

Université de Montréal

Régulation transcriptionnelle du gène Niemann-Pick C1 et son rôle
dans la stéroïdogénèse

par

Nicolas Gévry

Centre de recherche en reproduction animale,
Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Pilosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option reproduction

Mars, 2003

© Nicolas Gévry, 2003



SF

607

U54

2003

v.012

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Régulation transcriptionnelle du gène Niemann-Pick C1 et son rôle
dans la stéroïdogénèse

présentée par:

Nicolas Gévry

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Jean Sirois
président-rapporteur

Bruce D. Murphy
directeur de recherche

David W. Silversides
membre du jury

Robert Viger
examineur externe

Normand Larivière
représentant du doyen de la FES

Résumé

Les ovaires, les testicules et la surrénale dépendent du cholestérol extracellulaire dérivé des lipoprotéines à faible densité (LDL) comme substrat à la stéroïdogénèse. La voie des récepteurs LDL est médiée et régulée par le niveau de cholestérol intracellulaire et par les ligands des tissus stéroïdogéniques. Après la prise des LDL, le cholestérol est libéré dans les lysosomes où il sera transporté vers les membranes cellulaires ou dans le réticulum endoplasmique. Ainsi, la distribution du cholestérol importé des récepteurs dépend de la protéine Niemann-Pick de type C1 (NPC-1). Le motif de cette étude est de déterminer les événements entourant la protéine NPC-1 dans les tissus stéroïdogéniques, d'examiner sa régulation et d'établir les conséquences de son inactivation sur les fonctions reproductives et de la surrénale.

Le but premier a été de déterminer l'implication de NPC-1 dans la stéroïdogénèse et plus particulièrement dans le processus de lutéinisation avec l'aide du modèle porcin. L'homologue porcin a été cloné et montre une grande homologie au niveau de la protéine avec le gène NPC-1 chez l'humain et la souris. Les transcrits sont détectables dans une variété de tissus, mais il y a une abondance marquée dans les tissus produisant les stéroïdes. L'expression de NPC-1 augmente aussi avec la différenciation du corps jaune *in vivo* et avec la lutéinisation des cellules de granulosa *in vitro*. La présence de sites consensus de liaison (sites CRE) pour les facteurs de réponse à l'AMPc (CREB) dans la partie proximale de la région 5' du gène NPC-1, augmente l'activité du promoteur de NPC-1 et par conséquent l'ARNm en réponse à l'AMPc. Ces résultats indiquent donc que l'implication de la voie des protéines kinases dans la régulation du gène NPC-1.

Le second objectif a été d'investiguer les mécanismes de transcription entourant la régulation du gène NPC-1 en réponse à l'AMPc. Ainsi, cette induction du promoteur NPC-1 par l'AMPc est démontrable dans trois différentes lignées cellulaires stéroïdogéniques. Il a donc été démontré par essai de mobilité électrophorétique que les sites consensus CRE étaient occupés par le facteur CREB. De plus, l'activation maximale du promoteur NPC-1 en réponse à l'AMPc est dépendante de la présence du facteur stéroïdogénique de type I (SF-1). Les essais d'immunoprécipitation de la chromatine ont démontrés une association de la région contenant les sites CRE du promoteur NPC-1 avec une acétylation et une phosphorylation des histones H-3 et que cette association était augmentée qu'après traitement à l'AMPc. Aussi, les traitements à l'AMPc

augmentent la liaison du co-facteur de liaison à CREB (CBP) avec la région proximale, laquelle possède une activité acétyl-transférase envers les histones.

Nous avons investigué les conséquences endocrine et ovarienne d'une déficience de NPC-1 dans les souris Balb/c npc^{nih-/-}. Les femelles mutantes ne démontrent aucune cyclicité oestrale et sont infertiles. L'hypophyse est hypoplastique et la sécrétion de prolactine est grandement diminuée, conséquemment à une dérégulation du ratio de la forme longue et courte de récepteur de dopamine D2. Cependant, les hormones de l'hypophyse et les récepteurs de GnRH ressemblent aux souris sauvages. À huit semaines, les ovaires et l'utérus des souris mutantes sont réduits en masse en comparaison aux souris normales. De plus, les ovaires des Balb/c npc^{nih-/-} montrent une perturbation au niveau de la croissance folliculaire, des ovocytes dégénérés et aucun corps jaune. L'expression de StAR et CYP19, des gènes clés impliqués dans la stéroïdogénèse, est remarquablement réduite. La transplantation des ovaires de souris mutantes sous la capsule rénale de souris normale rétablit l'ovulation et la formation de corps jaune. Le traitement par des gonadotrophines exogènes rétablit également l'ovulation et l'expression de CYP19 et StAR. De plus, nous avons analysé la morphologie de la glande surrénale dans les souris mutantes. Cette mutation affecte la surrénale par la réduction de l'épaisseur des différentes zones et plus particulièrement de la zone fasciculée causée par une réduction du volume des cellules et par une accumulation de lipides.

Nous concluons que la protéine NPC-1 qui est retrouvée principalement dans les tissus stéroïdogéniques corrèle avec les capacités de production des stéroïdes. Son expression est régulée par la cascade de signalment qui induit la stéroïdogénèse. L'absence de la protéine NPC-1 dérègle les mécanismes de rétroaction entre l'ovaire et l'hypophyse. Ceci a pour effet de réduire dramatiquement l'expression de la prolactine par l'hypophyse et altère la sécrétion de gonadotrophines et la production des stéroïdes par les ovaires. Ainsi, l'ensemble de ces conséquences cause l'infertilité des souris. De plus, la mutation de NPC-1 résulte en une réduction des fonctions de la surrénale. NPC-1 est donc un élément nécessaire pour une homéostasie normale du cholestérol intracellulaire et essentiel pour la stéroïdogénèse des ovaires et de la surrénale.

Mots clés: stéroïdes, cholestérol, lutéinisation, expression, promoteur, chromatine, mutation, ovaire, surrénale, hypophyse.

Abstract

The ovary, testis and adrenal cortex depend on extracellular cholesterol derived from lipoproteins for steroidogenic substrate. The low density lipoprotein (LDL) pathway is receptor-mediated and regulated both by intracellular sterol levels and by ligands in steroidogenic tissues. Following uptake, LDL cholesterol is liberated in lysosomes, and then transported to cell membranes and endoplasmic reticulum. Appropriate intracellular distribution of receptor-imported cholesterol and, perhaps de novo synthesized cholesterol depends on the Niemann-Pick C1 (NPC-1) protein. The purpose of this study was to determine the occurrence of NPC-1 protein in steroidogenic tissues, to examine its regulation and to establish the consequences of an inactivating mutation of the gene on reproductive and adrenal function.

The first goal was to demonstrate the implication of NPC-1 in the steroidogenesis and particularly during luteinization using the porcine model. The porcine homologue was cloned, and proved to have high homology at the protein level to the mouse and human NPC-1 cDNA. Transcripts were detected in a variety of pig tissues, and were in highest abundance in steroid-producing organs. NPC-1 mRNA abundance increased with the differentiation of the corpus luteum *in vivo* and with luteinization of granulosa cells *in vitro*. The presence of consensus binding sites (CRE sites) for cAMP-induced transcription factors (CREB) in the proximal 5'-flanking region of the gene, increases in transcription by the NPC-1 promoter and increases in NPC-1 mRNA abundance induced by the cAMPc indicated that the protein kinase pathway regulates NPC-1.

The second aim was to investigate the transcriptional regulation of NPC-1 by cAMP. In the first instance, cAMP induces NPC-1 promoter activity in three steroidogenic cell lines. It was further shown that by band-shift assays that recombinant CREB and nuclear extract bound to the consensus CRE sites. Maximal activation of the NPC-1 promoter by cAMP depended on the presence of a promoter sequence that bound steroidogenic factor-1 (SF-1). Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) demonstrated that the CRE region of the endogenous and transfected NPC-1 promoter associated with both acetylated and phosphorylated histone H-3, and that this association was increased by dbcAMP treatment. Treatment with dbcAMP also increased the association of the CRE region of the promoter with CREB binding protein, which has histone acetyltransferase activity.

We also investigated endocrine and ovarian consequences of NPC-1 deficiency in Balb/c npc^{nih-/-} mutant mice. Female homozygotes were smaller, display no estrous cycle and were consequently infertile. Pituitaries were hypoplastic and prolactin expression was dramatically reduced, and there was disruption in the ratio of the long and short forms of the dopamine D2 receptor. Other pituitary hormones and GnRH receptors resembled wild type mice. At eight weeks, ovarian and uterine was reduced in mutant mice relative to wild type. Mutant ovaries displayed disrupted follicles, degenerate oocytes and no corpora lutea (CL). Steroidogenic proteins, CYP19 and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) were markedly decreased. Mutant ovaries under WT kidney capsules showed ovulation and CL formation. Gonadotropin treatment also induced ovulation and restored CYP19 and StAR expression. We also investigated adrenal morphology of the mutant mouse. Adrenals of homozygous mutants were smaller in Balb/c npc^{nih-/-} mice at eight weeks. The major histological difference was reduction in the thickness of the zona fasciculata, due to decreased cell volume and lipid accumulation.

We conclude that NPC-1 protein is found in steroidogenic tissues, and its abundance correlates with steroidogenic capacity. Its expression is regulated by signaling cascades that induce steroid synthesis. The absence of NPC-1 protein disrupts pituitary-ovarian feedback mechanisms, dramatically reduces prolactin expression by the pituitary and alters both gonadotropin secretion and ovarian steroid production. The overall consequence is infertility. NPC-1 mutation results reduction of adrenal function and alters adrenal morphology. NPC-1 is therefore a necessary element of normal intracellular cholesterol homeostasis and is essential for normal steroidogenesis in the ovary and the adrenal.

Key words: steroid, cholesterol, luteinization, expression, promoter, chromatin, mutation, ovary, adrenal, pituitary.

Remerciements

J'aimerais remercier toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à ce projet de doctorat et plus particulièrement :

Je désire tout d'abord exprimer ma sincère reconnaissance et mon respect à mon directeur de thèse le docteur Bruce Murphy. Sa rigueur scientifique, son ouverture d'esprit et la confiance qu'il m'a témoignée ont su créer un environnement exceptionnel pour la réalisation et le succès de mes recherches.

À mes collègues du CRRA et en particulier ceux de mon laboratoire : Dan Lacroix, Mira Dobias, Tatiana Ruiz, Richard Bennett, Joëlle Desmarais, Sandra Ledoux, Flavia Lopez et Eric Deneault. J'aimerais vous remercier pour votre amitié et pour tout le support que vous m'avez donné.

Il est difficile de passer sous silence la contribution exceptionnelle du personnel du CRRA, Mme Odette Hélie et plus particulièrement Mme Micheline Sicotte, qui m'ont appuyé dans toutes mes démarches.

Les docteurs Jean Sirois et Alan Goff pour leur aide et leur disponibilité tout au long de mon doctorat.

Ma famille et ma chère Karine, pour leur soutien, pour leur présence dans les bons et mauvais moments et pour leur affection. Sans eux, il m'aurait été difficile de réaliser tout ce cheminement.

Enfin, j'aimerais exprimer ma gratitude aux organismes subventionnaires qui m'ont supporté financièrement tout au long de mon doctorat (IRSC et l'Université de Montréal).

TABLES DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS.....	vii
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES TABLES.....	xv
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVUE DE LITTÉRATURE.....	6
1. STÉROÏDOGÉNÈSE.....	6
1.1. Généralité.....	6
1.2. Le substrat de la stéroïdogénèse.....	6
1.3. Transport du cholestérol	8
1.4. La synthèse des stéroïdes.....	9
1.5. Mode d'action des stéroïdes.....	10
1.6. Régulation de la production des stéroïdes.....	11
1.7. La protéine StAR.....	15
2. CORPS JAUNES ET LUTÉINISATION.....	17
2.1. Généralité.....	17
2.2. Lutéinisation <i>in vivo</i>	18
2.3. Actions générales de la progestérone.....	19
2.4. Stéroïdogénèse lutéale.....	20
2.5. Transcription contrôlant la lutéinisation	22
3. LA PROTÉINE NIEMANN-PICK C1.....	29
3.1. Généralité.....	29
3.2. Transport du cholestérol	30
3.3. La maladie de Niemann-Pick de type C1.....	31
3.4. Modèle de la maladie de Niemann-Pick de type C1.....	32

3.5. La structure de la protéine NPC-1.....	33
3.6. Localisation cellulaire de NPC-1.....	34
3.7. Mécanisme d'action de NPC-1.....	34
3.8. Régulation de l'expression de NPC-1.....	36
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	37
<u>Article 1</u>	
Porcine Niemann Pick-C1 protein is expressed in steroidogenic tissues and modulated by cAMP.....	37
<u>Article 2</u>	
Regulation of Niemann-Pick C1 gene expression by the 3'5' cyclic adenosine monophosphate pathway in steroidogenic cells.....	72
<u>Article 3</u>	
Mutation of the Niemann-Pick C-1 gene disrupts pituitary and ovarian function.....	122
<u>Article 4</u>	
The role and regulation of the Niemann-Pick C1 gene in adrenal steroidogenesis.....	150
IV. DISCUSSION	172
1.1. L'implication de la protéine NPC-1 dans la stéroïdogénèse.....	173
1.2. Les mécanismes de régulation du gène NPC-1.....	174
1.3. Les souris mutées sur le gène NPC-1.....	181
1.4. Directions futures.....	188
V. CONCLUSIONS	190
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	192

LISTE DES ABRÉVIATIONS

17 β -HSD	Enzyme 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
3 β -HSD	Enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
ACAT	Acyl coenzyme A: cholestérol-acyl transférase
ACTH	Hormone adénocorticotrophique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	3',5'-monophosphate d'adénosine cyclique
AP-1	Protéine activatrice-1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
C/EBP- β	Protéine de liaison à CCAAT/amplificateur - β
CAH	Hyperplasie surrénalocorticale lipidique congénitale
CBP	Protéine de liaison à CREB
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CL	Cholestérol libre
COX-2	Cyclooxygénase-2
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
CREB	Protéine de liaison pour le CRE
CV-1	Lignée cellulaire de rein
DHEA	déhydroépiandrostérone
EC	Esters de cholestérol
FSH	Hormone Folliculo-stimulante
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HDL	Lipoprotéines à haute densité
HDLr	Récepteurs de lipoprotéines à haute densité
HMG-CoA	Coenzyme A 3-hydroxy-3-methylglutaryl
KDa	Kilo Daltons
LAMP-2	Protéine membranaire associée aux lysosomes
LDL	Lipoprotéines à faible densité
LDLr	Récepteur de lipoprotéines à faible densité
LH	Hormone lutéinisante

MA-10	Lignée cellulaire tumorale de Leydig
MAPK	Kinase mitogène activée
MT	Mutant
NPC-1	Niemann-Pick de type C1
P450arom	Enzyme cytochrome P450 aromatasase
P450scc	Enzyme cytochrome P450 coupant la chaîne latérale
PBR	Récepteur périphérique de la benzodiazépine
PKA	Protéine kinase A dépendante de l'AMPc
SAP	Peptide activateur de la stéroïdogénèse
SCAP	Protéine de clivage activée par les stérols
SCP-2	Protéine de transport des stérols de type 2
SF-1	Facteur stéroïdogénique de type 1
SR-B1	Récepteur piègeur de type 1
SREBP	Protéines de liaison aux éléments de réponse aux stérols
StAR	Enzyme de régulation rapide de la stéroïdogénèse
SVG40	Lignée cellulaire tumorale de granulosa humaine
WT	Sauvage
Y1	Lignée cellulaire tumorale de la surrénale

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Les voies de biosynthèse des stéroïdes..... 12

Article 1

Figure 1. Comparison of the 5'-flanking regions of the human and pig NPC-1 gene sequences..... 63

Figure 2. Northern analysis of the distribution of the NPC-1 transcripts in various porcine tissues, including those that synthesize steroid hormones..... 65

Figure 3. A. Northern analysis of NPC-1 abundance in 15 µg total RNA extracted from corpora lutea recovered from pigs at different stages of the estrous cycle. B. Transcript abundance was determined in 15 µg total RNA purified from granulosa cells from 3- to 5-mm porcine follicles and cultured for 0–96 h, during which time they underwent luteinization..... 67

Figure 4. Immunolocalization of NPC-1 in pig tissues..... 69

Figure 5. Immunolocalization of NPC-1 in porcine granulosa cells undergoing luteinization *in vitro*..... 71

Figure 6. Representative Northern blot demonstrating the effects of a transcriptional blocker, Actinomycin-D (ACT-D) and a translational inhibitor, cycloheximide (CHX) on the abundance of the 5.0 Kb NPC-1 transcript in luteinized porcine granulosa cells..... 73

Figure 7. A. Northern blot representing six replicates of an experiment in which porcine granulosa cells cultured for 96 h were treated with 300 µM (Bu)₂cAMP for an additional 24 h. B. Mean ± SEM luciferase activity in three steroidogenic cell lines (mouse Leydig tumor MA-10, mouse adrenal Y1, and human granulosa, designated SVG40) in three independent experiments for each..... 75

Article 2

Figure 1. A. Treatment of Y-1 cells transfected with a plasmid constitutively expressing cAMP response element binding protein (CREB) with 1 mM

dibutryl cAMP (dbcAMP) increases NPC-1 promoter activity. B. The combination of dbcAMP and CREB increases NPC-1 promoter activity.....	104
Figure 2. A. Protein kinase A (PKA) and CREB interact to increase NPC-1 promoter activity. B. The protein kinase A inhibitor H-89 attenuates NPC-1 promoter activity in response to dbcAMP. C. The response of the NPC-1 promoter is reduced in response to cAMP in the PKA deficient cell line Y-1 Kin 8.....	106
Figure 3. Deletion constructs of the NPC-1 promoter and the CREB-cAMP response.....	108
Figure 4. Electromobility shift assays (EMSA) demonstrate the authenticity of CRE sites in the NPC-1 promoter.....	110
Figure 5. Super shift EMSA showing specificity of CREB complex formation with nuclear extract from Y-1 cells.....	112
Figure 6. Mutation of both CRE eliminates the response to CREB and cAMP.....	114
Figure 7. The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 (SF-1) interacts with CREB in induction of NPC-1 promoter activity.....	116
Figure 8. Mutation of CRE or SF-1 sites in the 1.8 kb NPC-1 promoter abrogates SF-1 + dbcAMP induction of transcription.....	118
Figure 9. Chromatin modification is associated with cAMP induction of NPC-1 expression.....	120

Article 3

Figure 1. Gross morphology of the Balb/c <i>npc^{nih}/-</i> mouse.....	138
Figure 2. Ovarian, uterine and adrenal morphology of the Balb/c <i>npc^{nih}/-</i> and WT mice.....	140
Figure 3. Restoration of ovulation in Balb/c <i>npc^{nih}/-</i> mice by exogenous gonadotropins and by transplantation of ovaries to the kidney capsule of ovariectomized WT mice.....	142
Figure 4. The Balb/c <i>npc^{nih}/-</i> mouse has pituitary hypoplasia and reduction in acidophilic cells.....	144

Figure 5. Comparison of the frequency of pituitary cells that are immunopositive for each of the six pituitary hormones, LH, FSH, prolactin, ACTH, GH, and FSH.....	146
Figure 6. Semiquantitative PCR demonstrating expression of pituitary hormones and pituitary gland receptors in WT and Balb/c <i>npc^{nih-/-}</i> mutant mice.....	148

Article 4

Figure 1. Photomicrographs of the adrenals of wild type (+/+) and NPC-1 mutant (-/-) mice.....	162
Figure 2. Lipids in wild type (+/+) and mice bearing an inactivating mutation of the NPC-1 gene (-/-).....	164
Figure 3. Comparison of the proximal fragment of the mouse NPC-1 5'-flanking region with corresponding regions of the pig and human NPC-1 promoters.....	166
Figure 4. Activity of the 2.2 kb mouse NPC-1 promoter-luciferase construct in mouse adrenal Y-1 tumor cells, mouse MA-10 Leydig tumor cells and monkey kidney CV-1 cells.....	168
Figure 5. Additive effects of cAMP response element binding protein and cAMP on transactivation of the mouse NPC-1 gene in mouse adrenal Y-1 cells, as revealed by transient transfection assays.....	170

Discussion

Figure 1. Les trois différentes sources d'apport du cholestérol libre dans les cellules stéroïdogéniques.....	175
Figure 2. Modèle d'activation du promoteur NPC-1 par la voie de l'AMPc-PKA.....	182

LISTE DES TABLES

Article 1

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers employed in amplification of porcine NPC-1.....	60
Table 2. Homology between domains of the deduced amino acid sequences of known sequences of the Niemann-Pick C-1 protein.....	61

Article 2

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers employed in electromobility shift assays.....	103
---	-----

I. INTRODUCTION

Le succès de la gestation dans la plupart des espèces est sans aucun doute permis avec l'établissement et le maintien du corps jaune. La survie de l'embryon dépend du succès de la lutéinisation. Cet organe transitoire, formé à partir du follicule après l'ovulation, sécrète la progestérone qui est nécessaire à la création d'un environnement hospitalier pour la survie de l'embryon. Une déficience maternelle dans la production de progestérone est impliquée dans environ 30 à 50% de la mortalité embryonnaire avant l'implantation (Barnes, 2000).

Avant le processus de l'ovulation, les cellules de la granulosa participent à la stéroïdogénèse par l'aromatisation des androgènes provenant des cellules de la thèque en estrogène sous l'influence de la FSH. Cependant, après l'ovulation induite par le pic préovulatoire de LH, le processus de lutéinisation engendre un changement de la synthèse de l'estrogène vers la synthèse de progestérone (Robker & Richards, 1998). Un des changements importants est l'acquisition des cellules lutéales qui ont la capacité d'utiliser le cholestérol au lieu des androgènes comme source de substrat pour la production de la progestérone (Murphy, 2000). Ce changement dépend de l'expression des éléments qui apportent le cholestérol vers le site d'initiation de la synthèse de progestérone.

