. A novel homeobox gene *PITX3* is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD in humans. *Nature Genetics* **19**: 167-170.
- Semina, E.V., R. Reiter, N.J. Leysens, W.L. Alward, K.W. Small, N.A. Datson, J. Siegel-Bartelt, D. Bierke-Nelson, P. Bitoun, B.U. Zabel, J.C. Carey, and J.C. Murray. 1996. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics* **14**: 392-399.
- Semina, E.V., R.S. Reiter, and J. Murray. 1997. Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 2109-2116.
- Seol, W., H.S. Choi, and D.D. Moore. 1996. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* **272**: 1336-1339.
- Serizawa, H., T.P. Makela, J.W. Conaway, R.C. Conaway, R.A. Weinberg, and R.A. Young. 1995. Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature* **374**: 280-282.
- Seto, E., Y. Shi, and T. Shenk. 1991. YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. *Nature* **354**: 241-245.

- Shang, J., Y. Luo, and D.A. Clayton. 1997. Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. *Dev. Dynamics* **209**: 242-253.
- Shanmugam, K., M.S. Featherstone, and H.U. Saragovi. 1997. Residues flanking the HOX YPWM motif contribute to cooperative interactions with PBX. *J. Biol. Chem.* **272**: 19081-19087.
- Sharkey, M., Y. Graba, and M.P. Scott. 1997. Hox genes in evolution: protein surfaces and paralog groups. [Review] [37 refs]. *Trends Genet.* **13**: 145-151.
- Sharp, P.A. 1992. TATA-binding protein is a classless factor. *Cell* **68**: 819-821.
- Shaw, G. and R. Kamen. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**: 659-667.
- Shawlot, W. and R.R. Behringer. 1995. Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* **374**: 425-430.
- Shen, W.H., C.C. Moore, Y. Ikeda, K.L. Parker, and H.A. Ingraham. 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* **77**: 651-661.
- Sheng, G., E. Thouvenot, D. Schmucker, D.S. Wilson, and C. Desplan. 1997. Direct regulation of rhodopsin 1 by Pax-6/eyeless in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev.* **11**: 1122-1131.
- Sheng, H.Z., K. Moriyama, T. Yamashita, H. Li, S.S. Potter, K.A. Mahon, and H. Westphal. 1997. Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* **278**: 1809-1812.
- Sheng, H.Z., A.B. Zhadanov, B. Mosinger, T. Fujii, S. Bertuzzi, A. Grinberg, E.J. Lee, S.P. Huang, K.A. Mahon, and H. Westphal. 1996. Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *Lhx3*. *Science* **272**: 1004-1007.

- Shiekhattar, R., F. Mermelstein, R.P. Fisher, R. Drapkin, B. Dynlacht, H.C. Wessling, D.O. Morgan, and D. Reinberg. 1995. Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH. *Nature* **374**: 283-287.
- Shinoda, K., H. Lei, H. Yoshii, M. Nomura, M. Nagano, H. Shiba, H. Sasaki, Y. Osawa, Y. Ninomiya, O. Niwa, and et al. 1995. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev. Dynamics* **204**: 22-29.
- Shyu, A.B., J.G. Belasco, and M.E. Greenberg. 1991. Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev.* **5**: 221-231.
- Simeone, A., D. Acampora, L. Arcioni, P.W. Andrews, E. Boncinelli, and F. Mavilio. 1990. Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* **346**: 763-766.
- Simeone, A., D. Acampora, M. Gulisano, A. Stomaiuolo, and E. Boncinelli. 1992a. Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* **358**: 687-690.
- Simeone, A., D. Acampora, A. Mallamaci, A. Stomaiuolo, M.R. D'Apice, V. Nigro, and E. Boncinelli. 1993. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* **12**: 2735-2747.
- Simeone, A., M. Gulisano, D. Acampora, A. Stomaiuolo, M. Rambaldi, and E. Boncinelli. 1992b. Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J.* **11**: 2541-2550.
- Simeone, A., M. Pannese, D. Acampora, M. D'Esposito, and E. Boncinelli. 1988. At least three human homeoboxes on chromosome 12 belong to the same transcription unit. *Nucl. Acids. Res.* **16**: 5379-5390.