Les hormones lutéotrophiques sont celles qui supportent la croissance et/ou les fonctions du corps jaune (Devoto *et al.*, 2002). Durant la phase lutéale, l'habileté à sécréter la progestérone ainsi que la taille du corps jaune augmentent. Une fois que le corps jaune atteint sa taille mature et son potentiel maximal pour la sécrétion de la progestérone et dépendant de

l'espèce, les fonctions lutéales sont maintenues pour une période allant de quelques journées à plusieurs journées.

La concentration de progestérone dans le sérum est donc dépendante de la quantité de tissus stéroïdogéniques, de la circulation sanguine et de la capacité des tissus stéroïdogéniques à produire la progestérone. La quantité de tissus stéroïdogéniques est dépendante du nombre et de la grosseur des cellules stéroïdogéniques lesquels augmentent durant le développement lutéal (Niswender *et al.*, 2000). La circulation sanguine autour du corps jaune augmente au même type que la concentration de progestérone dans le sérum (Niswender *et al.*, 2000). Finalement, la capacité des cellules stéroïdogéniques à produire une augmentation de la concentration de la progestérone dans le sérum est sous l'emprise des changements associés à l'expression encodante pour des ARNm responsables de la régulation lutéale et de la voie stéroïdogénique (Niswender *et al.*, 2000). Par exemple, l'expression de protéines clés comme les récepteurs de lipoprotéines à faible densité (LDL) et à haute densité (HDL) ainsi que les récepteurs de l'hormone lutéinisante (LH), s'avère essentielle à la régulation et au maintien de l'augmentation de la prise en cholestérol nécessaire à la production de la progestérone (Devoto *et al.*, 2002; LaVoie *et al.*, 1997).

Le cholestérol est un important composé structural de la membrane cellulaire. Il sert aussi comme précurseur de la synthèse des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et dans la régulation des oxystérols. La production de cette molécule est contrôlée en partie par la distribution du substrat hydrophobique du cholestérol vers le site de biosynthèse et par l'importation du cholestérol des lipoprotéines (Strauss *et al.*, 2002). Les deux principaux sites d'importation du cholestérol extracellulaire sont faits

via les LDL et HDL qui possèdent leur propre récepteur à la surface de la membrane plasmique (Murphy & Silavin, 1989). Depuis quelques années, il est maintenant plus clair que le cholestérol possède un rôle élargi dans la signalisation cellulaire et dans le métabolisme.

Les cellules stéroïdogéniques sont d'excellents modèles pour étudier le transport du cholestérol intracellulaire dû au besoin de déplacer le cholestérol vers les mitochondries où la synthèse des stéroïdes est initiée. Le cholestérol provenant des différentes sources doit être transporté vers les mitochondries pour participer à la première étape de la stéroïdogénèse (Jefcoate, 1992). Le cholestérol est transloqué de la membrane externe vers la membrane interne des mitochondries, où se situe le complexe enzymatique responsable de la production de la prégnénolone. Cette étape est gouvernée par l'enzyme de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR) (Stocco & Clark, 1996a). L'itinéraire suivi par le cholestérol originant des différentes sources qui est finalement mené à la mitochondrie, n'est donc pas complètement tracé. Par conséquent, il n'est pas connu si le cholestérol passe par une station centrale de triage avant d'atteindre les mitochondries ou s'il voyage dans des voies bien spécifiques.

Le cholestérol dérivé des LDL est la principale source de cholestérol pour la synthèse des hormones dans les cellules stéroïdogéniques de la plupart des espèces de mammifères (Gwynne & Strauss, 1982). De plus, les mécanismes et les voies entrant en jeu dans l'internalisation des récepteurs LDL et de l'hydrolyse du cholestérol dans les lysosomes ont été bien documentés à ce jour (Golos *et al.*, 1985; Soto *et al.*, 1984). Toutefois, la manière dont le cholestérol des récepteurs LDL se dirige dans le pool du substrat de la stéroïdogénèse et la relation du cholestérol vers les autres compartiments cellulaires demeurent encore incomprises.

La récente découverte du gène muté responsable de la maladie de Niemann-Pick de type C1 a donné d'importantes informations sur le transport du cholestérol intracellulaire (Carstea *et al.*, 1997). Une des caractéristiques les plus marquées de la maladie de Niemann-Pick de type C1 est le retardement de l'efflux du cholestérol dans les lysosomes (Pentchev *et al.*, 1994; Vanier *et al.*, 1991). La cause de cette maladie est le gène NPC-1 qui code pour une glycoprotéine membranaire avec un domaine de senseur au cholestérol (Davies & Ioannou, 2000). Sur la base du phénotype cellulaire de la maladie, il est clair que cette protéine joue un rôle critique dans le mouvement du cholestérol libre du système lysosomes/endosomes (Ory, 2000). Toutefois, peu ont étudié son importance et son implication dans les cellules stéroïdogéniques. Roff *et al.* ont démontré chez les souris dont le gène NPC-1 était inactivé, que la production de testostérone dans les cellules de Leydig était compromise (Roff *et al.*, 1993). Les résultats obtenus indiquent le rôle possible de NPC-1 dans le transport du cholestérol vers le pool stéroïdogénique.

Les propos de ce recueil permettent de mieux comprendre l'implication et la régulation du gène NPC-1 pendant la stéroïdogénèse et plus particulièrement pendant le processus de lutéinisation. L'hypothèse générale de ce travail est que la modulation de l'apport en cholestérol intracellulaire régule la différenciation des cellules ovariennes (thèque et granulosa), c'est-à-dire que l'augmentation du transport du cholestérol et de son utilisation n'est pas seulement une conséquence, mais aussi une cause de la lutéinisation. La voie de transport du cholestérol empruntée par la protéine NPC-1 s'avère sans aucun doute un choix judicieux pour une molécule charnière entre l'entrée du cholestérol et sa distribution ordonnée dans les cellules. Ainsi, les objectifs visés par cette étude vont permettre

d'approfondir les différents aspects de la régulation et du rôle joué par cette protéine charnière.

Les premiers objectifs de cette démarche expérimentale correspondants à l'article 1 sont : l'établissement de la présence d'une séquence homologue dans le modèle porcin; l'investigation de l'expression de NPC-1 durant la différenciation lutéale et; la détermination de l'effet du 3',5'-monophosphate d'adénosine cyclique (AMPC) comme second messager dans la modulation de NPC-1 dans les cellules stéroïdogéniques.

Deuxièmement, l'article 2 a pour but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la régulation de NPC-1 en réponse au second messager des hormones peptidiques, d'identifier les facteurs de transcription dépendant de l'AMPC entrant dans l'activation du promoteur NPC-1 et de démontrer les modifications épigénétiques engendrées par cette activation.

Troisièmement, les article 3 et 4 tentent de démontrer le rôle de la protéine NPC-1 dans la stéroïdogénèse avec l'aide de souris montrant une mutation sur le gène NPC-1 et d'élucider les implications de la maladie de Niemann-Pick de type C1 dans les ovaires de souris et dans la glande surrénale.

II. REVUE DE LITTÉRATURE

1. LA STÉROÏDOGÉNÈSE

1.1. Généralité

La stéroïdogénèse est un processus par lequel des cellules distinctes dans des tissus spécialisés synthétisent des hormones stéroïdiennes. Par exemple, la surrénale sécrète les glucocorticoïdes qui sont importants dans la régulation du métabolisme des carbohydrates et dans la réponse au stress, et de plus, elle sécrète les minéralocorticoïdes qui régulent la balance en sel et le maintien de la pression sanguine. Il y a aussi les organes reproducteurs comme les ovaires et les testicules qui ont la capacité de produire et de sécréter des stéroïdes. Les stéroïdes comme la progestérone et les oestrogènes du système ovarien et placentaire régulent les fonctions reproductives et les caractéristiques secondaires sexuelles chez les femelles, tandis que les androgènes des testicules sont essentiels pour la fertilité et les caractéristiques des mâles. Ainsi, cette énumération préliminaire des rôles joués par les stéroïdes nous conscientisent bien à leur importance chez tout être vivant.

1.2. Le substrat de la stéroïdogénèse

Sous des conditions normales, la majorité du cholestérol est synthétisée à partir du foie (Krisans, 1996) et transportée vers les tissus stéroïdogéniques comme la surrénale, les ovaires (follicule et corps jaune) et les testicules sous forme de lipoprotéines. La plupart des espèces peuvent utiliser le cholestérol dérivé des lipoprotéines à basse densité (LDL) et/ou à haute densité (HDL) comme source de substrat commune pour la synthèse des stéroïdes dans les tissus stéroïdogéniques (Hwang & Menon, 1983; Ohashi, Carr & Simpson, 1982; Pate & Condon, 1982). Cependant, il existe certaines différences entre les espèces quant à la préférence entre les LDL et

les HDL, mais les deux sources peuvent être utilisées par les cellules lutéales pour la plupart des espèces. Par exemple, chez les rongeurs la plus grande contribution en cholestérol pour la synthèse des stéroïdes provient principalement des HDL (Murphy & Silavin, 1989). De plus, sous des conditions de privation de lipides (réduction de synthèse de lipoprotéines ou par des conditions spéciales *in vitro*), les cellules stéroïdogéniques sont capable de synthétiser leur propre cholestérol intracellulaire par l'action de la coenzyme A 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG-CoA)(Cook *et al.*, 1967; Cook & Nalbandov, 1968; Kaltenbach *et al.*, 1968; LaVoie *et al.*, 1997).

L'augmentation de la prise de LDL par les cellules stéroïdogéniques se produit par endocytose de ses récepteurs (LDLr) à la membrane plasmique (Brown & Goldstein, 1986). Chaque molécule de LDL renferme environ 2500 molécules de cholestérol, ce qui en fait une voie efficace. Une fois internalisés, les endosomes se combinent avec les lysosomes où les LDL sont dissociées de leurs récepteurs et dégradés pour former du cholestérol qui est accessible pour la cellule. Finalement, les récepteurs sont recyclés ou dégradés (Grummer & Carroll, 1988). Les récepteurs à HDL (SR-BI pour "scavenger receptor the class B, type I") facilitent aussi la prise cellulaire du cholestérol provenant des HDL (Azhar *et al.*, 1998). Cependant, le mécanisme de libération du cholestérol qui suit la liaison à ses récepteurs diffère des LDLr. Comme mentionné précédemment, les LDLr par leur internalisation de particules de LDL intact et par endocytose vont libérer le cholestérol par l'hydrolyse des lipoprotéines dans les lysosomes (Goldstein *et al.*, 1985). Les SR-BI vont favoriser la prise sélective des esters de cholestérol par un transfert efficace de ce cholestérol à la membrane et non par une séquence d'internalisation authentique des lipoprotéines (Acton *et al.*, 1996; Krieger, 1999).

Une fois que le cholestérol libre est présent dans le cytosol de la cellule, il peut être utilisé pour la stéroïdogénèse ou pour la formation des membranes cellulaires, ou il peut être estérifié avec les acides gras pour former les esters de cholestérol et être finalement emmagasiné (Johnson, Phillips & Rothblat, 1997). Les esters de cholestérol sont souvent sous forme de gouttelettes lipidiques, une caractéristique morphologique des cellules stéroïdogéniques. Selon la demande, l'estérase peut hydrolyser les esters de cholestérol emmagasinés et fournir du cholestérol pouvant être utilisé par la cellule (Johnson *et al.*, 1997).

1.3. Transport du cholestérol

La synthèse des stéroïdes est dépendante du transport du cholestérol vers les mitochondries ainsi que du transfert du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne où se situe le complexe de l'enzyme cytochrome P450 coupant la chaîne latérale (P450_{scc}) (Tuckey, 1992; Tuckey & Atkinson, 1989). La première étape du transport du cholestérol vers la membrane externe de la mitochondrie demande un cytosquelette cellulaire intact. Ceci a été démontré par l'utilisation d'inhibiteurs de microtubules et de microfilaments qui empêchaient l'accumulation de cholestérol dans les mitochondries (Crivello & Jefcoate, 1978). Ainsi la phosphorylation des protéines du cytosquelette semble influencer le niveau de production des stéroïdes. De plus, des protéines de liaison au stérol semblent jouer un rôle dans le transport du cholestérol vers les mitochondries (Scallen *et al.*, 1985). La stimulation de la stéroïdogénèse par les hormones trophiques augmente le transport du cholestérol vers les mitochondries (Stocco, 2001a). Cependant la complexité du processus ne peut s'expliquer par la simple diffusion du cholestérol dans le cytoplasme.

1.4. La synthèse des stéroïdes

Toutes les hormones stéroïdiennes sont dérivées du cholestérol et partagent la même structure à quatre anneaux. Toutefois, la forme de chaque stéroïde diffère légèrement, car différents groupements chimiques latéraux sont fixés à divers sites sur les anneaux. Cette différence dans les groupements permet une surprenante gamme de fonctions. Les stéroïdes peuvent être groupés sur la base de leur structure et peuvent aussi être groupés selon leur fonction. Typiquement, la classification des hormones stéroïdiennes se fait en cinq groupes de molécules: les androgènes, les oestrogènes, les progestatifs, les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes.

La biosynthèse des hormones stéroïdiennes requiert une batterie d'enzymes oxydatives localisées dans les mitochondries et dans le réticulum endoplasmique. Les hormones stéroïdiennes ont diverses fonctions, mais leur voie de biosynthèse est identique dans les premiers stages de leur synthèse (Miller, 1988). Dans tous les tissus stéroïdogéniques, l'étape initiale est la conversion du cholestérol en prégnénolone. Cette conversion a lieu grâce à l'action du complexe enzymatique P450_{scc}, localisé dans la membrane interne des mitochondries des cellules stéroïdogéniques (Farkash, Timberg & Orly, 1986). Par la suite, la prégnénolone est convertie en progestérone par l'enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) dans les microsomes. Dans certaines cellules stéroïdogéniques, une forme mitochondriale de la 3 β -HSD peut convertir le prégnénolone en progestérone directement dans les mitochondries (Cherradi, Defaye & Chambaz, 1994; Cherradi *et al.*, 1997). Cependant, dans la plupart des espèces et des tissus stéroïdogéniques, la prégnénolone est convertie en progestérone dans les microsomes et puis en une variété de stéroïdes. Le produit final est le résultat du complément des enzymes présents dans ces tissus (Miller, 1998). Par exemple, les cellules de la zone glomérulée de la

surrénale synthétisent et sécrètent les minéralocorticoïdes, comme l'aldostérone, et les cellules de la zone fasciculée synthétisent et sécrètent les glucocorticoïdes comme le cortisol et la corticostérone (Binkley, 1995). De même, les cellules de la thèque ovarienne synthétisent et sécrètent les androgènes, et sont suivies par les cellules de granulosa qui s'occupent de convertir les androgènes en oestradiol. Il y a aussi le corps jaune de l'ovaire et le syncytiotrophoblaste du placenta qui synthétisent et sécrètent la progestérone et les cellules de Leydig des testicules qui synthétisent et sécrètent la testostérone. Un autre aspect à ajouter, est la synthèse des neurostéroïdes par certaines régions spécialisées du cerveau comme la prégnénolone, la progestérone, 5 α -dihydroprogestérone, l'alloprégnénolone et le déhydroépiandrostérone (DHEA)(Baulieu, 1997). La figure 1 sur les voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes nous démontre les enzymes majeurs intervenants dans les différentes voies.

La compréhension des enzymes intervenants dans la stéroïdogénèse et, plus important, leur localisation intracellulaire nous permet de mieux comprendre comment la synthèse des hormones stéroïdiennes est régulée.

1.5. Mode d'action des stéroïdes

Les effets des stéroïdes sont généralement transmis par leur interaction avec des récepteurs intracellulaires spécifiques qui sont membres de la grande famille des récepteurs nucléaires (Giguere, Tremblay & Tremblay, 1998). La liaison des stéroïdes à leur récepteur respectif entraîne un changement de conformation de la structure du récepteur, ce qui mène à la dimérisation des récepteurs, à des modifications post-transcriptionnelles et à la liaison d'éléments amplificateurs spécifiques aux promoteurs des gènes visés. Ces changements permettent le recrutement de protéines de co-régulation qui interagissent avec la machinerie de

transcription générale et qui finalement induisent la transcription des gènes stéroïdes-dépendant (McKenna *et al.*, 1999). Cependant, les récepteurs stéroïdiens peuvent être activés en absence de ligand par la voie phosphorylation qui module leur interaction avec d'autres protéines de régulation. L'habileté des récepteurs stéroïdiens d'interagir avec une variété de protéines co-activatrices et co-répresseurs conjuguées ayant une expression spatio-temporelle pour chacun, illustre le rôle clé des co-régulateurs dans la médiation de la réponse spécifique aux stéroïdes dans les différents tissus (Hall, Couse & Korach, 2001).

1.6. Régulation de la production des stéroïdes

La production de stéroïdes par les tissus comme la surrénale, le placenta et les gonades est unique dans le sens qu'elle requiert du cholestérol non seulement pour la biogénèse de la membrane, mais aussi comme précurseur pour la synthèse des hormones stéroïdiennes (Gwynne & Strauss, 1982; Stocco & Clark, 1996a). Ces tissus sont formés d'enzymes qui catalysent les réactions menant à la synthèse des stéroïdes provenant du cholestérol (Hall, 1984; Hanukoglu, 1992).

Les hormones peptidiques spécifiques aux tissus contrôlent le niveau de la stéroïdogénèse. Par exemple, l'hormone adénocorticotrophique (ACTH) augmente la synthèse de glucocorticoïdes dans la zone fasciculée de la surrénale; l'ACTH ou l'angiotensine II augmente la synthèse de minéralocorticoïdes dans la zone glomérulée de la surrénale; la gonadotrophine chorionique (CG)/hormone lutéinisante (LH) augmente la synthèse de progestérone dans les cellules du corps jaunes; l'hormone stimulant les follicules (FSH) augmente la production de progestérone dans les cellules de granulosa; et la LH augmente la synthèse de testostérone dans les cellules de Leydig (Cooke, 1999; Waterman & Keeney, 1996).

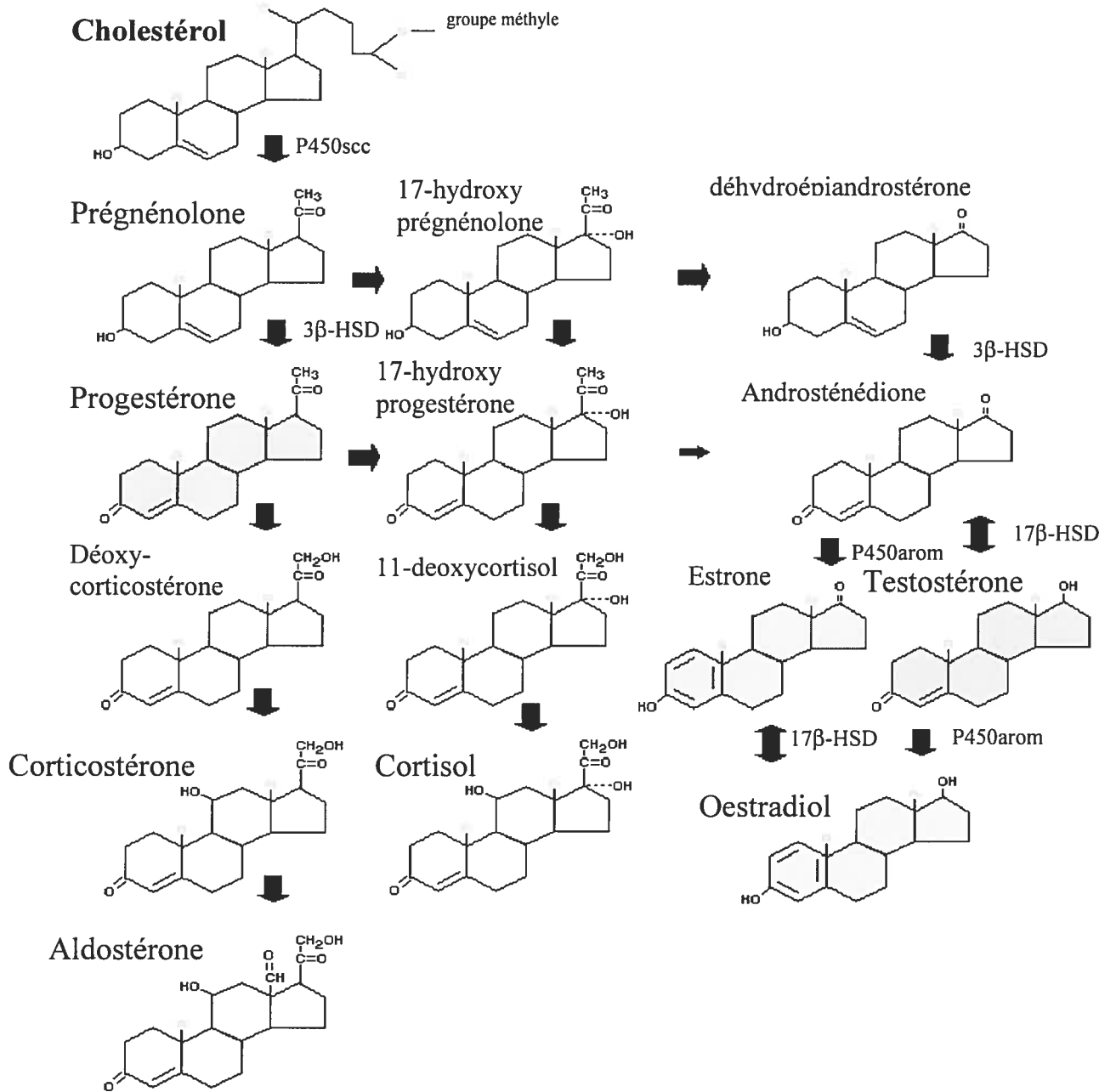


Figure 1. Les voies de biosynthèse des stéroïdes. Le diagramme montre les principales voies et les enzymes impliqués dans la synthèse des stéroïdes à partir du cholestérol. 3 β -HSD, enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase; 17 β -HSD, enzyme 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase; P450arom, enzyme cytochrome P450 aromatase; P450scc, enzyme cytochrome P450 coupant la chaîne latérale;

Dans tous les tissus en réponse aux hormones peptidiques, la régulation de la production des stéroïdes apparaît en deux phases distinctes : soit la réponse aiguë et la réponse chronique. La production aiguë d'hormones stéroïdiennes en réponse aux hormones trophiques est contrôlée par le niveau d'apport du cholestérol à la membrane interne des mitochondries où se situe l'enzyme P450_{scc} (Azhar *et al.*, 1998). L'ACTH et les gonadotrophines stimulent la cascade de signalements de la protéine kinase A dépendante de la 3',5'-monophosphate d'adénosine cyclique (PKA; AMPc) qui active les deux étapes du transfert du cholestérol. Dans la première étape de la réponse aiguë, l'enzyme estérase (activée par la phosphorylation) hydrolyse les esters de cholestérol en cholestérol libre qui peut être envoyé à la membrane externe des mitochondries. Ce processus demande un cytosquelette intact (Feuilloley & Vaudry, 1996; Hall, 1995; Pederson, 1988; Stocco & Clark, 1996b; Thomson, 1998), mais aussi a lieu grâce à l'apport de la protéine de transport des stérols de type 2 (SCP-2) (Gallegos *et al.*, 2001; Jefcoate, 1992; Stocco & Clark, 1996a; Stocco & Clark, 1996b), le peptide activateur de la stéroïdogénèse (SAP) (Jefcoate, 1992; Stocco & Clark, 1996a; Stocco & Clark, 1996b) et du récepteur périphérique de la benzodiazépine (PBR) (Brown & Papadopoulos, 2001; Papadopoulos, 1998; Stocco & Clark, 1996a; Stocco & Clark, 1996b).

La seconde étape nécessite des hormone trophiques qui stimulent le transfert du cholestérol de la membrane externe de la mitochondrie vers la membrane interne (Liscum & Dahl, 1992; Stocco, 2000). Cette étape est considérée limitative dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (Christenson & Strauss, 2000; Stocco, 2001a). Cette protéine de réponse aux hormones et de liaison au cholestérol est appelée protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR) et joue un rôle de pivot dans la médiation de cette étape (Christenson & Strauss, 2000; Petrescu *et al.*, 2001;

Stocco, 2001a; Stocco, 2001b). Finalement, il y a aussi une régulation chronique au niveau de la transcription des gènes qui mène à la production des enzymes stéroïdogéniques et qui augmente la capacité de synthèse de ces cellules (Miller, 1998; Parker & Schimmer, 1995).

1.7. La protéine StAR

L'étape limitative dans la stéroïdogénèse semble être le transport du cholestérol de la membrane externe des mitochondries vers la membrane interne (Stevens, Xu & Lambeth, 1993). Cette étape est le site primaire de la régulation positive ou négative de la stéroïdogénèse par le système du second messenger (Simpson & Waterman, 1983). Depuis maintenant trois décennies, il est connu que la stimulation via les hormones trophiques requiert la synthèse d'une protéine à courte vie. La découverte de deux protéines de poids similaire (environ 30 KDa), et dont la synthèse était associée avec l'augmentation de la production des stéroïdes dans plusieurs tissus après une stimulation hormonale (Krueger & Orme-Johnson, 1983; Pon, Epstein & Orme-Johnson, 1986a; Pon, Hartigan & Orme-Johnson, 1986b; Stocco & Chaudhary, 1990; Stocco & Chen, 1991), apporta une réponse clé au niveau de la production des stéroïdes. Ces protéines, localisées dans les mitochondries, consistent en plusieurs formes d'une protéine nouvellement synthétisée. La protéine mitochondriale de 30 KDa est le résultat d'une modification post-transcriptionnelle de la protéine précurseur de 37 KDa qui contient en N-terminal une séquence de localisation mitochondriale (Epstein & Orme-Johnson, 1991; Stocco & Sodeman, 1991). StAR est donc clivée sur la forme d'une protéine de 30 KDa durant son insertion dans la membrane mitochondriale (Epstein & Orme-Johnson, 1991; Stocco & Sodeman, 1991). C'est ainsi durant l'insertion de StAR dans la membrane que le cholestérol est transporté vers

le complexe enzymatique P450scc qui est responsable de la production de la prégnénone (Waterman, 1995).

Cependant le rôle critique de StAR dans la stéroïdogénèse a été démontré par la présence de mutation du gène StAR qui cause une hyperplasie surrénalocorticale lipidique congénitale (CAH)(Lin *et al.*, 1995). Le CAH est une condition létale caractérisée par une incapacité pour le nouveau-né de synthétiser des stéroïdes, par un élargissement de la glande surrénale contenant un haut niveau de cholestérol et par la présence d'une grande quantité de lipides dans les cellules de Leydig (Lin *et al.*, 1995). À première vue, les gens pensaient que cette maladie était le résultat d'une mutation du gène de l'enzyme P450scc (Degenhart *et al.*, 1972; Shimizu *et al.*, 1961), mais par la suite ils ont dû se rendre à l'évidence que seule la mutation du gène StAR était la cause de cette maladie (Miller, 1997). D'autres études faites par l'équipe de Parker qui ont muté le gène StAR chez les souris ont corroborées son implication dans la stéroïdogénèse (Lin *et al.*, 1991). Toutes les souris mutantes pour StAR ont une apparence féminisée du système génital externe, ne croissent pas normalement et meurent prématurément dû à une insuffisance du cortex de la surrénale. Le niveau de corticostérone et d'aldostérone dans le sérum est diminué et le niveau d'ACTH et de CRH est élevé indiquant un manque dans la production des stéroïdes interférant avec la régulation de la rétroaction de l'axe hypophyse-hypophyse. La médulla de la surrénale est normale, mais la zone fasciculée contient un haut niveau de dépôt de lipides. Les testicules des nouveaux-nés contiennent quelques dépôts de lipides dans la région interstitielle. Cependant à huit semaines, il y a une accumulation considérable de la déposition de lipides interstitiels qui est associée avec une hyperplasie des cellules de Leydig (Hasegawa *et al.*, 2000). Le même patron se retrouve au niveau des ovaires. À la naissance, les ovaires semblent normaux, mais après la puberté les ovaires montrent une accumulation de dépôt de lipides dans la région interstitielle

accompagnée par une lutéinisation marquée des cellules du stroma et une maturation folliculaire incomplète qui amènent une défaillance prématurée de l'ovaire.

2. CORPS JAUNE ET LUTÉINISATION

2.1. Généralité

Le corps jaune a été nommé pour la toute première fois par Marcello Malpighi vers la fin de l'année 1600 et la première description détaillée a été faite par Regnier De Graff dans les années 1650. Ce dernier avait noté qu'après le coït, des corps globulaires apparaissaient sur les ovaires de lapins et persistaient jusqu'à la fin de la parturition. De Graff avait aussi observé que le nombre de corps jaunes était relié avec le nombre de naissances. Pour sa part, Prenant, après examen histologique du corps jaune, donna comme hypothèse que ce corps pouvait produire une substance intervenant dans la régulation de la grossesse (Prenant, 1898). À partir de là, il n'y avait aucun doute, le corps jaune pouvait fonctionner comme une glande. Subséquemment, ces conclusions ont été confirmées par l'ablation des ovaires ou des corps jaune de lapins en grossesse, ce qui provoqua la résorption et l'avortement de l'embryon (Fraenkel, 1903; Fraenkel & Cohn, 1901; Magnus, 1901). Après ces expériences, Magnus suggéra le traitement de lapins castrés avec des extraits lutéaux pour permettre l'étude du facteur biologique produit par le corps jaune (Magnus, 1901). Finalement, après toutes ces expériences, le facteur lutéal a été crystallographié et caractérisé par quatre groupes de chercheurs indépendants (Allen & Wintersteiner, 1934; Butenandt, Westphal & Cobler, 1934; Hartmann & Wettstein, 1934; Slotka, Rushig & Fels, 1934). Ce facteur, faisant partie des hormones stéroïdiennes, a été nommé la progestérone.

2.2. Lutéinisation *in vivo*

La lutéinisation apparaît par la transition structurale et fonctionnelle du follicule ovarien en corps jaunes qui apparaissent après l'ovulation. Ce processus de lutéinisation est associé avec un dramatique remodelage de l'ovaire tant au niveau cellulaire qu'au niveau des tissus. Le principal changement endocrinien qui accompagne la lutéinisation est la conversion de l'ovaire de la production de l'oestradiol pendant la phase folliculaire (phase proliférative) vers la production de la progestérone durant la phase lutéale (Robker & Richards, 1998). La lutéinisation est la dernière phase de la différenciation des cellules somatiques de l'ovaire. Ce changement est une marque chez les mammifères, il est essentiel pour la survie de l'embryon (surtout pour le début), pour son implantation et finalement pour la viviparité (Murphy, 2000).

L'évolution des mammifères a apporté des variations au niveau du processus de lutéinisation à travers les espèces. La rupture et l'effondrement du follicule au moment de l'ovulation et l'invasion d'éléments extra-folliculaires (vaisseaux sanguins, cellules thécales et les composés réticulo-endothéliales) représentent un processus commun aux espèces (Murphy, 2000). Cependant, un élément contrastant chez les canidés, l'invasion folliculaire est initiée les jours avant l'ovulation avec une différenciation consécutive de la thèque et des cellules de granulosa pour engager la sécrétion de la progestérone (Concannon, Hansel & McEntee, 1977).

Il est possible de recréer la lutéinisation *in vitro* par la culture de cellules de granulosa ou de la thèque sous certaines conditions de cultures. La principale caractéristique engendrée par ces conditions est le changement de la production d'oestradiol par la synthèse de progestérone

(Meidan *et al.*, 1990). Les deux types cellulaires démontrent une altération de leur morphologie en comparaison du moment de leur mise en culture. Leur volume est augmenté d'environ deux à trois fois et présente un changement cellulaire du phénotype fibroblastique vers le phénotype épithéliale (Campbell, Baird & Webb, 1998; Demeter-Arlotto, Rainey & Simpson, 1993; Ohleth & Bagnell, 1999; Roberts & Skinner, 1990). De plus, pendant la lutéinisation *in vitro*, il est possible de voir l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les cellules de granulosa et de la thèque (Meidan *et al.*, 1990; Richards, Hedin & Caston, 1986), indiquant une augmentation de l'entreposage du cholestérol pour la stéroïdogénèse.

2.3. Actions générales de la progestérone

Les principales cibles d'action de la progestérone sont le tractus reproducteur et l'axe hypothalamus-hypophyse. En général, l'action de la progestérone sur l'utérus est de préparer celle-ci à l'initiation et au maintien de la grossesse. La progestérone exerce le plus souvent ses effets directement en régulant la transcription de gènes cibles en servant de ligand à des récepteurs nucléaires (Moutsatsou & Sekeris, 1997). Une fois le ligand (la progestérone) lié, les récepteurs modulent l'expression des gènes par la liaison spécifique du complexe progestérone-récepteur aux éléments de réponse sur l'ADN (Olefsky, 2001).

Dans l'utérus, la progestérone agit comme un facteur de différenciation de l'endomètre (Cummings & Yochim, 1984). Durant la phase folliculaire, les estrogènes induisent la prolifération des cellules de l'endomètre et l'élévation de la concentration de la progestérone durant la phase lutéale du cycle reproducteur inhibe la mitose de l'endomètre (Padykula *et al.*, 1989). La progestérone induit aussi la différenciation du stroma, stimule la sécrétion glandulaire en association avec l'accumulation

des vacuoles basales dans l'épithélium glandulaire (Maslar, Powers-Craddock & Ansbacher, 1986) et change le patron des protéines sécrétées par les cellules de l'endomètre (Maslar *et al.*, 1986; Steinden & Shapiro, 1983). Un autre rôle donné à la progestérone dans l'utérus est l'induction de la quiescence du myomètre (Parkington, 1983). De plus, elle permet une diminution de la prise de calcium extracellulaire qui est requise pour la contraction des cellules myométriales (Batra, 1986) et prévient la contraction utérine en bloquant l'habilité de l'oestrogène à induire les récepteurs α -adrénergiques (Tsai, Wiltbank & Bodensteiner, 1996). Finalement, la progestérone agit en partie sur la longueur du cycle reproductif en affectant la sécrétion de LH par ses actions sur l'hypothalamus et l'hypophyse (Lucy *et al.*, 1992).

2.4. Stéroïdogénèse lutéale

Le corps jaune chez l'humain sécrète environ 10-40 mg/jour de progestérone (Devoto *et al.*, 2002). La source principale du substrat pour la progestérone est le cholestérol. La lutéinisation augmente les voies du transport et de production du cholestérol pour répondre à la hausse de la demande en substrat (Murphy & S.L., 1989). Des études ont déjà démontré l'augmentation de l'expression du gène codant pour les LDLr dans les follicules porcins, commençant après le stimuli de l'ovulation et persistant tout au long de la phase lutéale, ce qui corrèle avec la production de la progestérone (LaVoie *et al.*, 1997). Il y aussi l'apport du cholestérol via les récepteurs HDL (SR-B1). L'apport du cholestérol venant des HDL contribue aussi à la production des stéroïdes et en est aussi la principale source chez les rongeurs (Murphy & S.L., 1989). Une augmentation de l'expression de SR-B1 corrèle avec la lutéinisation chez les cellules de granulosa de rat *in vivo* (Li, Peegel & Menon, 1998) et est aussi associé directement avec l'augmentation du cholestérol intracellulaire par les cellules de granulosa *in*

in vitro (Azhar *et al.*, 1998). L'expression de SR-BI augmente jusqu'à sept fois dans le corps jaune durant la lutéinisation *in vivo* et jusqu'à cinq fois durant la lutéinisation *in vitro* chez les bovins (Rajapaksha *et al.*, 1997). De plus, l'expression de StAR, responsable du transfert du cholestérol dans les mitochondries pour la production de la progestérone dans l'ovaire de différentes espèces, est aussi dépendante de la lutéinisation (LaVoie *et al.*, 1997; Pescador *et al.*, 1997; Pescador, Stocco & Murphy, 1999). D'autres transporteurs comme les protéines MLN-64 et la protéine ressemblant à StAR ("StAR-like protein") et qui est présente dans les endosomes, semblent jouer un rôle dans le transport du cholestérol dans le corps jaune (Zhang *et al.*, 2002). Il y a aussi la protéine SCP-2 dont le rôle est de transporter le cholestérol hydrophobe dans le cytoplasme qui est régulée durant la phase lutéale (LaVoie *et al.*, 1997).

Les cellules contenues dans le corps jaune ont différentes caractéristiques morphologiques, endocrines et biochimiques. L'examen histologique du corps jaune révèle la présence de petites cellules (cellules lutéales provenant de la thèque), de grosses cellules (cellules lutéales de granulosa), de cellules fibroblastiques et de cellules immunitaires. Le nombre, la morphologie, la fonction et la capacité de sécrétion de ces cellules changent tout au long de la lutéinisation. Seulement environ 30% de ces cellules sont stéroïdogéniques (Devoto *et al.*, 2000). Comme mentionné précédemment, les petites cellules viennent hypothétiquement des cellules de la thèque interne et les grosses cellules sont d'origine des cellules de granulosa (Sanders & Stouffer, 1997). La production basale de progestérone est généralement beaucoup plus grande chez les grosses cellules lutéales en comparaison avec les petites cellules. Cependant, les petites cellules montrent une meilleure augmentation de la production de progestérone par la stimulation à la LH (ou hCG) (Retamales *et al.*, 1994).

2.5. Transcription contrôlant la lutéinisation

Le remodelage cellulaire caractérisant la lutéinisation est le résultat d'une expression différentielle des gènes et de la conséquence de leur expression. Plusieurs classes de gènes démontrent une expression durant la formation du corps jaune, ce qui inclut les gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, dans l'importation et la transformation des molécules apparentées aux stéroïdes, les protéines du cytosquelette et d'adhésion, les récepteurs membranaires et les protéines de signallement intracellulaire. La régulation de l'expression de ces gènes est aussi le résultat d'une multitude de mécanismes de transcription et de contrôles épigénétiques. La régulation de la transcription est un processus dynamique qui dans la plupart des cas a été étudié dans un contexte statique. Malgré le fait que nous connaissions bien les facteurs de transcription dans leur simple état, nous sommes moins informés sur les événements séquentiels et interactifs de ces facteurs dans l'expression ou la suppression de gènes particuliers.

Une des voies classiques de transduction par les gonadotrophines est via l'AMPc dans l'activation de la PKA et subséquemment la phosphorylation du facteur de transcription de réponse à l'AMPc (CREB pour "cAMP response binding protein") (Richards, 2001). Remarquablement, la phosphorylation de CREB est suffisante pour induire l'expression des gènes en réponse à l'AMPc (Mayr & Montminy, 2001). Cependant des facteurs de liaison au promoteur sont requis pour permettre au gène cible de répondre aux signaux intracellulaires (Mayr & Montminy, 2001). La réponse à l'AMPc au niveau du gène est faite à travers une séquence palindromique TGACGTCA qui réfère à l'élément de réponse CRE (cAMP response element) (Lalli & Sassone-Corsi, 1994; Meyer & Habener, 1993; Montminy *et al.*, 1986). Cependant, certains gènes comme StAR et plusieurs gènes de la famille des stéroïdes hydroxylases ne possèdent aucun

élément de réponse du style palindromique, mais possède la moitié du site de réponse (CGTCA) (Manna *et al.*, 2002), lequel est moins actif que l'élément de réponse complet (Mayr & Montminy, 2001). CREB existe sous trois formes et est considéré comme étant constitutivement synthétisé (Mayr & Montminy, 2001). Cette famille de réponses au CRE est constituée de CREB, CREM (CRE modulator protein) et ATF-1 (activating transcription factor). Les deux formes, activatrices ou répressives, peuvent être retrouvées dans la famille des facteurs qui se lient au CRE, lesquels peuvent homo- et hétérodimériser utilisant un code spécifique d'interaction (Hoeffler *et al.*, 1988; Quinn, 1993; Yamamoto *et al.*, 1990). Les trois gènes, CRE, CREM et ATF-1, montrent une grande homologie et constituent la sous-famille CREB/CREM qui intervient dans l'activation de la transcription (Foulkes & Sassone-Corsi, 1996). L'augmentation de la transcription en réponse à l'AMPc est observée après la phosphorylation de CREB à la sérine-133 (Chrivia *et al.*, 1993; Gonzalez & Montminy, 1989) ou CREM à la sérine-117 (Fimia, De Cesare & Sassone-Corsi, 1999), et de par sa liaison à la protéine nucléaire CBP (CREB binding protein) (Mayr, Canettieri & Montminy, 2001). L'état de phosphorylation de CREB permet la transactivation de plusieurs gènes impliqués dans la stéroïdogénèse. Ces gènes incluent la cytochrome P450_{sc} (Watanabe, Inoue & Fujii-Kuriyama, 1994), la P450_{arom} (Michael, Michael & Simpson, 1997) et StAR (Manna *et al.*, 2002). CREB devient phosphorylé très tôt durant la lutéinisation dans les cellules de granulosa de rat, cependant elles deviennent réfractaires à d'autre stimulation par l'AMPc (Gonzalez-Robayna *et al.*, 1999). Encore plus, l'expression des différentes isoformes disparaissent durant la lutéinisation chez les primates (Somers *et al.*, 1995). À plus long terme, il y a un maintien de la phosphorylation de CREB via l'interaction de l'AMPc et de la voie des kinases mitogènes activées (MAPK) (Maizels *et al.*, 2001).

À travers ces facteurs impliqués dans la lutéinisation, il y a aussi "CCAAT/enhancer binding protein - β " (C/EBP- β). L'expression de C/EBP- β est induite rapidement dans les cellules de granulosa de rat en réponse à l'hCG (Sirois & Richards, 1993) et les cellules de granulosa dans les souris déficientes en C/EBP- β ne lutéinisent pas (Sterneck, Tessarollo & Johnson, 1997). De plus, l'inhibition de l'expression C/EBP- β par des oligonucléotides anti-sens interfère avec l'ovulation et la lutéinisation dans les rats sans aucune apparence de réduction de l'expression de la protéine COX-2 nécessaire à l'ovulation (Pall *et al.*, 1997). C/EBP- β est un facteur important dans l'activation de la transcription de la protéine StAR (Reinhart *et al.*, 1999).

Les protéines de liaison aux éléments de réponse aux stérols (SREBP) sont d'autres facteurs de transcription essentiels pour la stéroïdogénèse lutéale. Il existe trois formes connues et caractérisées par une structure à fermeture hélice-boucle-hélice: SREBP1a et 1c, produites à partir du même gène mais par un épissage alternatif, et SREBP2 provenant d'un gène différent (Osborne, 2000). Les protéines SREBP sont présentes dans la cellule comme une protéine membranaire du réticulum endoplasmique ou à la membrane nucléaire. Ainsi cette localisation représente la forme inactive de SREBP (Brown & Goldstein, 1999). Cependant lors d'une diminution du cholestérol intracellulaire, une seconde protéine, SCAP (sterol cleavage-activating protein), vient couper la partie N-terminal pour ainsi relâcher la partie active. Ce produit du clivage va se diriger vers le noyau et ainsi interagir avec les éléments de réponse des promoteurs. Cette activation de la transcription est associée avec les gènes intervenants dans la régulation de la quantité du cholestérol intracellulaire. Ainsi, lors de la phase lutéale, un apport considérable en cholestérol est nécessaire pour la synthèse de la progestérone. Donc il n'est pas surprenant de voir les isoformes de SREBP

comme des régulateurs importants de la synthèse du cholestérol et dans l'importation du cholestérol dans le corps jaune (Lopez & McLean, 1999; Shea-Eaton *et al.*, 2001). De plus, la surexpression des formes actives de SREBP-1a, 1c et 2 augmente la transcription de StAR (Christenson *et al.*, 2001a; Shea-Eaton *et al.*, 2001). Cependant, la transcription basale de StAR dans les cellules de granulosa lutéales humaines ne semble pas être affectée par la diminution ou l'augmentation du cholestérol intracellulaire (Christenson *et al.*, 2001a). Par conséquent, la signification biologique de SREBP dans la régulation de StAR reste à être clarifiée (Christenson *et al.*, 2001a). D'autres aspects de l'activation via SREBP viennent encore appuyer son rôle dans la lutéinisation. Il a été démontré que l'AMPc via CREB pouvait amplifier l'activation de la transcription du gène HMG-CoA par SREBP (Dooley, Bennett & Osborne, 1999). De plus, les signaux en aval de la voie des MAPK peuvent aussi induire directement la transcription du récepteur LDL par SREBP (Kotzka *et al.*, 2000). L'induction du gène StAR semble aussi s'effectuer par l'interaction de plusieurs protéines comme les Ying-Yang (Christenson *et al.*, 2001a) et le récepteur nucléaire orphelin stéroïdogénique de type 1 (SF-1) (Shea-Eaton *et al.*, 2001). Finalement, la famille des facteurs de transcription SREBP semble importante lors de la lutéinisation. Elle peut agir via les gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol dans le corps jaune et aussi sur la transcription de StAR, une protéine clé de la lutéinisation des cellules de granulosa.