- Simmons, D.M., J.W. Voss, H.A. Ingraham, J.M. Holloway, R.S. Broide, M.G. Rosenfeld, and L.W. Swanson. 1990. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* **4**: 695-711.
- Simpson-Brose, M., J. Treisman, and C. Desplan. 1994. Synergy between the hunchback and bicoid morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*. *Cell* **78**: 855-865.
- Singer, V.L., C.R. Wobbe, and K. Struhl. 1990. A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes Dev.* **4**: 636-645.
- Sisodia, S.S., B. Sollner-Webb, and D.W. Cleveland. 1987. Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation. *Mol. Biol. Cell* **7**: 3602-3612.
- Smale, C.T. 1994. Core promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes. In: *Transcription: Mechanisms and regulation*. edited by Conaway, R.C. and Conaway, J.W. p. 63-81. Raven Press Ltd. New-York.
- Smale, S.T. and D. Baltimore. 1989. The "initiator" as a transcription control element. *Cell* **57**: 103-113.
- Smale, S.T., M.C. Schmidt, A.J. Berk, and D. Baltimore. 1990. Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4509-4513.
- Smale, S.T. and R. Tjian. 1985. Transcription of Herpes simplex virus tk sequences under the control of wild-type and mutant human RNA polymerase I promoters. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 352-362.
- Smidt, M., H.S.A. van Schaick, C. Lanctôt, J.J. Tremblay, J.J. Cox, A.A.M. van der Kleij, G. Wolterink, J. Drouin, and P.H. Burbach. 1997. A homeodomain gene *PTX3* has

- highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13305-13310.
- Smith, A.I. and J.W. Funder. 1988. Pro-opiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr. Rev.* **9**: 159-179.
- Smith, C.L., S.A. Onate, M.J. Tsai, and B.W. O'Malley. 1996. CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8884-8888.
- Smith, P.E. 1916. The effect of hypophysectomy in the early embryo upon growth and development of the frog. *Anat. Rec.* **11**: 57-64.
- Smith, P.E. and I.P. Smith. 1922a. The effect of intraperitoneal injection of fresh anterior lobe substance in hypophysectomized tadpoles. *Anat. Rec.* **23**: 38-39.
- Smith, P.E. and I.P. Smith. 1922b. The repair and activation of the thyroid in the hypophysectomized tadpole by parenteral administration of fresh anterior lobe of bovine hypophysis. *J. Med. Res.* **43**: 267-283.
- Smith, S.T. and J.B. Jaynes. 1996. A conserved region of engrailed, shared among all *en-*, *gsc-*, *Nk1-*, *Nk2-* and *msh-*class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* **122**: 3141-3150.
- Somson, M.W., W. Wu, J.S. Dasen, S.E. Flynn, D.J. Norman, S.M. O'Connell, I. Gukovsky, C. Carriere, A.K. Ryan, A.P. Miller, L. Zuo, A.S. Gleiberman, B. Andersen, W.G. Beamer, and M.G. Rosenfeld. 1996. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in *Ames* dwarfism. *Nature* **384**: 327-333.
- Spencer, T.E., G. Jenster, M.M. Burcin, C.D. Allis, J. Zhou, C.A. Mizzen, N.J. McKenna, S.A. Onate, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and B.W. O'Malley. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**: 194-198.