Le facteur de transcription SF-1 est aussi impliqué dans la lutéinisation et la stéroïdogénèse (Wehrenberg *et al.*, 1997). Il est un membre de la grande famille des récepteurs nucléaires et contient un domaine caractéristique de liaison de doigt de zinc et un domaine de liaison à un ligand qui est bien conservé à travers les membres de cette famille (Mangelsdorf *et al.*, 1995). SF-1 est exprimé dans le cortex de la surrénale,

dans les testicules, les ovaires, les cellules gonadotropes de l'hypophyse ainsi que dans l'hypothalamus (Ikeda *et al.*, 1993) et possède un rôle très important dans le développement de ces tissus (Luo, Ikeda & Parker, 1994). De plus, SF-1 fonctionne comme activateur de transcription pour une variété de gènes cibles comme la P450arom (Fitzpatrick & Richards, 1993; Lynch *et al.*, 1993), la P450scc (Clemens *et al.*, 1994), StAR (Sugawara *et al.*, 1996), LH- β (Halvorson, Kaiser & Chin, 1996) et DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal)(Yu, Ito & Jameson, 1998). Chez l'équin, l'expression de SF-1 dans les follicules diminue entre le stimuli pour l'ovulation et l'expulsion de l'ovocyte (Boerboom *et al.*, 2000). Chez les cellules de granulosa de rats, une réduction de l'expression de SF-1 coïncide avec la diminution de l'expression de la P450arom (Fitzpatrick *et al.*, 1997). Cependant l'expression de SF-1 reprend durant le début du développement du corps jaune chez les ovins et est exprimée d'une manière constitutive durant la phase mi-lutéale (Juengel *et al.*, 1998).

Une autre famille de facteurs de transcription impliquée au niveau de la lutéinisation est les GATAs, une famille de protéines à deux doigts de zinc et qui reconnaît les éléments de séquence du promoteur (A/T)GATA(A/G) (Molkentin, 2000). Les GATA-1, 2 et 3 sont principalement importantes dans la régulation de l'haématopoiesis et la lymphopoïèses, alors que GATA -4, -5 et -6 sont exprimées dans les tissus dérivés de l'endoderme comme le système cardiovasculaire et digestif (Molkentin, 2000). La modulation de l'abondance des facteurs de transcription a été associée avec la lutéinisation chez la souris (Heikinheimo *et al.*, 1997). De plus, l'expression de l'isoforme GATA-4 est réduite dans le follicule après l'ovulation, alors que GATA-6 est fortement exprimé dans le corps jaune en développement et à maturité (Heikinheimo *et al.*, 1997). GATA-4 est aussi capable d'interagir avec C/EBP- β dans

l'induction de la transcription du gène StAR dans la lignée cellulaire tumorale de Leydig (MA-10) et dans la lignée cellulaire de rein (CV-1) sous l'effet de PKA (Tremblay, Hamel & Viger 2002). Ainsi, GATA-4 induit la transcription de StAR et de la P450arom dans les ovaires de la souris (Tremblay & Viger, 2001). L'analyse par mutation et par délétion du promoteur de souris démontre que les GATA-4 interagissent avec d'autres éléments du promoteur tel SF-1 et AP-1 dans la réponse à l'AMPc (Wootton-Kee & Clark, 2000).

Une autre forme de régulation de la transcription vient s'ajouter à la panoplie des mécanismes engendrés par les facteurs de transcription: la régulation épigénétique. Les modifications covalentes des histones et le remodelage de la chromatine semble jouer un rôle critique dans la régulation de la transcription génique (Grunstein, 1997). La queue N-terminal des histones hautement basophile, qui se projette du complexe du cœur des histones, joue un rôle clé dans la structure hautement ordonnée de la chromatine et dans l'interaction avec d'autres protéines de régulation associées avec la chromatine (Hansen, Tse & Wolffe, 1998; Luger *et al.*, 1997; Luger & Richmond, 1998). Les modifications réversibles post-translationnelles des histones en N-terminal inclus : ADP-ribosylation, la glycosylation, la méthylation, la phosphorylation et la mieux documentée, l'acétylation (Davie & Spencer, 1999).

L'acétylation neutralise les charges positives localisées sur la lysine en N-terminal des histones H-3 et H-4 (Grunstein, 1997). Auparavant, les gens pensaient que cette neutralisation permettait la dissociation des protéines des charges négatives de l'ADN (Davie & Spencer, 1999). Cependant elle permet à l'ADN d'interagir avec les facteurs de transcription et la machinerie transcriptionnelle (Mizzen *et al.*, 1998). De études récentes

ont indiqué que l'acétylation ne pouvait faciliter la transcription sans déplacer le domaine N-terminal de la queue de l'ADN (Wang *et al.*, 2000). De plus, d'autres études *in vivo* ont démontré que le N-terminal des histones, un domaine hautement structuré, intervenait dans l'interaction protéine-protéine. L'acétylation des histones augmente le caractère α -hélicale du domaine N-terminal (Wang *et al.*, 2000). Ce changement dans la structure peut influencer les interactions des histones avec d'autres protéines de la chromatine, qui finalement va mener à la déstabilisation du repliement hautement ordonné de la chromatine (Wang *et al.*, 2001). L'acétylation et les autres modifications post-translationnelles ont été proposées comme représentant un «code des histones» qui pourrait déterminer la séquence et la nature de l'interaction des protéines qui facilite la transcription et/ou la réplication de l'ADN (Strahl & Allis, 2000). Cependant, cette hypothèse n'a pas été analysée à travers des expérimentations. Le lien entre l'acétylation des histones et la transcription des gènes a été suspecté depuis plusieurs années (Grunstein, 1997). La découverte de protéines co-activatrices possédant une activité acétyltransférase des histones a procuré une évidence directe pour son rôle important dans l'acétylation et dans la régulation de la transcription (Brownell *et al.*, 1996). Strahl *et al.* ont postulé que des protéines de liaison à l'ADN recrutent des co-activateurs de transcription qui acétylent les histones associées avec le promoteur, ce qui permet le recrutement de d'autres protéines (comme la protéine TATA et l'ARN polymérase II, etc.) à l'ADN pour promouvoir la transcription (Strahl & Allis, 2000). Par conséquent, l'acétylation des histones pourrait être un bon marqueur de l'activité des gènes. Contrairement, les histones déacétylases joueraient un rôle dans la répression de la transcription (Grunstein, 1997).

Certaines études ont été effectuées sur ces modifications épigénétiques des histones pendant la lutéinisation. Salvador *et al.* ont récemment démontré que la phosphorylation de l'histone H-3 est induite par la FSH et la LH (Salvador *et al.*, 2002; Salvador *et al.*, 2001) dans les cellules de granulosa de rat. Des études d'immunoprécipitation ont aussi montrées que l'acétylation des histones H-3 est associée avec les promoteurs sensibles à l'AMPc comme le promoteur StAR. De plus cette étude nous a démontré l'association et le rôle de l'acétylation des histones H-3 tout au long de la lutéinisation et dans l'activation du promoteur de StAR dans les cellules de granulosa humaines (Christenson, Stouffer & Strauss, 2001b).

3. LA PROTÉINE NIEMANN-PICK C1

3.1. Généralité

L'homéostasie du cholestérol intracellulaire est maintenue à travers une orchestration d'actions telles la biosynthèse, l'action d'enzymes de dégradation, de récepteurs, de régulation de la transcription et de protéines de transport (Ioannou, 2001). Il existe, comme mentionné précédemment, trois moyens principaux pour obtenir du cholestérol : soit par la synthèse de cholestérol en utilisant la voie de l'acyl coenzyme A: cholestérol-acyl transférase (ACAT) ou par la voie des récepteurs membranaires comme les LDLr et les HDLr. Pour maintenir l'équilibre entre ces deux sources de cholestérol, les cellules de mammifères régulent d'une manière précise la transcription des points spécifiques dans chacune des voies. Un progrès considérable à été fait pour comprendre comment les cellules régulent la jonction entre la biosynthèse et l'importation du cholestérol. Plusieurs observations indiquent l'existence de transporteurs spécifiques de cholestérol. Premièrement, le cholestérol n'est pas distribué au hasard dans la cellule, mais bien dirigé vers des compartiments stratégiques. Deuxièmement, le transport du cholestérol endogène du réticulum

endoplasmique vers la membrane plasmique semble distinct du cholestérol dérivé des récepteurs à LDL ou à HDL. Troisièmement, dans plusieurs cas, une simple défektivité dans un gène spécifique perturbe le transport du cholestérol intracellulaire.

3.2. Transport du cholestérol intracellulaire

Le cholestérol intracellulaire libre est souvent trouvé sur la membrane plasmique (Liscum & Faust, 1994) d'où il est transporté vers d'autres organelles cellulaires pour être soit estérifié, pour faire la synthèse des acides biliaires ou pour produire des hormones stéroïdiennes. Les mécanismes de contrôle du mouvement du cholestérol provenant de sources extracellulaires ou endogènes demeurent quelque peu incompris. Cependant, nous savons que la majeure partie du cholestérol voyage dans la cellule dans des vésicules de transport. Le cholestérol synthétisé par l'HMG CoA semble se déplacer du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique dans un processus rapide, (DeGrella & Simoni, 1982) et ce, sans passer par l'appareil du golgi (Urbani & Simoni, 1990). De plus, ce transport demeure fonctionnel même après l'ajout de drogue inhibant le transport par les microtubules, les fonctions des lysosomes ou la synthèse de protéines (Kaplan & Simoni, 1985). Pour ce qui est du cholestérol dérivé des LDLr, le transport se fait d'une manière coordonnée en passant par le système du golgi (Neufeld *et al.*, 1996) et/ou par le réticulum endoplasmique où il sera estérifié par l'ACAT.

La découverte de la protéine Niemann-Pick C1 (NPC-1) (Carstea *et al.*, 1997) apporte en partie une réponse sur le transport du cholestérol dérivant des récepteurs LDL. L'internalisation du cholestérol provenant de la membrane plasmique et plus précisément ceux dérivant des récepteurs à LDL est distribué vers une variété de compartiments cellulaires et cette

distribution serait dépendante de l'action concertée de la protéine NPC-1 (Cruz *et al.*, 2000).

3.3. La maladie de Niemann-Pick

La maladie de Niemann-Pick de type C est un désordre génétique autosomal récessif causé par la mutation de deux différents gènes, NPC1 et NPC2, aussi connu sous le nom de HE1 (Carstea *et al.*, 1997; Naureckiene *et al.*, 2000). Le phénotype cellulaire qui caractérise la maladie de Niemann-Pick est l'accumulation du cholestérol dérivé des LDL dans le système lysosomes-endosomes (Pentchev *et al.*, 1994; Vanier *et al.*, 1991). Les symptômes cliniques de cette maladie fatale se manifestent à l'enfance par l'apparition de changements pathologiques comme l'hépatosplénomégalie, l'entreposage de sphigomyéline dans les cellules réticulo-endothéliales et dans les tissus périphériques, ainsi que par la neurodégénérescence (ataxie et démence progressive) (Ory, 2000). L'hépatosplénomégalie est généralement détectée tôt durant l'enfance ce qui permet de prolonger la vie des victimes.

Cette maladie autosomale récessive affecte divers groupes ethniques. La fréquence dans la population est estimée à 1 victime sur 100 000 naissances (Vanier & Suzuki, 1998). Toutefois, dans les régions géographiquement isolées, la prévalence de la maladie est beaucoup plus élevée. Les études génétiques d'analyse de liaison et de fusion de cellules hétérokaryon ont identifié deux groupes complémentaires (Besley *et al.*, 1980). Le locus majeur de cette maladie est bien sûr NPC-1 retrouvé sur le chromosome 18 qui est responsable pour 95% de la maladie (Carstea *et al.*, 1993). Le gène mineur NPC-2, pour sa part, ne représente que 5% de la maladie (11). Les deux groupes complémentaires pour le gène NPC sont

biochimiquement semblables avec aucune différence dans le métabolisme du cholestérol ou des sphingolipides (Ory, 2000).

3.4. Modèle de la maladie de NPC-1

Il existe deux modèles dans la famille des muridées et un modèle félin démontrant les problèmes cellulaires liés à la maladie de NPC-1 qui est caractérisée par l'accumulation du cholestérol dans les lysosomes et les endosomes retardés. Chez les souris de type BALB/c *npc^{nh}*, la mutation a été montrée comme étant présente dans le gène NPC-1 (Loftus *et al.*, 1997). Cette mutation spontanée est due à l'insertion d'un rétrotransposon de 824 paires de base accompagnée par une délétion de 703 paires de base par rapport à la séquence génomique normale du gène (Loftus *et al.*, 1997). La conséquence de cette mutation se manifeste par la délétion de 44 paires de base et l'insertion de 24 paires de base dans la séquence codante ce qui cause un codon d'arrêt prématuré. Pour ce qui est du second modèle, les C57BL/KSJ *sp^m*, la mutation n'est pas encore connue, mais des tests de complémentation l'associe avec le même gène (Akaboshi *et al.*, 1997; Vanier & Suzuki, 1998).

L'utilisation de ces modèles a permis et permet encore aujourd'hui la découverte de nouvelles données sur la maladie qui ne sont pas accessibles avec l'humain. Un des aspects intéressants est la démonstration de la mutation du gène NPC-1 qui affecte profondément la stéroïdogénèse chez les souris mâles BALB/c *npc^{nh}*. Les cellules de Leydig démontrent une atrophie de réticulum endoplasmique et une défectuosité de l'entreposage des lipides (Roff *et al.*, 1993). Les conséquences de cette mutation ont pour effet de diminuer la sécrétion de testostérone ce qui à pour effet un sous développement des vésicules séminales. De plus, ces souris montrent une déficience de l'expression de certaines protéines du foie et du rein qui sont

dépendantes de la testostérone. Des expériences sur le modèle félin ont permis aussi de montrer certains signes pathologiques de la cortico-surrénale et ce, en association avec des évidences fragmentaires chez l'humain (Kamiya *et al.*, 1991).

3.5. Structure de la protéine NPC-1

Le gène NPC-1 code pour une glycoprotéine transmembranaire (16 domaines) de 1278 acides aminées incluant un domaine senseur aux stérols trouvés dans les protéines SCAP, HMG-CoA et la protéine Patched (Davies & Ioannou, 2000). Néanmoins, le mécanisme moléculaire par lequel ce senseur reconnaît le cholestérol reste à être élucidé. Par contre, il est évident qu'il est requis pour les effets du stérol sur la fonction des protéines comme le clivage du facteur de transcription SREBP (Brown & Goldstein, 1999), la régulation de l'HMG-CoA dans les cellules riches en stérol, le signalement de l'activité de Patched (Mann & Beachy, 2000), et comme décrit précédemment, pour les fonctions de NPC-1 (Watari *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 2001a). Près de la partie N-terminal, il y a un domaine unique au gène orthologue de NPC-1 qui contient un motif de fermeture éclair à leucine. La protéine possède aussi 19 sites potentiels pour la glycosylation et un motif dileucine (LLNF) en C-terminal qui suggère que NPC-1 est redirigé vers la voie de l'endocytose.

Des études sur les fonctions de structure, par mutation dirigée et par mutation non-sens dans la séquence codante de la protéine NPC-1, ont révélé que chaque composante majeure de la structure était essentielle à son bon fonctionnement (Watari *et al.*, 1999a; Watari *et al.*, 1999b). La mutation du domaine spécifique à NPC, ou du domaine senseur au stérol et de la seconde boucle intra-lumen (domaine riche en cystéines) inactive complètement la protéine (Watari *et al.*, 2000). Plusieurs des mutations non-

sens connues causant la maladie de NPC-1 sont regroupées dans les domaines dernièrement énumérés. De plus, une mutation de la séquence codante causant la terminaison prématurée de la protéine peut aussi engendrer une protéine non fonctionnelle. La délétion de la partie C-terminal di-leucine résulte en une protéine piégée dans le réticulum endoplasmique ou d'un mauvais repliement de la protéine (Watari *et al.*, 1999a). Conséquemment, cette protéine tronquée ne peut plus participer au transport du cholestérol.

3.6. Localisation cellulaire de NPC-1

Des études immuno-histochimiques ont montré, dans les cellules normales, que la protéine NPC-1 est localisée avec la protéine LAMP-2 (lysosomal associated membrane protein 2) et les récepteurs aux mannoses 6-phosphates (Neufeld *et al.*, 1999). Ces deux protéines servent de marqueurs pour l'identification cellulaire des lysosomes et des endosomes retardés (Kobayashi *et al.*, 1999). Ces compartiments sont distincts des vésicules contenant le cholestérol venant de l'endocytose des LDL. Dans le cas des cellules mutées sur le gène NPC-1, le cholestérol est co-localisé et piégé dans les organelles identifiées par les endosomes retardés et les lysosomes.

3.7. Mécanisme d'action de NPC-1

Le mécanisme par lequel NPC-1 fonctionne dans le transport du cholestérol des endosomes/lysosomes demeure encore inconnu. Récemment, il a été suggéré que NPC-1 pourrait fonctionner comme une perméase basée sur sa structure homologue avec les protéines procaryotiques RND (resistance-nodulation-division). Ces protéines fonctionnent dans l'efflux des composés lipophiles des bactéries gram-négatif comme les sels de bile et les acides gras du cytosol (Davies, Chen &

Ioannou, 2000). Ces conclusions ont été supportées par la surexpression de la protéine NPC-1 dans les bactéries *Escherichia coli* qui causent une augmentation de la prise d'acides gras (Davies *et al.*, 2000). Cependant, la relation observée entre le mouvement des acides gras et la translocation du cholestérol n'est pas bien connue.

Certaines études ont permis de montrer la dynamique du mouvement de la protéine NPC-1 dans les cellules cultivées avec une présence accrue de LDL (Neufeld *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001b). Ce mouvement de la protéine a été suivi dans des cellules vivantes avec l'aide de la protéine de fusion GFP. Ces études ont révélé que les vésicules contenant NPC-1 montrent un rapide mouvement antérograde et rétrograde le long des microtubules. Ce mouvement signifie que les compartiments où se situe NPC-1 sont une station de triage dynamique qui décharge le système endosomes/lysosomes vers une variété d'organelle à travers un contact transitoire. Le déchargement de la cargaison (cholestérol) et la livraison prennent donc place durant de courts contacts. De plus ce rapide mouvement requiert un domaine "senseur de stérol" intact (Watari *et al.*, 1999b).

Les mécanismes par lesquels le cholestérol contrôle les événements dans la voie d'endocytose ne sont pas bien connus. Mais il est évident qu'un niveau optimum de cholestérol est nécessaire sinon le processus est bloqué. Il est donc facile de supposer que le domaine senseur de cholestérol de NPC-1 pourrait jouer un rôle dans la répression et l'activation de la protéine NPC-1. Cette notion est conséquente avec le fait que la mutation de ce domaine dans les protéines Patched et SCAP affecte le transport des vésicules contenant ces protéines (Martin *et al.*, 2001; Nohturfft *et al.*, 1999; Strutt *et al.*, 2001).

3.8. Régulation de l'expression de NPC-1

Le gène humain NPC-1 s'étend sur 47 kb et contient 25 exons (Morris *et al.*, 1999). La région 5' du gène contient une île CpG et une multitude de sites Sp1 qui sont caractéristiques des régions promotrices. Une analyse du promoteur humain nous révèle que la séquence entre les bases -111 à -37 est importante pour l'expression basale de NPC-1 (Watari *et al.*, 2000). De plus, l'absence d'éléments de réponse à SREBP suggérait que la transcription de NPC-1 n'était pas affectée par la concentration intracellulaire en cholestérol (Patel *et al.*, 1999). Le traitement par la progestérone a démontré une augmentation du niveau d'ARNm par l'augmentation de sa demi-vie et non par l'augmentation de l'activité du promoteur (Watari *et al.*, 2000). L'ensemble de ces observations, à ce moment là, ont amené les gens à conclure que l'expression de NPC-1 était constitutive et était seulement sous contrôle post-transcriptionnelle.

III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article 1

PORCINE NIEMANN PICK-C1 PROTEIN IS EXPRESSED IN STEROIDOGENIC TISSUES AND MODULATED BY 3'5'- CYCLIC ADENOSINE MONOPHOSPHATE*

**Nicolas Gévry, Dan Lacroix, Jian-Hua Song, Nazario Pescador,
Mira Dobias and Bruce D. Murphy**

Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, C.P. 5000 St-Hyacinthe QC Canada J2S7C6

Address all correspondence and requests for reprints to: Bruce D. Murphy,
CRRA, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe QC Canada J2S 7C6. FAX 450-778-8103,
email: [REDACTED]

*This work was supported by Grant MT 11018 from the Canadian Institutes of
Health Research to BDM. Nazario Pescador was recipient of a graduate
fellowship from CONACYT, Mexico.

Running title: Niemann-Pick C1 in the ovary

* Cet article nous fait découvrir une autre facette de la protéine NPC-1 qui a
longtemps été associée au maintien du système nerveux. Ainsi, les résultats présentés
dans cet article nous montre l'implication de NPC-1 dans le processus de production des
stéroïdes et plus particulièrement de la production de la progestérone par le corps jaune
(lutéinisation). NPC-1 jouerait le rôle d'intermédiaire dans le transport du cholestérol
(précurseur pour la synthèse des stéroïdes) entre les récepteurs LDL et les différentes
organelles de la cellule. De plus, la régulation de l'expression est contrôlée par une
hausse de l'AMPC en réponse aux hormones trophiques.

Porcine Niemann Pick-C1 Protein Is Expressed in Steroidogenic Tissues and Modulated by cAMP

NICOLAS GÉVRY, DAN LACROIX, JIAN-HUA SONG, NAZARIO PESCADOR, MIRA DOBIAS, AND BRUCE D. MURPHY

Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St. Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Niemann-Pick C-1 (NPC-1) protein is essential for trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol in mammalian cells. The low density lipoprotein pathway is a major route for supply of cholesterol for steroidogenesis in the adrenals and gonads of many species. We investigated the occurrence and regulation of NPC-1 in porcine tissues, with emphasis on the corpus luteum and on granulosa cells undergoing luteinization *in vitro*. The porcine open reading frame for NPC-1 predicted a protein of 1278 amino acids (aa). It displayed a domain structure consistent with the human protein, and overall homologies were 89% and 86% with the deduced human and mouse aa sequences, respectively. The mRNA for NPC-1 comprised two transcripts, migrating at 5.0 and 2.2 kb, respectively. Transcripts were detected in a variety of pig tissues and were in highest abundance in steroid-producing organs. NPC-1 mRNA abundance increased with the differentiation of the corpus luteum *in vivo* and with luteinization of granulosa cells *in vitro*. Actinomycin D blockade of transcription in luteinized granulosa cells resulted in reduced NPC-1 mRNA and provided a half-life estimate of 20 h. Cycloheximide treatment increased NPC-1 transcript abundance in excess of 5-fold over 24 h. Treatment of luteinized granulosa cells with 1 mM (Bu)₂cAMP increased the abundance of the NPC-1 message by

2- to 4-fold. The 5'-flanking region of the pig sequence displayed consensus sequences for binding transcription factors, including specificity protein-1, cAMP response element-binding protein/activating transcription factor-1, activating protein-1, GATA, modified zinc finger protein-1, transcription factor-11 and a CpG island in the first 400 bp upstream of the ATG transcription initiation site. Transient transfection of 1.86 kb of the 5'-flanking region coupled to the luciferase reporter into three steroidogenic cell lines resulted in constitutive transcription. Treatment with (Bu)₂cAMP for 24 h increased the luciferase signal in all three lines. Thus, three types of evidence indicate that cAMP regulates pig NPC-1 expression. These are the presence of consensus binding sites for cAMP-induced transcription factors (cAMP response element-binding protein/activating transcription factor-1) in the proximal 5'-flanking region of the gene, increases in transcription by the NPC-1 promoter, and increases in NPC-1 mRNA abundance induced by (Bu)₂cAMP. We conclude that NPC-1 is expressed in the steroidogenic tissues of the pig and is regulated by the principal pathway of stimulation of steroidogenesis in the gonads and adrenal, the cAMP-PKA pathway. (*Endocrinology* 143: 708-716, 2002)

THE OVARY, TESTIS, and adrenal cortex depend on extracellular cholesterol derived from lipoproteins for steroidogenic substrate (1). The low density lipoprotein pathway is receptor mediated and regulated by both intracellular sterol levels and ligands in steroidogenic tissues (2). After uptake, low density lipoprotein cholesterol is liberated in lysosomes, then transported to cell membranes and endoplasmic reticulum (3). Appropriate intracellular distribution of receptor-imported cholesterol (4) and perhaps *de novo* synthesized cholesterol (5) depends on the Niemann-Pick C1 (NPC-1) protein. Its absence is characterized by a lysosomal storage disorder in which unesterified cholesterol accumulation results in tissue dysfunction (6), including neurological symptoms (7, 8). Recently, the gene for NPC-1 was identified (9). The protein is localized in late endosomes and lysosomes (7, 8) as well as in caveolin-rich vesicles (5). New evidence indicates that NPC-1 bears structural homology to the resistance-nodulation-division family of bacterial transmembrane

efflux pumps, and that NPC-1 functions as a proton driven pump to translocate cholesterol (10).

The deduced amino acid (aa) sequence for the human NPC-1 gene displays a sterol-sensing domain similar to that seen in cholesterol-sensitive proteins such as 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-coenzyme A reductase and sterol regulatory binding element cleavage activating protein (11). It also has 13 transmembrane domains and a lysosome-targeting motif (9, 11, 12). The mouse ortholog of human NPC-1 is known, and it displays all of the human domains and an overall identity in excess of 90% to the deduced human aa sequence (13).

NPC-1 functions in cholesterol trafficking and may be essential for normal steroidogenesis in the adrenal and ovary. Two mouse models display spontaneous mutations of the NPC-1 gene (4, 14). In the BALB/*c npc^{nih}* mouse there is a mutation in the open reading frame such that there is an insertion of intronic sequences and a premature termination sequence (13). The mutation that interferes with NPC-1 function is not currently known in the second model, the C57BL/6J^{SPM/SPM}. Homozygotes of both mouse strains are infertile (15) (Gévry, N., and B. D. Murphy, unpublished observations). There is substantial derangement of basal and ligand-induced testicular steroidogenesis in the BALB/*cnpc^{nih}* mouse (16). A feline model in which mutation of the NPC-1

Abbreviations: aa, Amino acids; ACT-D, actinomycin D; AP, activating protein; CHX, cycloheximide; CL, corpus luteum; CREB, cAMP response element-binding protein; NPC-1, Niemann-Pick C-1; nt, nucleotides; P450_{scc}, cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme; SP-1, specificity protein-1; StAR, steroidogenic acute regulatory protein.

RÉSUMÉ

La protéine Niemann-Pick C1 (NPC-1) est essentielle au trafic du cholestérol intracellulaire dérivant des lipoprotéines à faible densité. La voie des lipoprotéines à faible densité est la principale source de cholestérol pour la stéroïdogénèse dans la surrénale et dans les gonades de plusieurs espèces. Nous avons examiné la régulation de NPC-1 dans les tissus porcins avec une emphase sur le corps jaune et les cellules de granulosa en processus de lutéinisation. L'analyse de la séquence codant pour NPC-1 prédit la formation d'une protéine de 1278 acides aminés (aa). Elle démontre une apparence structurale semblable à la protéine de l'humain et de la souris avec une homologie respective de 89% et 86%. L'ARNm de NPC-1 est caractérisé par la présence de deux transcrits soit à 5,0 et à 2,0 kb. Les transcrits sont détectables dans une variété de tissus, mais il y a une abondance marquée dans les tissus produisant les stéroïdes. L'expression de NPC-1 augmente aussi avec la différenciation du corps jaune *in vivo* et des cellules de granulosa *in vitro*. L'arrêt de la transcription par l'actinomycine D dans les cellules de granulosa résulte en une réduction de l'ARNm de NPC-1 et permet l'estimation de sa demi-vie à 20 h. Le traitement à la cycloheximide augmente la transcription de NPC-1 plus de 5 fois dans une période de 24 h. De plus, le traitement des cellules de granulosa lutéinisées avec 1 mM (Bu)₂AMPc augmente de 2 à 4 fois la transcription du messenger de NPC-1. La région promotrice de la séquence porcine est caractérisée par la présence de séquences consensus pour la liaison de facteurs de transcription comme SP1, CREB/ATF-1, AP1, GATA, MZF1, TCF11 et une île CpG dans les 400 pb en amont du site du site ATG. La transfection transitoire d'un fragment de 1,86 kb couplé à un vecteur rapporteur de luciférase dans trois différentes lignées cellulaires stéroïdogénique démontre une activité constitutive. Cependant, le traitement avec 1 mM de (Bu)₂AMPc pour 24 h augmente l'activité du promoteur dans les trois types de cellule. Donc, trois évidences indiquent que l'AMPc régule l'expression du gène NPC-1

porcin, soit : la présence d'éléments consensus pour la liaison des facteurs induit par l'AMPc dans la partie proximale du promoteur, l'augmentation de la transcription de NPC-1 et l'augmentation de l'activité du promoteur induit par le (Bu)₂AMPc. Nous concluons que le NPC-1 est exprimé dans les tissus stéroïdogéniques porcins et qu'il est régulé par la principale voie de stimulation de la stéroïdogénèse dans les gonades et dans la surrénale, c'est-à-dire par la voie cAMP-PKA.

ABSTRACT

Niemann-Pick C-1 (NPC-1) protein is essential for trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol in mammalian cells. The low density lipoprotein pathway is a major route for supply of cholesterol for steroidogenesis in the adrenals and gonads of many species. We investigated the occurrence and regulation of NPC-1 in porcine tissues, with emphasis on the corpus luteum and granulosa cells undergoing luteinization *in vitro*. The porcine open reading frame for NPC-1 predicted a protein of 1278 amino acids (aa). It displayed a domain structure consistent with the human protein, and overall homologies were 89% and 86% with the deduced human and mouse aa sequences, respectively. The mRNA for NPC-1 comprised two transcripts, migrating at 5.0 and 2.2 kb, respectively. Transcripts were detected in a variety of pig tissues and were in highest abundance in steroid-producing organs. NPC-1 mRNA abundance increased with the differentiation of the corpus luteum *in vivo* and with luteinization of granulosa cells *in vitro*. Actinomycin D blockade of transcription in luteinized granulosa cells resulted in reduced NPC-1 mRNA and provided a half-life estimate of 20 h. Cycloheximide treatment increased NPC-1 transcript abundance in excess of 5-fold over 24 h. Treatment of luteinized granulosa cells with 1 mM (Bu)₂cAMP increased the abundance of the NPC-1 message by 2- to 4-fold. The 5'-flanking region of the pig sequence displayed consensus sequences for binding transcription factors, including

specificity protein-1, cAMP response element-binding protein/activating transcription factor-1, activating protein-1, GATA, modified zinc finger protein-1, transcription factor-11 and a CpG island in the first 400 bp upstream of the ATG transcription initiation site. Transient transfection of 1.86 kb of the 5'-flanking region coupled to the luciferase reporter into three steroidogenic cell lines resulted in constitutive transcription. Treatment with (Bu)₂cAMP for 24 h increased the luciferase signal in all three lines. Thus, three types of evidence indicate that cAMP regulates pig NPC-1 expression. These are the presence of consensus binding sites for cAMP-induced transcription factors (cAMP response element-binding protein/activating transcription factor-1) in the proximal 5'-flanking region of the gene, increases in transcription by the NPC-1 promoter, and increases in NPC-1 mRNA abundance induced by (Bu)₂cAMP. We conclude that NPC-1 is expressed in the steroidogenic tissues of the pig and is regulated by the principal pathway of stimulation of steroidogenesis in the gonads and adrenal, the cAMP-PKA pathway.

INTRODUCTION

The ovary, testis, and adrenal cortex depend on extracellular cholesterol derived from lipoproteins for steroidogenic substrate (1). The low density lipoprotein pathway is receptor mediated and regulated by both intracellular sterol levels and ligands in steroidogenic tissues (2). After uptake, low density lipoprotein cholesterol is liberated in lysosomes, then transported to cell membranes and endoplasmic reticulum (3). Appropriate intracellular distribution of receptor-imported cholesterol (4) and perhaps *de novo* synthesized cholesterol (5) depends on the Niemann-Pick C1 (NPC-1) protein. Its absence is characterized by a lysosomal storage disorder in which unesterified cholesterol accumulation results in tissue dysfunction (6) including neurological symptoms (7,8). Recently, the gene for NPC-1 was identified (9). The protein is localized in late endosomes and lysosomes (7,8) as well as in

caveolin-rich vesicles (5). New evidence indicates that NPC-1 bears structural homology to the resistance-nodulation-division family of bacterial transmembrane efflux pumps, and that NPC-1 functions as a proton driven pump to translocate cholesterol (10).

The deduced amino acid (aa) sequence for the human NPC-1 gene displays a sterol-sensing domain similar to that seen in cholesterol-sensitive proteins such as 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-coenzyme A reductase and sterol regulatory binding element cleavage activating protein (11). It also has 13 transmembrane domains and a lysosome-targeting motif (9, 11, 12). The mouse ortholog of human NPC-1 is known, and it displays all of the human domains and an overall identity in excess of 90% to the deduced human aa sequence (13).

NPC-1 functions in cholesterol trafficking and may be essential for normal steroidogenesis in the adrenal and ovary. Two mouse models display spontaneous mutations of the NPC-1 gene (4, 14). In the BALB/*c npc^{nih}* mouse there is a mutation in the open reading frame such that there is an insertion of intronic sequences and a premature termination sequence (13). The mutation that interferes with NPC-1 function is not currently known in the second model, the C57BL/6J^{spm/spm}. Homozygotes of both mouse strains are infertile (15) (Gévry, N., and B. D. Murphy, unpublished observations). There is substantial derangement of basal and ligand-induced testicular steroidogenesis in the BALB/*npc^{nih}* mouse (16). A feline model in which mutation of the NPC-1 gene has been demonstrated by complementation studies (17) displays adrenal insufficiency (18). Together, these studies provide evidence for steroidogenic defects associated with NPC-1 mutation.

Steroid synthesis is ligand dependent. Thus, it is expected that cAMP, the second messenger in the linear signaling pathway of ACTH-, FSH-, and LH-induced steroidogenesis, could be expected to modulate the expression of NPC-

1. In human granulosa-lutein cells, no effects of cAMP on NPC-1 expression were apparent (19). The purposes of this investigation were to establish the presence of the homologous NPC-1 sequences in a nonhuman, nonmurine model, the pig, to investigate expression of NPC-1 during luteal differentiation, and to determine whether cAMP modulates the abundance of its gene products in primary culture of ovarian cells and in steroidogenic cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of porcine NPC coding region and 5'-flanking region

An RT-PCR strategy was employed to clone the open reading frame, the 3'- untranslated region and the 5'-flanking region of the porcine NPC-1 gene. Primer sequences (Table 1) were based first on conserved regions from the interior portion of the mouse (13) and human (9) genes. Subsequent to the amplification of an authentic internal fragment, porcine primers and rapid amplification of cDNA ends kits (Roche, Laval, Canada) were employed to amplify the extremities. The RT reaction was performed with SuperScript II (Life Technologies, Inc., Burlington, Canada) containing 5 µg total RNA from pig granulosa cells and 20 pmol deoxythymidine primer. PCRs employed the Expand High Fidelity Kit (Roche) using the method described by the manufacturer. They were performed in a Hybaid Omnigene Thermal Cycler (Intersciences, Markham, Canada) for 35 cycles of 94 C for 15 sec, 60-52 C for 30 sec, and 72 C for 2-4 min, followed by an extension amplification at 72 C at the end of the PCR reaction.

The 5'-flanking region of the porcine NPC-1 gene was cloned by PCR reaction using a Universal Genome Walker Kit (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) with pig genomic DNA. Two primers for primary and nested PCR were determined from the pig cDNA sequence (Table 1). The Expand High Fidelity kit served for amplification of sequences in excess of 2 kb. The first PCR

amplification was performed with seven cycles of 94 C for 15 sec and 72 C for 4 min and 30 sec, followed by 32 cycles of 94 C for 15 sec, 65 C for 30 sec, and 68 C for 4 min plus 5 sec additional/cycle, with a final step at 68 C for 7 min. The cycling conditions for the nested PCR were five cycles of 94 C for 15 sec and 72 C for 4 min and 30 sec, followed by 24 cycles of 94 C for 15 sec and 68 C for 4 min and 30 sec plus 5 sec additional/cycle and 68 C for 7 min for the final elongation step.

The resulting cDNA and 5'-flanking fragments were cloned into pGEM-T Easy (Promega Corp., Nepean, Canada) and sequenced by automated DNA sequencing (Service d'Analyse et de Synthèse d'Acides Nucléiques de Université Laval, Québec, Canada). Sequence analysis was undertaken using MatInspector (Abteilung Genetek, Braunschweig, Germany), Grail (Oak Ridge Laboratories, Oak Ridge, TN), and Clustal (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) software.

In vivo analyses

Porcine tissues collected from the abattoir included skeletal muscle, brain, liver, lung, kidney, adrenal, and uterus. In addition, ovaries were collected from pigs at intervals of 24 h after the observation of estrus, and these tissues were supplemented with ovaries from the abattoir of the same stages of the estrous cycle, as determined by the macroscopic and microscopic analyses, previously described (20). Testes of adult and neonatal pigs (3–5 d of age) were collected and preserved for the analyses described below.

In vitro investigations

Granulosa cells were aspirated from medium-sized (3–5 mm) follicles of ovaries from prepubertal gilts and cultured as previously described (20). Briefly, 7–9 x 10⁶ viable cells/ml were pooled in MEM (Life Technologies, Inc.) containing 1 mg/liter insulin (Sigma, St. Louis, MO), 0.1 mM nonessential amino

acids (Life Technologies, Inc.), 5×10^4 IU/liter penicillin (Life Technologies, Inc.), 50 mg/liter streptomycin (Life Technologies, Inc.), 0.5 mg/liter fungizone (Life Technologies, Inc.), and 10% FCS (Life Technologies, Inc.). Incubation was carried at 37 C. At 48 h after initiation of culture, the cells were washed, and medium was replaced with serum-free medium. Cultures were terminated at 0, 24, 48, 72, and 96 h, and total RNA samples were collected to investigate the sequence of luteinization *in vitro*. For immunohistochemistry, cells were seeded onto coverslips, which were then fixed in methanol before undergoing the procedure described below. Cells incubated for 96 h were treated with (Bu)₂cAMP (300–1000 μ M; Sigma) for 24 h in subsequent trials to determine the regulatory mechanisms of NPC-1 expression. To investigate the rate of disappearance of NPC-1 message, cells incubated for 96 h were treated with actinomycin D (ACT-D; 5 μ g/ml, Sigma), and cultures were terminated at 0, 6, 12, and 24 h. To provide basic information about the characteristics of NPC-1 mRNA expression, luteinized granulosa cells were treated with the protein synthesis blocker, cycloheximide (CHX; 40 μ M; Sigma), and cultures were terminated at 0, 6, 12, and 24 h. Each experiment was repeated three or more times. Total RNA was purified as described below and stored at -80 C until Northern analyses were conducted.

Northern blot analysis

We previously described the methods of Northern analysis for porcine tissues (20, 21). In brief, tissues and cultured cells were homogenized in 4 M guanidine isothiocyanate (Life Technologies, Inc.), 26.5 mM sodium acetate (Sigma), and 0.12 M β -mercaptoethanol (Sigma) and stored at -70 C until analysis. Total RNA was purified with Easy Spin columns (QIAGEN, Mississauga, Canada). Aliquots of 15 μ g total RNA were subjected to electrophoresis on 1% agarose-formaldehyde gels using a 20-mM morpholinopropanesulfonic acid buffer (pH 7.0), transferred overnight to nylon

membranes, and cross-linked for 30 sec at 150 mJ in a UV chamber (GS Gene Linker, Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA).

Blots from tissues collected from the abattoir and from cell culture were hybridized with a 1-kb probe from the 5'-region of the porcine NPC-1 open reading frame. In some experiment blots were also hybridized with homologous steroidogenic acute regulatory protein (StAR) cDNA probe, as previously described (21), to serve as positive controls for ligand-regulated steroidogenic genes. To control for variation in pipetting and transfer, blots were then stripped and hybridized with a 1.4-kb fragment from an internal region of the human 28S rRNA gene, provided by Dr. G. Schultz (University of Calgary, Calgary, Canada). The probes were labeled with ^{32}P to specific activity of approximately $1.5\text{--}3.0 \times 10^9$ dpm/ μg by random primer synthesis using a DNA Random Prime kit (Roche). Hybridization was conducted as previously described (21), followed by two high stringency washes at 60 C. Hybridized blots were autoradiographed or subjected to phosphorimaging for visualization and quantitative estimates of the most prominent NPC-1 transcript (5.0 kb), along with the corresponding 28S band. The means of the dimensionless ratio of NPC-1 mRNA to 28S RNA were calculated for graphic representation of the data.

Immunohistochemistry

Porcine ovarian and testicular tissues were fixed in Zamboni's solution, embedded in paraffin, and sectioned at 7 μm . For antigen recovery, tissues were treated with 0.1% trypsin at 37 C for 10 min. All subsequent procedures were conducted at room temperature. Tissues were incubated for 1 h with the NPC-1 antibody (provided by H. Watari and J. F. Strauss III) (19, 22), employed at 1:100 and 1:200 concentrations. Tissues were washed in PBS and subjected to incubation for 30 min with goat antirabbit second antibody conjugated to fluorescein (BioCan, Mississauga, Canada) before microscopic visualization and digitalization of the images. The method was the same for porcine cells derived

from primary culture, except no antigen retrieval was performed. Control tissues were subjected to the same procedures, except that NPC-1 antibody was replaced with normal rabbit serum.

Cell culture, transient transfections, and promoter activity assays

Three steroidogenic cell lines were employed. Y1 mouse adrenal tumor cells (CCL-79, American Type Culture Collection, Manassas, VA) were maintained in DMEM/F-12 supplemented with 10% horse serum, 2.5% FBS, and antibiotics. The mouse Leydig tumor cell line (MA-10), a gift from Dr. Mario Ascoli (23), was cultured in Waymouth's MB/752 medium supplemented with 15% horse serum. SVG40 human granulosa cells (gift from Dr. P. Leung) were cultured in Opti-MEM, supplemented with 5% FBS and antibiotics. The cells were transfected with 100 nM/well of 1.86 kb of the pig NPC-1 promoter (pNPC-Luc) in a firefly luciferase reporter gene in the vector pGL3. Basic (Promega Corp.) using Effectene reagent (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. Cells were cotransfected with the SV40 Renilla luciferase control vector pRL.SV40 (Promega Corp.) at a ratio of 10:1 for pNPC-LUC/pRL.SV40 to normalize results for transfection efficiency. Some cultures were treated with 1 mM (Bu)₂cAMP (Sigma) for 24 h. Luciferase activity was detected by means of the Promega Corp. Dual Luciferase Assay system, and chemiluminescence was measured in a Berthold 9501 luminometer. Control transfections included the inclusion of an equal amount of the promoterless pGL3 basic plasmid (Promega Corp.).