- Steger, D.J., J.H. Hecht, and P.L. Mellon. 1994. GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin alpha-subunit gene in the placenta and pituitary gland. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5592-5602.
- Steinfelder, H.J., P. Hauser, Y. Nakayama, S. Radovick, J.H. McClaskey, T. Taylor, B.D. Weintraub, and F.E. Wondisford. 1991. Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSHB expression: role of a pituitary-specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid hormone-inhibitory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3130-3134.
- Stoffers, D.A., J. Ferrer, W.L. Clarke, and J.F. Habener. 1997. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1 [letter]. *Nature Genetics* **17**: 138-139.
- Strahl, B.D., H.J. Huang, N.R. Pedersen, J.C. Wu, B.R. Ghosh, and W.L. Miller. 1997. Two proximal activating protein-1-binding sites are sufficient to stimulate transcription of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene. *Endocrinology* **138**: 2621-2631.
- Stringer, K.F., C.J. Ingles, and J. Greenblatt. 1990. Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature* **345**: 783-786.
- Struhl, G., K. Struhl, and P.M. Macdonald. 1989. The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell* **57**: 1259-1273.
- Struhl, K. 1994. Duality of TBP, the universal transcription factor. *Science* **263**: 1103-1104.
- Stuart, E.T., Y. Yokota, and P. Gruss. 1995. PAX and HOX in neoplasia. [Review]. *Adv. in Genet.* **33**: 255-274.
- Studer, M., H. Popperl, H. Marshall, A. Kuroiwa, and R. Krumlauf. 1994. Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of HoxB-1. *Science* **265**: 1728-1732.

- Sturm, R.A. and W. Herr. 1988. The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature* **336**: 601-604.
- Sun, X.-H., N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and D. Baltimore. 1991. Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5603-5611.
- Sundaresan, S., I.M. Colin, R.G. Pestell, and J.L. Jameson. 1996. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase. *Endocrinology* **137**: 304-311.
- Swirnoff, A.H., E.D. Apel, J. Svaren, B.R. Sevetson, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, and J. Milbrandt. 1998. Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 512-524.
- Szeto, D.P., A.K. Ryan, S.M. O'Connell, and M.G. Rosenfeld. 1996. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7706-7710.
- Tamkun, J.W., R. Deuring, M.P. Scott, M. Kissinger, A.M. Pattatucci, T.C. Kaufman, and J.A. Kennison. 1992. brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**: 561-572.
- Tan, S. and T.J. Richmond. 1998. Crystal structure of the yeast MAT $\alpha$ 2/MCM1/DNA ternary complex. *Nature* **391**: 660-666.
- Tan, S. and T.J. Richmond. 1998. Eukaryotic transcription factors. [Review] [50 refs]. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 41-48.
- Tanese, N., B.F. Pugh, and R. Tjian. 1991. Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex. *Genes Dev.* **5**: 2212-2224.
- Tansey, W.P., S. Ruppert, R. Tjian, and W. Herr. 1994. Multiple regions of TBP participate in the response to transcriptional activators in vivo. *Genes Dev.* **8**: 2756-2769.

- Tassabehji, M., A.P. Read, V.E. Newton, R. Harris, R. Balling, P. Gruss, and T. Strachan. 1992. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene [see comments]. *Nature* **355**: 635-636.
- Tate, P., W. Skames, and A. Bird. 1996. The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nature Genetics* **12**: 205-208.
- Taunton, J., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**: 408-411.
- Thayer, M.J., S.J. Tapscott, R.L. Davis, W.E. Wright, A.B. Lassar, and H. Weintraub. 1989. Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1. *Cell* **58**: 241-248.
- Therrien, M. and J. Drouin. 1991. Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3492-3503.
- Therrien, M. and J. Drouin. 1993. Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2342-2353.
- Thomas, P.Q., B.V. Johnson, J. Rathjen, and P.D. Rathjen. 1995. Sequence, genomic organization, and expression of the novel homeobox gene *hesx1*. *J. Biol. Chem.* **270**: 3869-3875.
- Thompson, C.M., A.J. Koleske, D.M. Chao, and R.A. Young. 1993. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* **73**: 1361-1375.
- Tjian, R. and T. Maniatis. 1994. Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. [Review]. *Cell* **77** : 5-8.
- Topilko, P., S. Schneider-Maunoury, G. Levi, A. Trembleau, D. Gourdjji, M.A. Driancourt, C.V. Rao, and P. Chambard. 1998. Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol. Endocrinol.* **12**: 107-122.



- Treier, M., A.S. Gleiberman, S.M. O'Connell, D.P. Szeto, J.A. McMahon, A.P. McMahon, and M.G. Rosenfeld. 1998. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis *in vivo*. *Genes Dev.* **12**: 1691-1704.
- Treisman, J., P. Gonczy, M. Vashishtha, E. Harris, and C. Desplan. 1989. A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* **59**: 553-562.
- Treisman, J., E. Harris, and C. Desplan. 1991. The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev.* **5**: 594-604.
- Tremblay, J.J., C. Lanctôt, and J. Drouin. 1998. The Pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol. Endocrinol.* **12**: 428-441.
- Tremblay, Y., I. Tretjakoff, A. Peterson, T. Antakly, C.X. Zhang, and J. Drouin. 1988. Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8890-8894.
- Tsang, A.P., J.E. Visvader, C.A. Tumer, Y. Fujiwara, C. Yu, M.J. Weiss, M. Crossley, and S.H. Orkin. 1997. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* **20**: 109-119.
- Tsao, D.H., J.M. Gruschus, L.H. Wang, M. Nirenberg, and J.A. Ferretti. 1995. The three-dimensional solution structure of the NK-2 homeodomain from *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* **251**: 297-307.
- Tsukiyama, T. and C. Wu. 1997. Chromatin remodeling and transcription. [Review] [140 refs]. *Curr. Opin. Genetics Dev.* **7**: 182-191.
- Um, M., C. Li, and J.L. Manley. 1995. The transcriptional repressor even-skipped interacts directly with TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5007-5016.

- Usheva, A., E. Maldonado, A. Goldring, H. Lu, C. Houbavi, D. Reinberg, and Y. Aloni. 1992. Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein. *Cell* **69**: 871-881.
- Usheva, A. and T. Shenk. 1994. TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* **76**: 1115-1121.
- van der Hoeven, F., J. Zakany, and D. Duboule. 1996. Gene transpositions in the HoxD complex reveal a hierarchy of regulatory controls. *Cell* **85**: 1025-1035.
- Vettese-Dadey, M., P.A. Grant, T.R. Hebbes, C. Crane-Robinson, C.D. Allis, and J.L. Workman. 1996. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J.* **15**: 2508-2518.
- Vidali, G., L.C. Boffa, E.M. Bradbury, and V.G. Allfrey. 1978. Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 2239-2243.
- Voegel, J.J., M.J. Heine, C. Zechel, P. Chambon, and H. Gronemeyer. 1996. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* **15**: 3667-3675.
- vom Baur, E., M. Harbers, S.J. Um, A. Benecke, P. Chambon, and R. Losson. 1998. The yeast Ada complex mediates the ligand-dependent activation function AF-2 of retinoid X and estrogen receptors. *Genes Dev.* **12**: 1278-1289.
- Vorbruggen, G., R. Constien, O. Zilian, E.A. Wimmer, G. Dowe, H. Taubert, M. Noll, and H. Jackle. 1997. Embryonic expression and characterization of a Ptx1 homolog in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **68**: 139-147.

- Voss, J.W. and M.G. Rosenfeld. 1992. Anterior pituitary development: short tales from dwarf mice. *Cell* **70**: 527-530.
- Voss, J.W., L. Willson, S.J. Rhodes, and M.G. Rosenfeld. 1993. An alternative Pit-1 RNA splicing product reveals modular binding and nonmodular transcriptional activities of the POU- specific domain. *Mol. Endocrinol.* **7**: 1551-1560.
- Wadman, I.A., H. Osada, G.G. Grutz, A.D. Agulnick, H. Westphal, A. Forster, and T.H. Rabbitts. 1997. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* **16**: 3145-3157.
- Wagner, R.L., J.W. Apriletti, M.E. McGrath, B.L. West, J.D. Baxter, and R.J. Fletterick. 1995. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **378**: 690-697.
- Wahlström, G.M., M. Sjöberg, M. Andersson, K. Nordström, and B. Vennström. 1992. Binding characteristics of the thyroid hormone receptor homo- and heterodimers to consensus AGGTCA repeat motifs. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1013-1022.
- Walldorf, U. and W.J. Gehring. 1992. Empty spiracles, a gap gene containing a homeobox involved in Drosophila head development. *EMBO J.* **11**: 2247-2259.
- Wang, H.Y., W. Lin, J.A. Dyck, J.M. Yeakley, Z. Songyang, L.C. Cantley, and X.D. Fu. 1998. SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **140**: 737-750.
- Wang, Z., J.Q. Svejstrup, W.J. Feaver, X. Wu, R.D. Kornberg, and E.C. Friedberg. 1994. Transcription factor b (TFIIH) is required during nucleotide-excision repair in yeast. *Nature* **368**: 74-76.
- Webster, J.C., N.R. Pedersen, D.P. Edwards, C.A. Beck, and W.L. Miller. 1995. The 5'-flanking region of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene contains six