Statistical analysis

One-way ANOVA was performed on mRNA abundance and luciferase activity data. Individual comparisons between means were made by the Tukey-Kramer test. The level of significance was $P < 0.05$.

RESULTS

The porcine NPC-1 sequence

The composite cDNA of 4400 nucleotides (nt; GenBank accession no. AF16935), derived from the three amplified fragments, comprised a 5'-untranslated region of 88 nt, a putative open reading frame of 3733 nt, and a 3'-untranslated region of 321 nt. The open reading frame codes for a deduced sequence of 1278 aa, including a signal peptide of 24 aa, of which 15 are hydrophobic, a conserved NPC-1 domain of 110 aa containing a putative leucine zipper motif, a sterol-sensing domain of 191 aa, and regions consistent with 13 transmembrane domains. In addition, the putative open reading frame terminates in the lysosomal targeting sequence, coding for the aa LLNF. Table 2 provides information about the domain homology between the porcine NPC-1 sequence and the human (9) and mouse (13) sequences. Homology with potential posttranslational modification sites in the human protein are present in the pig sequence, including a potential tyrosine phosphorylation site (aa 506) and 17 cysteine residues that are conserved between the human and mouse sequences (9). The putative luminal loop 3 (10, 11), also known as the cysteine-rich loop, present in the human sequence (24, 25) contains six cysteine residues in the pig. There is a strong tendency for clustering of the 20 potential glycosylation sites in the pig sequence. All but one (aa 314) are within the proposed luminal loop regions of the human protein (10, 11). Five are in the N-terminal putative loop 1, 7 in loop 2, and 7 in loop 3. Computer analysis revealed 20 potential myristoylation sites, of which only 3 were in the putative loop 1 compared with 6 in the human (11); none was in loop 2, and 8 were found in loop 3.

A 1.86-kb DNA fragment upstream of the porcine NPC1 transcription site was isolated and sequenced (GenBank accession no. AF329087). MatInspector analysis revealed several potential transcription elements within the first 400 bp upstream of the ATG triplet, including consensus sequences for activating

protein-4, specificity protein-1 (SP-1), activating protein-1 (AP-1), GATA, modified zinc finger protein-1 and transcription factor 11 (Fig. 1). Although no consensus TATA box motif was present, an important GC-rich region (CpG island) was found in the promoter (Fig. 1□). It is significant to this report that a site (TGACGTGC) showing high homology to the consensus cAMP response element-binding protein (CREB)-binding site (TGACGTCA) (26, 27) was present in the porcine promoter at -312 from the putative transcription initiation site (ATG). A second sequence with lower homology to consensus CREB was present at -152 to -148 from the ATG. The overall homology between the region of the pig and human sequences 400 bp upstream of the translation initiation site was 61%.

Porcine NPC-1 mRNA tissue distribution

The 1-kb probe from the 5'-region of the NPC-1 cDNA hybridized with two transcripts in Northern analysis, which migrated at 5.0 and 2.2 kb, respectively (Fig. 2). Transcripts were detected in all of the tissues investigated (Fig. 2) and were in highest abundance in tissues that synthesize steroids. In the 15 µg total RNA samples examined, the Leydig cell-rich, immature pig testis had NPC-1 mRNA in 2.6-fold greater abundance relative to the same quantity of total liver RNA, corrected for loading with 28S. Adult testis, in which the spermatogenic elements are most abundant and the relative Leydig cell number is reduced, had a lower amount of NPC-1 transcript. Ovarian granulosa cells had 5.3-fold, corpora lutea (CL) 5.8-fold, and adrenal 8.5-fold more abundant expression of NPC-1.

NPC-1 during luteinization

The NPC-1 message was found in the pig CL 24 h after ovulation and increased with the development of the CL. The strongest expression was observed during the late luteal phases (d 14–18 after ovulation; Fig. 3A), and this

was significantly different from the postovulatory (stage I) CL ($P < 0.05$). The message was barely detectable in CL showing morphological regression ($P < 0.01$ relative to all other stages). Granulosa cells cultured for 96 h displayed the morphological characteristics of *in vitro* luteinization, including confluence and a cobblestone, epitheloid aspect (20). NPC-1 transcripts were detectable in freshly isolated cells and had increased through 96 h ($P < 0.05$), concomitant with luteinization (Fig. 3B).

NPC-1 protein was strongly expressed in the theca interna of healthy porcine follicles, particularly in thecal cells adjacent to the follicle (Fig. 4A). The protein was present in a punctate form distributed throughout the cytoplasm. In CL recovered at approximately 24 h after ovulation, a strong signal was present in the thecal-vascular elements that invade the granulosa compartment at this time (Fig. 4B). Incipient punctate expression was observed in the cytoplasm of granulosa cells (Fig. 4C). In midcycle corpora lutea, NPC-1 was highly expressed in large and small luteal cells (Fig. 4D). The protein was also detected in the Leydig cells of the immature pig testis (Fig. 4E). Figure 4F represents the control in which NPC-1 antibody was replaced by normal rabbit serum and no evident signal.

In agreement with Northern analysis, NPC-1 protein was found in freshly isolated porcine granulosa cells by immunolocalization (Fig. 5). As these cells luteinized in culture, the abundance of the punctate NPC-1 protein progressively increased and became associated with larger organelles, presumably the lysosomes. Cultures terminated at 48, 72, and 96 h after harvest, and mRNA abundance was significantly different from that in freshly isolated cells ($P < 0.05$).

Effects of CHX, ACT-D, and (Bu)₂cAMP

Treatment of cells with ACT-D reduced the concentrations of mRNA for NPC-1, cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (P450_{scc}), and StAR, but

at different rates. StAR message was reduced by more than 95% by 6 h of transcriptional blockade, whereas the NPC transcript persisted to 24 h, with a calculated half-life of approximately 20 h (Fig. 6, A and C). P450_{scc} mRNA disappeared more slowly than StAR, but much more rapidly than NPC-1 (Fig. 6C). Incubation with the translational blocker, CHX, resulted in dramatic increases in NPC transcript abundance (2-fold at 6 h and 5.6-fold at 24 h; Fig. 6, A and B).

Incubation of luteinized granulosa cells with 300 μ M (Bu)₂cAMP for 24 h in six experiments resulted in a consistent 1.5- to 3-fold increase in the abundance of the NPC-1 transcript (Fig. 7A). Subsequent hybridization was conducted with the homologous StAR probe, as indicated in the expected increases in transcript ranging from 8- to 12-fold in these experiments (Fig. 7A).

Transient transfection assays

The 1.8-kb NPC promoter construct displayed significant constitutive transcription in all three steroidogenic cell lines employed, as indicated by the presence of signal relative to the promoterless control vector. Transcription was inducible in all cell lines, as indicated by reporter gene response to stimulation with 1 mM (Bu)₂cAMP (Fig. 7B; $P < 0.05$).

DISCUSSION

NPC-1 during luteal cell differentiation

Postovulatory luteinization is believed to engender terminal differentiation of follicular granulosa cells and their conversion from synthesis of estrogens from thecal androgen substrate to progesterone from cholesterol substrate (28). *In vivo* luteinization in the pig was characterized by more than 40-fold increases in progesterone output (29). Herein we show that it is accompanied by sequential and stage-dependent increases in the abundance of NPC-1 mRNA. A similar increase in NPC-1 is temporally associated with *in vitro*

luteinization of porcine granulosa cells, where the increase in progesterone output is in excess of 100-fold (30). NPC-1 expression differs from that of StAR, in that the NPC-1 transcript is present in granulosa cells at low levels before luteinization, whereas StAR shows no detectable expression until the cells have attached and begun to luteinize *in vitro* (20). The increases in mRNA abundance are mirrored in the apparent increased presence of a protein that interacts with the NPC-1 antibody in immunohistochemistry, both in the developing CL and in granulosa cells undergoing *in vitro* luteinization. The punctate distribution observed is consistent with subcellular localization in vesicles, presumably late endosomes and lysosomes (31). The increases we reported in NPC-1 mRNA abundance during luteinization in a preliminary investigation (32) have been ascribed by Watari *et al.* (19) to endogenous progesterone effects on the half-life of NPC-1 transcripts, as they have shown in human granulosa-lutein cells. No evidence is currently available to support or negate this hypothesis in pig tissues.

Regulation of NPC-1 expression by cAMP

The prevailing view is that NPC-1 is a housekeeping gene based on the ubiquity of its expression and evidence for posttranscriptional regulation of message stability (33). In contrast, we contend that, at least in the pig, NPC-1 is a cAMP-regulated gene, and we present three lines of evidence in support of this assertion. First, there are increases in NPC-1 transcript levels in luteinized pig granulosa cells treated with (Bu)₂cAMP. Although these are less robust than seen with acute regulation of StAR (21), they are nonetheless consistent and of the same magnitude observed with steroidogenic enzyme transcripts in the same cell system (34). Secondly, analysis of the 5'-flanking region of the porcine NPC-1 gene revealed a consensus elements for a cAMP response, including the sequence for binding CREB and another CREB family member, activating transcription factor-1 (26, 27). Third, we demonstrated that porcine NPC-1 promoter-reporter constructs transfected into three steroidogenic cell lines,

human granulosa cells, MA-10 Leydig tumor cells, and Y-1 adrenal cells, displayed consistent increases in promoter activity over constitutive levels after $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ stimulation. Similar experiments in primary cultures of human granulosa-lutein cells indicated that the 8-bromo analog of cAMP did not increase NPC-1 mRNA abundance (19). This led those researchers to suggest that our preliminary finding (32) of $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ induction of pig NPC-1 mRNA was due to an effect of progesterone on blockade of intracellular cholesterol transport. We believe that the presence of a cAMP response element in the pig promoter and evidence for cAMP stimulation of NPC-1 promoter-reporter expression argue for a direct, rather than indirect, effect of cAMP on this gene.

Translational and transcriptional inhibition

Estimates of transcript half-life can be made after treatment with ACT-D, nonetheless bearing in mind the inherent uncertainties related to blockade of synthesis of all proteins. We provide an estimate for NPC-1 in luteinized porcine granulosa cells on the order of 20 h. This compares with an estimate of 12 h for the transcript in human granulosa-lutein cells (22). The same authors indicated that exogenous progesterone increased the persistence of the human NPC-1 transcript. Human luteal cells produce relatively little progesterone (19) relative to pig cells (30), and the inherent production of this steroid may account for the long half-life of NPC-1 RNA in the present investigation.

CHX blockade of translation resulted in increased NPC-1 transcript abundance. A similar result was obtained for human NPC-1, again attributed to an increase in message stability (22). In support of this view is the finding that NPC-1 expression is not superinduced by the combination of CHX and cAMP in steroidogenic cell lines (Gévry, N., and B. D. Murphy, unpublished results).

NPC-1 sequence homology

The data presented herein indicate a high degree of overall homology in the coding sequences of the porcine homolog of the NPC-1 gene and the human and mouse sequences (9, 13). The deduced aa sequence indicates the presence of some variation among the signal sequences, with the pig and human sequences displaying a similar number of hydrophobic residues (9). There is remarkable 100% identity between the pig and human sequences in what has come to be known as the NPC-1 domain (9). This region contains the leucine zipper motif, believed to be involved in protein-protein interactions. The sterol-sensing domain, which has been speculated to be a site for the direct binding of cholesterol (35), displayed 92% homology between the pig and human sequences. The potential glycosylation sites are likewise well conserved and clustered within the putative luminal loops of the molecule (10, 11), which contain the NPC-1 domain and the N-glycosylation sites obligatory for function (25). Loop 1 (10) has an overall homology in excess of 98% between the human and pig sequences. The cysteine-rich loop, also known as loop 3 (10), is mutated in a cluster of NPC-1 disease phenotypes (24). It has recently been shown to be necessary for NPC-1 function by experimental mutagenesis studies (22). It shows some divergence in the pig, with 88% similarity to the human sequence and only 81% to the mouse. Given the importance of the lysosomal targeting sequence (LLNF) to NPC-1 action (25), it is not unexpected that it is conserved in the mouse, human, and pig sequences.

Herein we make the second report on the 5'-flanking region of the NPC-1 gene, and it is therefore possible to make some comparisons with the human sequence (22, 36). The transcription initiation site(s) is not known for either species, but in both there is a substantial 5'-untranslated region amplified by RT-PCR, indicating initiation upstream of the ATG. Both sequences demonstrate the presence of a CpG island, in which 80% or more of the nucleotides are GC. In

both cases this is found near the transcription start site, characteristic of constitutively expressed genes, and approximately half of the genes are expressed in a tissue-specific manner (37). The CpG island overlaps putative transcription factor-binding sites, including the CREB/activating transcription factor sequence, consistent with the view that the island is coincident with the region for binding of transcription factors (37). A SP-1 site is also present in the CpG island, and SP-1 has been linked to maintaining the island methylation-free, thereby preventing silencing of the gene (38). This localization notwithstanding, mutation of the human SP-1 site had no effect on the function of the human NPC-1 promoter-reporter constructs (22). There are numerous AP-1 sites on the promoter, and these may be involved in cAMP induction of transcription, as has been seen in rat granulosa cells (39).

In summary, we have analyzed the sequence of the porcine homolog of the human NPC-1 gene. The open reading frame displays high homology to the human and mouse sequences, whereas the promoter region shows greater variation. Expression of NPC-1 is greater in steroidogenic tissues relative to other somatic tissues and increases with the state of differentiation and steroidogenic potential of the CL. Porcine NPC-1 displays both constitutive and cAMP-regulated expression.

REFERENCES

1. **Gwynne JT, Strauss III JF** 1982 The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* 3:299-329
2. **Murphy BD, Silavin SL** 1989 Luteotrophic agents and steroid substrate utilization. *Oxf Rev Reprod Biol* 11:179-223
3. **Lange Y, Ye J, Steck TL** 1998 Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:18915-22
4. **Pentchev PG, Gal AE, Booth AD, Omodeo-Sale F, Fouks J, Neumeyer BA, Quirk JM, Dawson G, Brady RO** 1980 A lysosomal storage disorder in mice

characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. *Biochim Biophys Acta* 619:669-79

5. **Cruz JC, Chang, T-Y.** 2001 Fate of endogenously synthesized cholesterol in Niemann-Pick Type C1 cells. *J Biol Chem* 275:41309-16

6. **Pentchev PG, Brady RO, Blanchette-Mackie EJ, Vanier MT, Carstea ED, Parker CC, Goldin E, Roff CF** 1994 The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1225:235-43

7. **Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Patel S, Proestel M, Weintraub H** 1986 The cholesterol storage disorder of the mutant BALB/c mouse. A primary genetic lesion closely linked to defective esterification of exogenously derived cholesterol and its relationship to human type C Niemann-Pick disease. *J Biol Chem* 261:2772-7

8. **Higgins ME, Davies JP, Chen FW, Ioannou YA** 1999 Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab* 68:1-13

9. **Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA** 1997 Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277:228-31

10. **Davies JP, Chen FW, Ioannou YA** 2000 Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* 290:2295-2298

11. **Davies JP, Ioannou YA** 2000 Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing

domain is identical to those of 3-hydroxy-e-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein. *J. Biol. Chem.* 275:24367–24374

12. **Ioannou YA** 2000 The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Mol Genet Metab* 71:175-181

13. **Loftus SK, Morris JA, Carstea ED, Gu JZ, Cummings C, Brown A, Ellison J, Ohno K, Rosenfeld MA, Tagle DA, Pentchev PG, Pavan WJ** 1997 Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277:232-5

14. **Adachi M, Volk BW, Schneck L** 1976 Animal model of human disease: Niemann-Pick Disease type C. *Am J Pathol* 85:229-31

15. **Miyawaki S, Mitsouka S, Sakiyama T, Kitagawa T** 1982 Sphingomyelinosis, a new mutation in the mouse. *J Heredity* 73:257-263

16. **Roff CF, Strauss JF, Goldin E, Jaffe H, Patterson MC, Agritellis GC, Hibbs AM, Garfield M, Brady RO, Pentchev PG** 1993 The murine Niemann-Pick type C lesion affects testosterone production. *Endocrinology* 133:2913-23

17. **Somers KL, Wenger DA, Royals MA, Carstea ED, Connally HE, Kelly T, Kimball R, Thrall MA** 1999 Complementation studies in human and feline Niemann-Pick type C disease. *Mol Genet Metab* 66:117-21

18. **Brown DE, Thrall MA, Walkley SU, Wenger DA, Mitchell TW, Smith MO, Royals KL, March PA, Allison RW** 1994 Feline Niemann-Pick disease type C. *Am J Pathol* 144:1412-5

19. **Watari H, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Sun G, Glick JM, Patel S, Neufeld EB, Pentchev PG, Strauss III JF** 2000 NPC1-containing compartment of human granulosa-lutein cells: a role in the intracellular trafficking of cholesterol supporting steroidogenesis. *Exp Cell Res* 259:247–256

20. **Pescador N, Stocco DM, Murphy BD** 1999 Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biol Reprod* 60:1453-61

21. **Pescador N, Houde A, Stocco DM, Murphy BD** 1997 Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in luteinized porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 57:660-8
22. **Watari H, Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Watari, M., Burd, C.G., Patel, S, Pentchev PG, Strauss III JF** 2000 Determinants of NPC1 expression and action: Key promoter regions, posttranscriptional control and the importance of the "cysteine-rich" loop. *Exp Cell Res* 259:247-256
23. **Ascoli M** 1981 Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* 108:88-95
24. **Greer WL, Dobson MJ, Girouard GS, Byers DM, Riddell DC, Neumann PE** 1999 Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am J Hum Genet* 65:1252-1260
25. **Watari H, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Glick JM, Patel S, Neufeld EB, Brady RO, Pentchev PG, Strauss JF** 1999 Niemann-Pick C1 protein: obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:805-10
26. **DiCesare D, Sassone-Corsi P** 2000 Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Prog Nuc Acid Res Mol Biol* 64:343-369
27. **Montminy M** 1997 Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Ann Rev Biochem* 66:807-822
28. **Murphy BD** 2000 Models of luteinization. *Biol Reprod* 63:2-11
29. **Kieborz KR, Silvia WJ, Edgerton LA** 1991 Changes in uterine secretion of prostaglandin F₂ alpha and luteal secretion of progesterone in response to oxytocin during the porcine estrous cycle. *Biol Reprod* 45:950-954
30. **Murphy BD, Dobias M** 1999 Homologous and heterologous ligands downregulate follicle-stimulating hormone receptor mRNA in porcine granulosa cells. *Mol Reprod Dev* 53:198-207

31. **Garver WS, Heidenreich RA, Erickson RP, Thomas MA, Wilson JM** 2000 Localization of the murine Niemann-Pick protein to two distinct intracellular compartments. *J Lipid Res* 41:673-687
32. **Song J-H, Dobias M, Pescador N, Murphy BD** 1998 Luteinization and gonadotrophins upregulate the Niemann-Pick gene in the porcine ovary. *Biol Reprod* 58 (Suppl1):188
33. **Ory DS** 2000 Niemann-Pick type C: A disorder of cellular cholesterol trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:331-339
34. **Chedrese PJ, Zhang D, Luu The V, Labrie F, Juorio AV, Murphy BD** 1990 Regulation of mRNA expression of 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase in porcine granulosa cells in culture: A role for the protein kinase C pathway. *Mol Endocrinol* 4:1532-1538.
35. **Simons K, Ikonen I** 2000 How cells handle cholesterol. *Science* 290:1721-1726
36. **Morris JA, Zhang D, Coleman KG, Nagle J, Pentchev PG, Carstea ED** 1999 The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 261:493-8
37. **Antequera F, Bird A** 1999 CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Current Biol* 9:R661-R667
38. **Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H** 1994 Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371:435-438
39. **Sharma SC, Richards JS** 2000 Regulation of AP1(Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 275:33718-33728

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers employed in amplification of porcine NPC-1

A. cDNA amplification

PNPC-F	5'-TGTGTTTGGTATGGAGAGT-3'
PNPC-2	5'-TGCCACAGCTCATCACC-3'
PNPC-6	5'-TACATGGCATTGGCGAAAG-3'
PNPC-H	GATAACCCGAACCCCAAGTG-3'

**B. 5' flanking region
amplification**

PNPC-P1	5'-CATTTAAAATAGTCTGCAAGGCTGATTGG-3'
PNPC-P2	5'-TGCACAGGGCAGAGCAGCAGCAGGAGGA-3'

Table 2. Homology between domains of the deduced amino acid sequences of known sequences of the Niemann-Pick C-1 protein.