- progesterone response elements: three proximal elements are sufficient to increase transcription in the presence of progesterone. *Endocrinology* **136**: 1049-1058.
- Webster, N.J.G., S. Green, J.R. Jin, and P. Chambon. 1988. The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* **54**: 199-207.
- Weeda, G., R.C. van Ham, W. Vermeulen, D. Bootsma, A.J. van der Eb, and J.H. Hoeijmakers. 1990. A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell* **62**: 777-791.
- Weintraub, H. 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* **75**: 1241-1244.
- Weinzierl, R.O., B.D. Dynlacht, and R. Tjian. 1993. Largest subunit of Drosophila transcription factor IID directs assembly of a complex containing TBP and a coactivator. *Nature* **362**: 511-517.
- White, R.J., B.C. Khoo, J.A. Inostroza, D. Reinberg, and S.P. Jackson. 1994. Differential regulation of RNA polymerases I, II, and III by the TBP-binding repressor Dr1. *Science* **266**: 448-450.
- Wiebel, F.F. and J.A. Gustafsson. 1997. Heterodimeric interaction between retinoid X receptor alpha and orphan nuclear receptor OR1 reveals dimerization-induced activation as a novel mechanism of nuclear receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3977-3986.
- Wiley, S.R., R.J. Kraus, and J.E. Mertz. 1992. Functional binding of the "TATA" box binding component of transcription factor TFIID to the -30 region of TATA-less promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5814-5818.

- Wilson, C.J., D.M. Chao, A.N. Imbalzano, G.R. Schnitzler, R.E. Kingston, and R.A. Young. 1996. RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* **84**: 235-244.
- Wilson, D., G. Sheng, T. Lecuit, N. Dostatni, and C. Desplan. 1993. Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev.* **7**: 2120-2134.
- Wilson, D.S., G. Sheng, S. Jun, and C. Desplan. 1996. Conservation and diversification in homeodomain-DNA interactions: a comparative genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6886-6891.
- Wilson, T.E., A.R. Mouw, C.A. Weaver, J. Milbrandt, and K.L. Parker. 1993. The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 861-868.
- Windle, J.J., R.I. Weiner, and P.L. Mellon. 1990. Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **4**: 597-603.
- Wolberger, C., A.K. Vershon, B. Liu, A.D. Johnson, and C.O. Pabo. 1991. Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* **67**: 517-528.
- Workman, J.L. and R.E. Kingston. 1992. Nucleosome core displacement *in vitro* via a metastable transcription factor-nucleosome complex. *Science* **258**: 1780-1784.
- Wright, C.V. 1991. Vertebrate homeobox genes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 976-982.
- Wu, P. and G.V. Childs. 1991. Changes in rat pituitary POMC mRNA after exposure to cold or a novel environment, detected by *in situ* hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 843-852.
- Wu, W., J.D. Cogan, R.W. Pfaffle, J.S. Dasen, H. Frisch, S.M. O'Connell, S.E. Flynn, M.R. Brown, P.E. Mullis, J.S. Parks, J.A. Phillips, and M.G. Rosenfeld. 1998.

- Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nature Genetics* **18**: 147-149.
- Xie, X., T. Kokubo, S.L. Cohen, U.A. Mirza, A. Hoffmann, B.T. Chait, R.G. Roeder, Y. Nakatani, and S.K. Burley. 1996. Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature* **380**: 316-322.
- Xu, J., Y. Qiu, F.J. DeMayo, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and B.W. O'Malley. 1998. Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* **279**: 1922-1925.
- Xu, W., M.A. Rould, S. Jun, C. Desplan, and C.O. Pabo. 1995. Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structural basis for Pax developmental mutations. *Cell* **80**: 639-650.
- Yamada, G., A. Mansouri, M. Torres, E.T. Stuart, M. Blum, M. Schultz, E.M. De Robertis, and P. Gruss. 1995. Targeted mutation of the murine goosecoid gene results in craniofacial defects and neonatal death. *Development* **121**: 2917-2922.
- Yang, W.M., C. Inouye, Y. Zeng, D. Bearss, and E. Seto. 1996. Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12845-12850.
- Yang, X.J., V.V. Ogryzko, J. Nishikawa, B.H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**: 319-324.
- Yankulov, K.Y., M. Pandes, S. McCracken, D. Bouchard, and D.L. Bentley. 1996. TFIIH functions in regulating transcriptional elongation by RNA polymerase II in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3291-3299.
- Yarwood, N.J., J.A. Gurr, M.C. Sheppard, and J.A. Franklyn. 1993. Estradiol modulates thyroid hormone regulation of the human glycoprotein hormone alpha subunit gene. *J. Biol. Chem.* **268**: 21984-21989.

- Yeh, S. and C. Chang. 1996. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5517-5521.
- Yeung, K.C., J.A. Inostroza, F.H. Mermelstein, C. Kannabiran, and D. Reinberg. 1994. Structure-function analysis of the TBP-binding protein Dr1 reveals a mechanism for repression of class II gene transcription. *Genes Dev.* **8**: 2097-2109.
- Yoshioka, H., C. Meno, K. Koshiba, M. Sugihara, H. Itoh, Y. Ishimaru, T. Inoue, H. Ohuchi, E.V. Semina, J.C. Murray, H. Hamada, and S. Noji. 1998. *Pitx2*, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* **94**: 299-305.
- Yuryev, A., M. Patturajan, Y. Litingtung, R.V. Joshi, C. Gentile, M. Gebara, and J.L. Corden. 1996. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6975-6980.
- Zanaria, E., F. Muscatelli, B. Bardoni, T.M. Strom, S. Guioli, W. Guo, E. Lalli, C. Moser, A.P. Walker, and E.R. McCabe. 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* **372**: 635-641.
- Zawel, L. and D. Reinberg. 1995. Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. [Review] [230 refs]. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 533-561.
- Zazopoulos, E., E. Lalli, D.M. Stocco, and P. Sassone-Corsi. 1997. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* **390**: 311-315.
- Zechel, C., X.Q. Shen, J.Y. Chen, Z.P. Chen, P. Chambon, and H. Gronemeyer. 1994. The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR

- and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.* **13**: 1425-1433.
- Zeltser, L., C. Desplan, and N. Heintz. 1996. Hoxb-13: a new Hox gene in a distant region of the HOXB cluster maintains colinearity. *Development* **122**: 2475-2484.
- Zenzie-Gregory, B., A. Khachi, I.P. Garraway, and S.T. Smale. 1993. Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3841-3849.
- Zhang, H., K.M. Catron, and C. Abate-Shen. 1996. A role for the Msx-1 homeodomain in transcriptional regulation: residues in the N-terminal arm mediate TATA binding protein interaction and transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1764-1769.
- Zhou, Q., T.G. Boyer, and A.J. Berk. 1993. Factors (TAFs) required for activated transcription interact with TATA box-binding protein conserved core domain. *Genes Dev.* **7**: 180-187.
- Zhou, Q., P.M. Lieberman, T.G. Boyer, and A.J. Berk. 1992. Holo-TFIID supports transcriptional stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter. *Genes Dev.* **6**: 1964-1974.
- Zhu, A. and M.A. Kuziora. 1996. Homeodomain interaction with the beta subunit of the general transcription factor TFIIE. *J. Biol. Chem.* **271**: 20993-20996.