Domain	Pig vs Human	Pig vs. Mouse
Overall homology	89 %	86 %
Signal peptide	82 %	78 %
Conserved NPC-1 sequence (aa 55-165)	100 %	91 %
Sterol sensing domain	92 %	92 %
Membrane spanning domains (composite)	93 %	91 %
C-terminal lysosomal targeting sequence (LLNF)	100 %	100 %

human CGAAAAGGGA AAGCATCAGC GCCAGAAACC GTTGG . CAC AACTCCACAG ATACTCTCCC 336
 pig CCGGATTCCA AAGGTTTCAGC GGCTCAAGTC GGGGCGTCCC CAACC**CTTG ACGTGCCCC**
CREB/ATF

human GGGCCGAGCC AGACTCCATA AGTCCCGCGC CTGGCCCCCG GGGATTGCAG GGGC.TGAGG 276
 pig **AGGCGCAGCA GGGCGG.AGA** AGCGCAGAGC CGGCGCTTGG GAGGGTGCCG TGGCCTCAGC
AP4

human AGAAGGGCAA CACGGGGACC TTGAAGCGGG GTCGCGCGCG CGCCCCAGCC CGGGCCAGGG 216
 pig AGGT..... ..CGGGTCCC GCT**TAGCCCC GCCCCTG**TCC CGCCCAAGAC GAGTCCAGGG
SP1/GC box

human AGTCCCGGCA GCGGCACCTC CCAGAAA.GG GCGGAGCCGA CGACGCCTTC TTCCTTCCTG 156
 pig **CGTCCCGGCA GTGGCTCCAC CCAGAAGTGG** GAGGGGCCGA CGACGCCTT. .CCTT**CTG**
CP2

human ACCGGCGCGC GCAGCCTGCT GCCGCGGTCA GCGCCTGCTC CTGCTCCTCC GCTCCTCCTG 96
 pig **ACCTGCGCGC** GCAGCCAGCC GGCTCTG... GTGTCTGTTC C.....CTCC .CTCAGCCGG
CREB

human CGCGGGGTGC TGAAACAGCC CGGGGAAGTA GAGCCGCCTC CGGGGAGCCC AACCAGCCGA 36
 pig CGCGGCAGCC TGAGAC.GTC TCGGGACGCT GAACCG....GA...C **TGCCAGCTGA**
AP4

human ACGCCGCCGG CGTCAGCAGC CTTGCGCGGC CACAGCATGA CCGCTCGCGG CCTGGCCCTT+24
 pig **ACCTCG..GA** CGTCCGCCGC CCGGCGTCGC GGCAGCATGA GCGCGCGCGG CCCGGCCTTC
▶ +1

human GGCCTCCTCC TGCTGCTACT GT
 pig **GGCCTCCTCC** TGCTGCTGCT CT

Figure 1. Comparison of the 5'-flanking regions of the human and pig NPC-1 gene sequences. Alignment was accomplished by the Clustal program, and the putative transcription factor binding sites (*double underline*) were identified by MatInspector analysis. Sequences were aligned on the basis of the ATG transcription initiation site, and the putative CpG island is identified by a *single underline*.

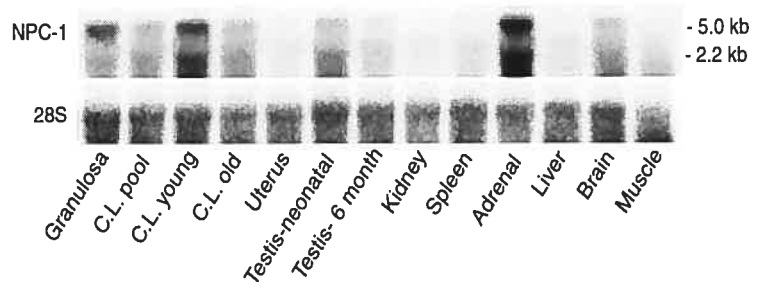
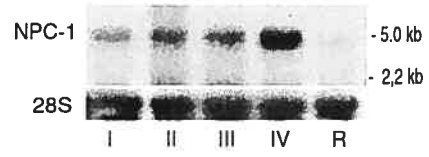


Figure 2. Northern analysis of the distribution of the NPC-1 transcripts in various porcine tissues, including those that synthesize steroid hormones. Tissues were hybridized with a 1-kb cDNA probe from the 5'-end of the pig NPC-1 open reading frame, stripped, and hybridized with a human 28S probe to control for loading and transfer.

A.



B.

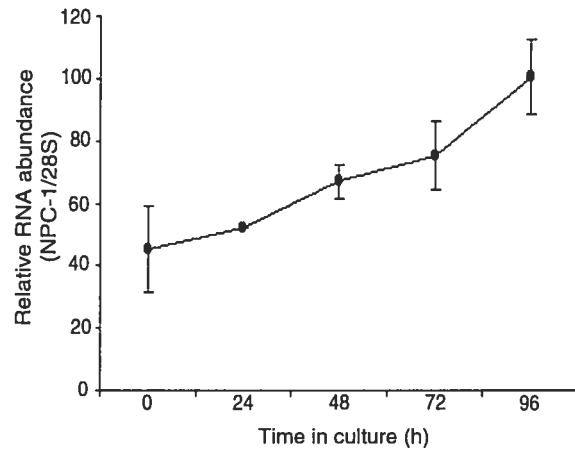


Figure 3. A, Northern analysis of NPC-1 abundance in 15 µg total RNA extracted from corpora lutea recovered from pigs at different stages of the estrous cycle. As described above, tissues were hybridized with a the 1-kb cDNA probe from the 5'-end of the NPC-1 open reading frame and the 28S probe as a control. This blot is representative of the results of three collections of CL from each stage of the cycle. CL stages are: I, postovulatory (48–96 h after ovulation); II, developing (5–8 d after ovulation); III, midcycle (9–13 d after ovulation); IV, late luteal phase (14–18 d after ovulation); and R, regressing (19–21 d after ovulation). B, Transcript abundance was determined in 15 µg total RNA purified from granulosa cells from 3- to 5-mm porcine follicles and cultured for 0–96 h, during which time they underwent luteinization. Cultures were terminated and probed for NPC-1. This figure represents six replications of the experiment conducted on different pools of cells taken on different days. Means at 48, 72, and 96 h were significantly greater than that at time zero ($P < 0.05$).

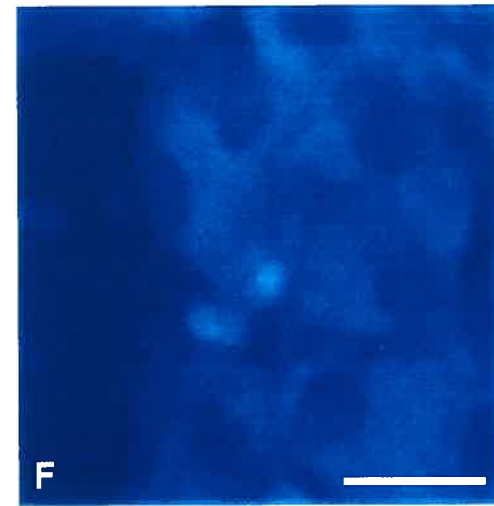
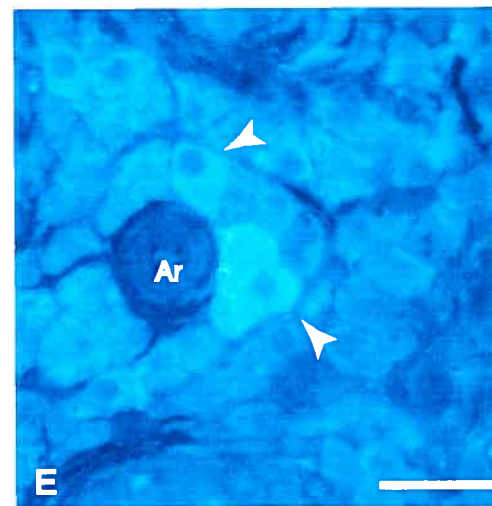
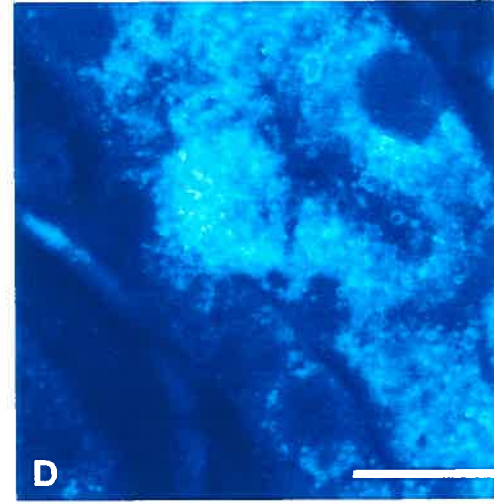
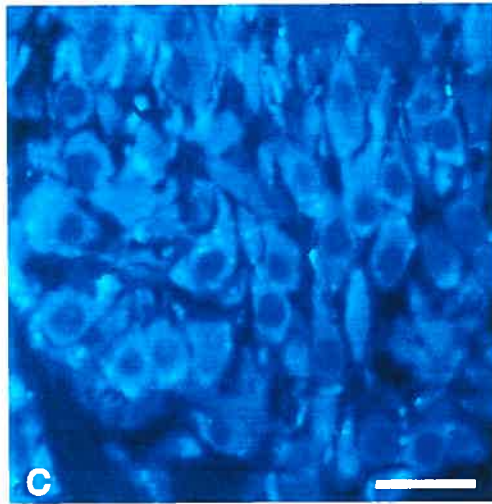
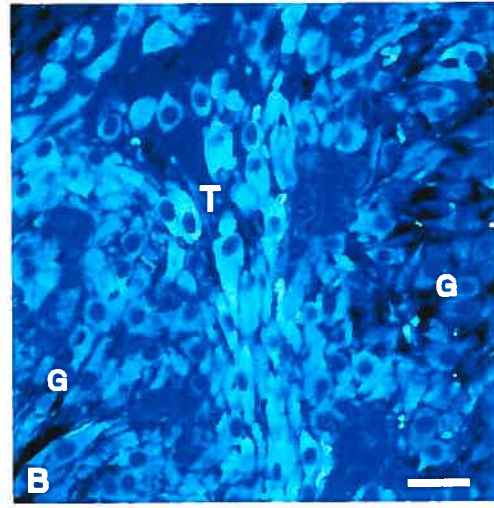
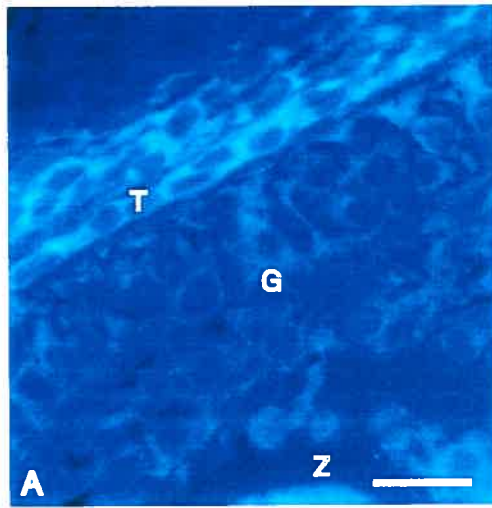


Figure 4. Immunolocalization of NPC-1 in pig tissues. A, The wall of an early antral porcine follicle. The components are the theca interna (T), granulosa layer (G), and the zona pellucida of the oocyte (Z). B, Involuting wall of a porcine follicle approximately 24 h after ovulation, demonstrating NPC-1 positive thecal cells (T) invading the granulosa layer (G). C, Granulosa cells from a porcine CL at approximately 24 h after ovulation, demonstrating NPC-1 immunoreactivity in the cytoplasm. D, Cross-section of a stage III porcine CL (9–13 d after ovulation) showing cytoplasmic immunoreactivity to the NPC-1 antibody. The *bar* in each photo represents approximately 0.1 mm. E, NPC-1-positive cells in the Leydig tissue of the immature pig testis (*arrows*) surrounding an arteriole (Ar). F, Luteal tissue from stage III CL subject to incubation with all immunolocalization reagents except NPC-1 antibody, which was replaced by normal rabbit serum. The *bar* in each photo represents approximately 0.1 mm.

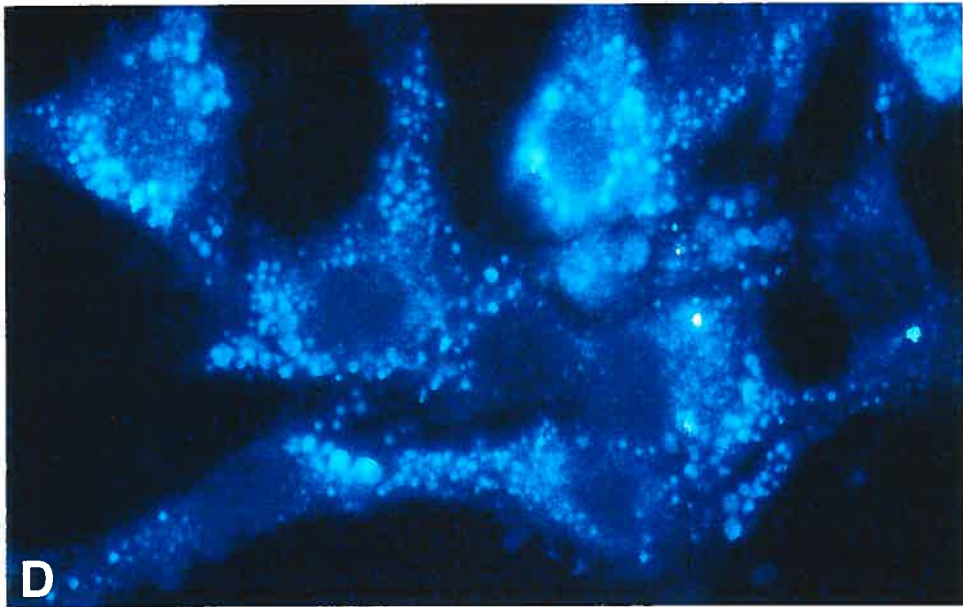
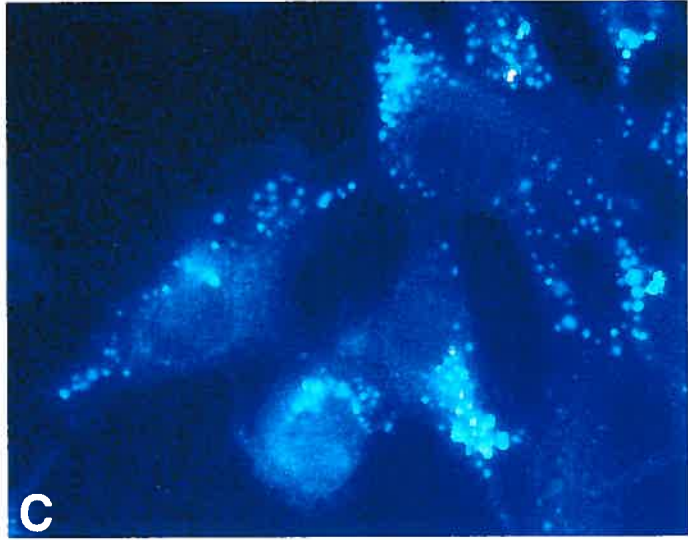
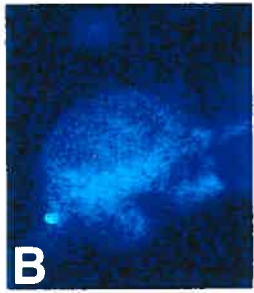
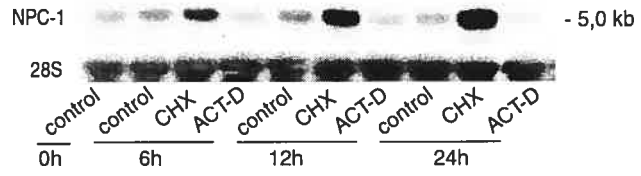
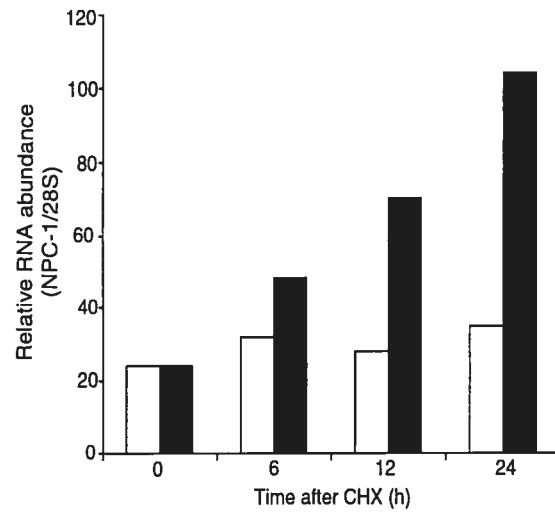


Figure 5. Immunolocalization of NPC-1 in porcine granulosa cells undergoing luteinization *in vitro*. Cells were isolated from 3- to 5-mm follicles and cultured for 96 h. A, Freshly isolated granulosa cell. B, Granulosa cell at 24 h in culture. C, Granulosa cells at 72 h. D, Granulosa cell monolayer at 96 h after isolation of the cells.

A.



B.



C.

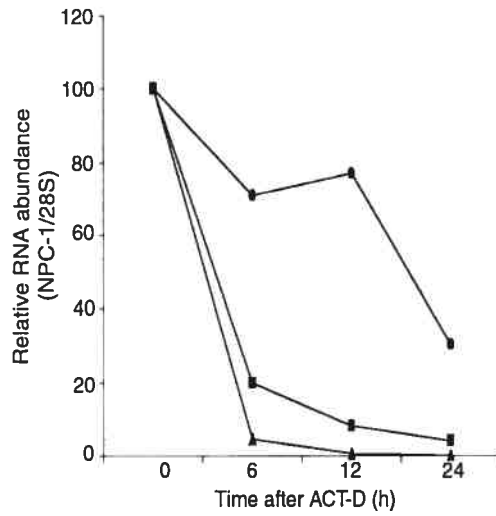
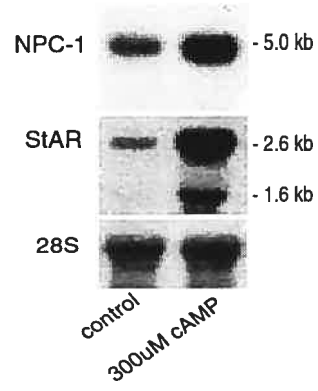


FIG. 6A. Representative Northern blot demonstrating the effects of a transcriptional blocker, Actinomycin-D (ACT-D) and a translational inhibitor, cycloheximide (CHX) on the abundance of the 5.0 Kb NPC-1 transcript in luteinized porcine granulosa cells. **B.** Graphic expression of the effects of CHX on the abundance of the 5.0 kb NPC-1 transcript as determined by densitometric analysis. Open bars are controls, solid bars are CHX treated. **C.** The effects of ACT-D on the abundance of transcripts for NPC-1. (●) StAR (▲) and P450scc (■) in porcine granulosa cells over 24 h after addition of the inhibitor.

A.



B.

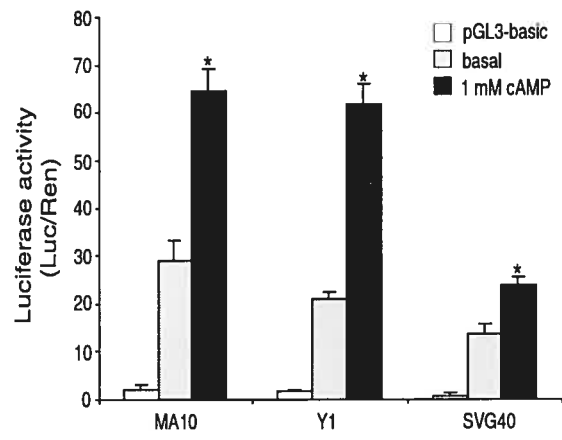


Figure 7. A, Northern blot representing six replicates of an experiment in which porcine granulosa cells cultured for 96 h were treated with 300 μ M (Bu)₂cAMP for an additional 24 h. The increase in abundance of the NPC-1 due to cAMP treatment in this experiment was 2.9-fold. Blots were stripped and hybridized with the full-length StAR probe, resulting in an 8.6-fold increase in transcript abundance in this experiment. B, Mean \pm SEM luciferase activity in three steroidogenic cell lines (mouse Leydig tumor MA-10, mouse adrenal Y1, and human granulosa, designated SVG40) in three independent experiments for each. Cells were transfected with the 1.86-kb fragment of the NPC-1 promoter-luciferase construct or the promoter-less luciferase plasmid, pGL3-basic. Cells were cotransfected with simian virus 40 *Renilla* luciferase control vector pRL-simian virus 40 to correct for transfection efficiency. Cells were treated for 24 h after transfection with 1 mM (Bu)₂cAMP. *, Significantly greater than basal levels ($P < 0.05$).

Article 2

Regulation of Niemann-Pick C1 Gene Expression by the 3'5' Cyclic Adenosine Monophosphate Pathway in Steroidogenic Cells.

Nicolas Y. Gévry, Enzo Lalli, Paolo Sassone-Corsi and Bruce D. Murphy

Centre de recherche en reproduction animale (N.Y.G., B.D.M.), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe Québec, Canada J2 S7C6; Institute de génétique et biologie moléculaire et cellulaire (E.L., P.S.-C.), Centre Nationale de la Recherche Scientifique, INSERM-ULP, Illkirch, C.U. de Strasbourg, France 67404

Abbreviations: cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CBP, CREB binding protein; But, butyrate; ChIP, chromatin immunoprecipitation assays; CRE, cAMP response element; CREB, cAMP response element binding protein; HAT, histone acetyl transferase; HDAC, histone deacetylase; LDL, low density lipoprotein; MAPK, mitogen activated protein kinase; NPC-1, Niemann Pick-C1; PKA, protein kinase A; SF-1, steroidogenic factor-1; TSA, trichostatin A

* Les données obtenues dans cet article nous montre un mécanisme complexe entourant la régulation du gène NPC-1 en réponse aux hormones trophiques. Ces résultats font suite au mécanisme proposé dans l'article 1 sur la régulation du gène NPC-1 par l'AMPc. Ainsi, cette régulation engendrée par l'AMPc résulte en une activation de la voie des PKA et une activation du facteur de transcription CREB et SF-1. De plus, il est possible de voir que cette activation du gène NPC-1 n'est pas seulement due au recrutement de ces facteurs de transcription, mais est aussi possible grâce à la modification covalente des histones H-3. Ce mécanisme montre de façon globale la régulation du gène NPC-1 dans les tissus stéroïdogéniques.

Regulation of Niemann-Pick C1 Gene Expression by the 3'5'-Cyclic Adenosine Monophosphate Pathway in Steroidogenic Cells

NICOLAS Y. GÉVRY, ENZO LALLI, PAOLO SASSONE-CORSI, AND BRUCE D. MURPHY

Centre de Recherche en Reproduction Animale (N.Y.G., B.D.M.), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada; Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (E.L., P.S.-C.), Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Université Louis Pasteur, Illkirch, Communauté Urbaine de Strasbourg 67404, France

The Niemann Pick-C1 (NPC-1) protein is essential for intracellular transport of cholesterol derived from low-density lipoprotein import in mammalian cells. The role of the protein kinase A (PKA) pathway in regulation of expression of the NPC-1 gene was investigated. NPC-1 promoter activity was induced by treatment with dibutyryl cAMP (dbcAMP), alone or in combination with the cAMP response element (CRE) binding protein (CREB) overexpressed in adrenal Y-1 cells. When the catalytic subunit of PKA was overexpressed in Y-1 cells, there were similar increases in NPC-1 promoter activity in the presence of CREB. Responses were attenuated by blockade of the PKA pathway, and in the Kin-8 cell line deficient in PKA. Promoter deletion analysis revealed that this response was present in promoter fragments of 186 bp and larger but not present in the 121-bp fragment. Two promoter regions, one at -430 and one at -120 upstream of the translation initiation site, contained CRE consensus sequences. These bound recombinant CREB in EMSA, confirming their authenticity as CREB response elements. Promoters bearing mutations of both CRE displayed no response to dbcAMP. The orphan nuclear receptor, steroido-

genic factor-1 (SF-1), was implicated in NPC-1 transactivation by the presence of SF-1 target sequence that formed a complex with recombinant SF-1 in EMSA. Furthermore, transfection of a plasmid that overexpressed SF-1 into ovarian granulosa cells increased promoter activity in response to dbcAMP, an effect abrogated by mutation of the SF-1 target sequence. Chromatin immunoprecipitation assays demonstrated that the CRE region of the endogenous and transfected NPC-1 promoter associated with both acetylated and phosphorylated histone H-3 and that this association was increased by dbcAMP treatment. Treatment with dbcAMP also increased the association of the CRE region of the promoter with CREB binding protein, which has histone acetyltransferase activity. Together, these results demonstrate a mechanism of regulation of NPC-1 expression by the cAMP-PKA pathway that includes PKA phosphorylation of CREB, recruitment of the coactivator CREB binding protein and the phosphorylation and acetylation of histone H-3 to transactivate the NPC-1 promoter. (*Molecular Endocrinology* 17: 704-715, 2003)

THE NIEMANN-PICK C-1 (NPC-1) gene codes for a membrane glycoprotein that functions in processing of low-density lipoprotein (LDL) imported cholesterol and in intracellular cholesterol homeostasis (1). Its absence is characterized by pathological accumulation of cholesterol in endosomes and lysosomes, resulting in premature death, usually from neural manifestations of the excess cholesterol storage (2, 3). The mechanism of NPC-1 action in cholesterol transport

has not been determined in its entirety but is the subject of intense current investigation. Recent evidence indicates that the protein resides primarily in the late endosomes (4). It displays domain homology with the resistance-nodulation-division protein pump family in prokaryotes (5) and is believed to be a bulk *trans*-organelle transporter of cholesterol.

Cholesterol is the parent molecule of the steroid hormones, and it is supplied principally by importation from extracellular sources (6). In nonrodent mammals, LDL cholesterol is the most significant contributor to steroidogenesis (6). Mice homozygous for mutations of NPC-1 have impaired basal and ligand-induced testosterone synthesis (7), and the females are infertile (Gévry, N. Y., and B. D. Murphy, unpublished). Furthermore, cats bearing inactivating mutations in NPC-1 display adrenal insufficiency (8). NPC-1 is highly expressed in steroidogenic theca and luteal

Abbreviations: ACREB, Mutant form of CREB; ATF-1, activating transcription factor-1; CBP, CREB binding protein; ChIP, chromatin immunoprecipitation assay; CMV, cytomegalovirus; CRE, cAMP response element; CREB, CRE binding protein; dbcAMP, dibutyryl cAMP; HAT, histone acetyl transferase; HDAC, histone deacetylase; LDL, low-density lipoprotein; mPKA, mutant form of PKA; NPC-1, Niemann Pick-C1; PKA, protein kinase A; rSF-1, recombinant SF-1; SDS, sodium dodecyl sulfate; SF-1, steroidogenic factor-1; SV40, simian virus 40; TSA, trichostatin A.

RÉSUMÉ

La protéine Niemann-Pick -C1 (NPC-1) est essentielle pour le transport du cholestérol dérivé des lipoprotéines à faible densité dans les cellules de mammifères. Dans cette étude, nous avons investigué le rôle de la voie de la protéine kinase A (PKA) dans la régulation de l'expression du gène NPC-1. L'activité du promoteur NPC-1 est induite par le traitement des cellules de la surrénale Y1 avec le 3', 5'-monophosphate d'adénosine cyclique (AMPc) seul ou en combinaison avec la surexpression du facteur de transcription liant les éléments de réponse à l'AMPc (CREB). Nous obtenons des effets similaires à l'AMPc par la surexpression de la sous-unité catalytique de PKA dans les cellules Y1. Ainsi, cette activation par PKA peut être empêchée par l'ajout d'inhibiteur de cette voie ou par l'utilisation des cellules Kin-8 déficiente pour PKA. L'analyse de délétion du promoteur nous révèle que l'activation minimale du promoteur est présente dans le fragment de 186 pb et disparaît dans le fragment de 121 pb en amont du site de translation. Les régions situées à -430 et -120 du promoteur contiennent deux sites de liaison pour CREB. L'authenticité de la liaison de CREB sur ces régions a été confirmée par la technique de retardement de la mobilité sur gel (EMSA) et par la mutation des deux sites de réponse qui inhibe la réponse à l'AMPc. De plus, nous avons démontré l'implication du facteur stéroïdogénique de type I dans la transactivation du promoteur NPC-1. La surexpression de SF-1 dans les cellules de granulosa induit l'activité du promoteur en réponse à l'AMPc et est inhibée par la mutation de son site de liaison. Son authenticité a aussi été vérifiée par EMSA. L'analyse par immunoprécipitation de la chromatine nous démontre, après traitement à l'AMPc, que la région proximale du promoteur où se situe les éléments de réponse à l'AMPc est associée à des changements épigénétiques caractérisés par la phosphorylation et l'acétylation des histones H-3. Le traitement à l'AMPc amène également la protéine de liaison à CREB (CBP) qui possède une activité acétyl-transférase envers les histones. L'ensemble de ces résultats nous

démontrent la régulation de l'expression de NPC-1 par la voie de l'AMPc-PKA ce qui inclut la phosphorylation de CREB, le recrutement du co-facteur CBP et la phosphorylation et l'acétylation des histones H-3.

ABSTRACT

The Niemann Pick-C1 (NPC-1) protein is essential for intracellular transport of cholesterol derived from low density lipoprotein import in mammalian cells. The role of the protein kinase A (PKA) pathway in regulation of expression of the NPC-1 gene was investigated. NPC-1 promoter activity was induced by treatment with dibutyl 3'5' cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP), alone or in combination with the cAMP response element (CRE) binding protein (CREB) overexpressed in adrenal Y-1 cells. When the catalytic subunit of protein kinase A (PKA) was overexpressed in Y-1 cells, there were similar increases in NPC-1 promoter activity in the presence of CREB. Responses were attenuated by blockade of the PKA pathway, and in the Kin-8 cell line deficient in PKA. Promoter deletion analysis revealed that this response was present in promoter fragments of 186 bp and larger, but not present in the 121 bp fragment. Two promoter regions, one at -430 and one at -120 upstream of the translation initiation site contained CRE consensus sequences. These bound recombinant CREB in electromobility shift assays (EMSA), confirming their authenticity as CREB response elements. Promoters bearing mutations of both CRE displayed no response to dbcAMP. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1 (SF-1) was implicated in NPC-1 transactivation by the presence of SF-1 target sequence that formed a complex with recombinant SF-1 in EMSA. Further, transfection of a plasmid that overexpressed SF-1 into ovarian granulosa cells increased promoter activity in response to dbcAMP, an effect abrogated by mutation of the SF-1 target sequence. Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) demonstrated that the CRE region of the endogenous and transfected NPC-1 promoter associated with both acetylated

and phosphorylated histone H-3, and that this association was increased by dbcAMP treatment. Treatment with dbcAMP also increased the association of the CRE region of the promoter with CREB binding protein, which has histone acetyltransferase activity. Together these results demonstrate a mechanism of regulation of NPC-1 expression by the cAMP-PKA pathway that includes PKA phosphorylation of CREB, recruitment of the co-activator CBP and the phosphorylation and acetylation of histone H-3 to transactivate the NPC-1 promoter.

INTRODUCTION

The Niemann-Pick C-1 (NPC-1) gene codes for a membrane glycoprotein that functions in processing of low density lipoprotein (LDL) imported cholesterol and in intracellular cholesterol homeostasis (1). Its absence is characterized by pathologic accumulation of cholesterol in endosomes and lysosomes, resulting in premature death, usually from neural manifestations of the excess cholesterol storage (2, 3). The mechanism of NPC-1 action in cholesterol transport has not been determined in its entirety, but is the subject of intense current investigation. Recent evidence indicates that the protein resides primarily in the late endosomes (4). It displays domain homology with the resistance-nodulation-division (RND) protein pump family in prokaryotes (5), and is believed to be a bulk trans-organelle transporter of cholesterol.

Cholesterol is the parent molecule of the steroid hormones, and it is supplied principally by importation from extracellular sources (6). In non-rodent mammals, LDL cholesterol is the most significant contributor to steroidogenesis (6). Mice homozygous for mutations of NPC-1 have impaired basal and ligand-induced testosterone synthesis (7), and the females are infertile (Gévry and Murphy, unpublished). Further, cats bearing inactivating mutations in NPC-1 display adrenal insufficiency (8). NPC-1 is highly expressed in steroidogenic

theca and luteal cells in the pig ovary (9). Thus, it is expected that NPC-1 plays an important intracellular trafficking role in steroid synthetic cells.

Little is known about the transcriptional regulation of the NPC-1 gene. Portions of the sequence of the of the human (10), pig (9) and mouse (11) 5' flanking regions have been reported. These sequences have elements in common, including a CpG island and SP-1 and AP-1 consensus sites. Watari et al. (10) demonstrated constitutive activity of the human promoter in steroidogenic and non-steroidogenic cells, and further demonstrated that the region found 220 bp upstream of the translation initiation codon directs constitutive transcription in human granulosa-lutein cells. They concluded that the NPC-1 promoter displays modest cell-specific responses, and that the principal mechanism of regulation is post-transcriptional (10). In contrast, we demonstrated the presence of consensus elements for cyclic AMP response element binding protein (CREB), GATA, and AP-1 in the first 400 bp upstream of the translation initiation site of the pig NPC-1 promoter (9). We further showed that cAMP analogues increased NPC-1 message abundance, and that dibutryl cAMP (dbcAMP) modulates the activity of the 1.8 kb pig promoter in three steroidogenic cell lines (9). In this report we describe subsequent studies in which we identify promoter elements and mechanisms by which cAMP regulates NPC-1 transcription.

RESULTS

CREB and PKA in NPC-1 transcription

Our previous results (9) demonstrated that the NPC-1 1.8kb promoter-luciferase construct signal was significantly increased in three steroidogenic cell lines, Y-1, MA-10 and SVG40, by treatment with dbcAMP. This result was confirmed by transfection of the NPC-1 promoter fused to the luciferase reporter into Y-1 cells that were treated with 1 mM cAMP. The results (Fig. 1A) indicate that cAMP alone induced four and five-fold increases in NPC-1 promoter activity

at 12 and 24 h respectively. To explore whether this effect was mediated through cAMP response binding protein (CREB), Y-1 cells were transfected with 80 ng of a CREB expression plasmid and concurrently treated with 1 mM cAMP. This resulted in time-dependent increases in promoter activity, with the first significant response observed as early as 3 h and five-fold increases by 24 h (Fig. 1B). The role for endogenous CREB was then tested by transfection of ACREB, a vector that serves as a dominant negative in competition with CREB for CRE (11). ACREB attenuated the cAMP response at 12 h and extinguished it at 24 h (Fig. 1A). We then undertook determination of whether protein kinase A (PKA) was in the cascade of events leading to NPC-1 transactivation, using three approaches. The first was co-transfection of a plasmid overexpressing the catalytic isoform of PKA. This resulted in a modest but significant increase in NPC-1 promoter activity (Fig. 2A $p < 0.05$). The mutant form of PKA (mPKA) displayed no capacity to increase promoter activity. When plasmids expressing PKA and CREB were co-transfected, the NPC-1 reporter signal was increased 2-3 fold over PKA or CREB alone (Fig. 2A, $p < 0.01$). As further shown in Figure 2A, the synergy between PKA and CREB did not occur in the presence of the dominant negative form of CREB, ACREB. The second approach was to treat Y-1 cells with the PKA inhibitor H-89, resulting in significant reduction in basal ($p < 0.05$) and complete abrogation of cAMP induction of cAMP-induced promoter activity (Figure 2B). No inhibition was observed when cells were treated with the MAP kinase inhibitor PD 98059 (Fig. 2B). Further confirmation that cAMP was acting through PKA in activation of NPC-1 transcription was acquired by transfecting of the NPC-1 and Renilla constructs into two adrenal cell lines, Y-1 and Kin-8. When both lines were treated with doses of 50 μ M-1 mM cAMP, there were dose-dependent increases in NPC-1 promoter activity (Fig. 2c). In the Kin-8 line, a Y-1 derivative deficient in, but not devoid of PKA (12), NPC-1 promoter activity was significantly lower at 0.2-1.0 mM cAMP concentrations (Fig. 2C). Thus, there was a reduced NPC-1 promoter response to

CREB in the presence of mutant PKA, when there was a pharmacological blockade of PKA and in a cell line deficient in PKA. Taken together, this is solid evidence that cAMP is stimulating NPC-1 transcription through the linear PKA pathway.

Regions of the NPC-1 promoter mediating cAMP responses

We then undertook deletion analysis to determine the promoter regions involved in cAMP-CREB responses (Fig. 3). Two potential CRE sites had been previously identified by MATInspector analysis of the 5' flanking region of the NPC-1 promoter, at -430 and -120 bp upstream of the translation initiation codon (ATG). Among constructs tested, the minimal promoter fragment required for both basal and CREB-cAMP responses consisted of nucleotides found -186 bp upstream of the transcription initiation codon and including one of the potential CRE (Fig. 3). A second fragment, at -296 bp, which also contains the most proximal of the two CRE sites, displayed a similar response. Promoter fragments from -944 and -636 bp upstream of the ATG, and containing the two CRE sites had increased CREB-cAMP response relative to the two shorter constructs ($p < 0.05$). The two longest fragments, -1811 and -1266 displayed a third class of response that was greater than the all more abbreviated promoter constructs ($p < 0.05$).

To test the ability of each of the potential CRE sites to interact with CREB, double stranded oligonucleotides were synthesized representing the core CRE sequence and flanking nucleotides (Table 1). Recombinant CREB was then employed in electromobility shift assays (EMSA) to establish whether these were authentic CREB binding sites. The results (Fig. 4A) revealed formation of a well-defined low-mobility complex for recombinant CREB with a consensus CRE sequence and with each of the oligonucleotides representing the putative CRE of the NPC-1 promoter. Addition of unlabeled oligonucleotides representing each of the sequences resulted in dose-dependent inhibition of formation of the low mobility complex (Fig. 4A). Oligonucleotides bearing mutations in the core CRE

consensus sequence (Table 1) were incapable of binding recombinant CREB and likewise incapable of interfering with the formation of complex between recombinant CREB and the NPC-1 CRE sites (Fig. 4B).

To determine the biological authenticity of the endogenous CREB binding to the proximal and distal CRE sites of pig NPC-1 promoter, nuclear extract from dbcAMP-stimulated Y-1 cells was subjected to EMSA with cognate labeled oligonucleotides in the presence or absence of antibody specific to the ATF family (CREB, CREM and ATF-1). A complex formed between the nuclear extract and each of the probes that migrated similarly to the complex formed with the recombinant CREB. The incubation with the Y-1 nuclear extract with the ATF antibody was found to interfere with the complex formation and to result in a super shift of the band (Fig. 5). Together these observations confirm that the elements in the NPC-1 promoter with consensus to known CRE binding sequences are authentic CRE sites.

To define the importance of the two CRE sites in transactivation of the NPC-1 promoter, three new promoter-reporter constructs (1.8 kb) were developed, so that one or both CRE were mutated. These were then co-transfected into Y-1 cells with the plasmid expressing CREB and stimulated with dbcAMP, as in previous experiments. The results (Fig. 6) demonstrate that either of the CRE sites can direct the response to cAMP and CREB and either CRE site can induce promoter activity equivalent to the wild type construct of the same length. Mutation of both sites attenuated the cAMP-CREB response (Fig. 6) indicating that CREB transactivates transcription through one or both cAMP sites.

Interactions with SF-1

The magnitude of response of the NPC-1 promoter in steroidogenic cells varies with the steroidogenic cell type, with Y-1 cells providing the greatest signal (9). We hypothesized that these differences were due to variation in the abundance of the orphan nuclear receptor, SF-1, which is robustly expressed in

Y-1 cells (13) and has been shown to synergize with CRE in induction of cAMP responses (14). To test this hypothesis, a plasmid constitutively overexpressing SF-1 was co-transfected along with the 1.8 kb NPC-1 promoter construct, into the cell line that provided the most modest dbcAMP response, the SVG40 human granulosa cells. Transfection of SF-1 alone increased promoter activity by approximately two fold ($p < 0.05$). The response was greater when cells thus treated were incubated with 1mM cAMP ($p < 0.01$, Fig. 7A). The combination of SF-1 and CREB provided a response similar to SF-1 alone or SF-1 along with dbcAMP. A startling increase was achieved when cells expressing both SF-1 and CREB were treated with dbcAMP, to more than five fold over control ($p < 0.001$). Finally, the specificity of the SF-1 response was tested by co-transfection of a plasmid expressing SF-1 in reversed orientation, resulting in a greatly reduced response to CREB and dbcAMP, and suggesting the authenticity of the SF-1 response (Fig. 7A).

Inspection of the NPC-1 promoter suggested one potential SF-1 binding site was present, between the two CRE sites, at 245 bp upstream of the ATG. Oligonucleotides containing this sequence and the consensus SF-1 sequence were synthesized and employed in EMSA. The results (Fig. 7B) indicate that the consensus SF-1 oligonucleotide bound to recombinant SF-1, resulting in a single complex. The putative SF-1 sequence of the NPC-1 promoter migrated identically in the presence of recombinant SF-1. Further, unlabeled oligonucleotides from the NPC-1 SF-1 sequence completely displaced labeled SF-1 oligonucleotides from the recombinant protein, indicating the specificity of the response (Fig. 7B). We then mutated the SF-1 binding sequence in the NPC-1 promoter (Table 1), which had little effect on the binding of wild type SF-1 oligonucleotide to recombinant SF-1 (Fig. 7C). Further, the mutated form did not bind to recombinant SF-1 (Fig. 7C). Taken together, these experiments identify a SF-1 binding site that appears to interact with the cAMP pathway in synergistic activation of NPC-1 promoter. To further confirm this, the SF-1 site was mutated

in the 1.8 kb promoter fragment, and the ability of the constitutive expression of SF-1 to enhance promoter activity was tested. The results (Fig. 8A) demonstrate that this mutation greatly attenuated the transactivation of the promoter in response to SF-1. In addition, mutation of either or both the proximal and distal CRE site eliminated the response to constitutive SF-1, indicating that these elements are functionally linked in regulation of the NPC-1 promoter. We then undertook the determination of whether the SF-1 site was significant to the dbcAMP induction of promoter activity using the 0.6 kb promoter fragment mutated at the putative SF-1 site, the proximal CRE site, the distal CRE site or both CRE sites. The results indicate, as expected, mutation of the CRE sites reduces the promoter activity in the presence of cAMP (Fig. 8B). Similar attenuation was observed when the SF-1 site was mutated, further demonstrating a role for this promoter sequence in regulation of NPC-1 transcription.

Histone Modification and NPC-1 transcription

To test the possibility that modification of histones is related to the cAMP-induced induction of NPC transcription, we first treated Y-1 cells with one of two inhibitors of histone deacetylase (HDAC), Trichostatin A or butyrate. Both reagents have the net effect of hyperacetylation of histones (15). Northern analysis (Fig 9A) revealed that both HDAC inhibitors increased the abundance of NPC-1 mRNA in this cell model. This effect appeared to be additive or synergistic with cAMP, as the combination induced further increases in NPC-1 transcript abundance. Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) were employed to examine this phenomenon further. Two trials were undertaken, in the first Y-1 cells were transfected with the 1.8 kb NPC-1 promoter and incubated with dbcAMP for 6 h. In the second trial, primary porcine granulosa cells in culture were treated with dbcAMP for 6 h. Following incubation in both cell types, antibodies directed against histone H-3 acetylated on lys-14 were used to precipitate total chromatin which was reversibly crosslinked to DNA to which it

bound. The DNA associated with acetylated histone was amplified by PCR using primers specific to the NPC-1 promoter region of 500 bp that included both CRE. There was no PCR amplification of immunoprecipitates using IgG alone (Fig. 9B), and primers directed to the open reading frame of the NPC-1 gene did not produce a PCR product in any of the immunoprecipitated samples (data not shown). As can be seen in Fig. 9B, treatment of Y-1 cells with 1 mM dbcAMP caused a 2-3 fold increase in this NPC-1 promoter fragment binding associated with acetylated histone H-3. The results were nearly identical for the endogenous promoter in primary pig granulosa cells (Fig. 9B). Similar studies were then performed using an antibody directed against histone H-3 phosphorylated at ser-10. The results (Fig. 9B) indicate a greater response, with 4-5 fold more of the transfected promoter sequence precipitating with phosphorylated H-3 in the presence of 1mM dbcAMP. Association of phosphorylated H-3 with the endogenous promoter was increased 2-3 fold in pig granulosa cells treated with dbcAMP. Finally, we immunoprecipitated a co-activator protein known to have histone acetyl transferase (HAT) activity, CREB binding protein (CPB). This co-activator was found not to be associated with the CRE region of the NPC-1 promoter in Y-1 cells in the absence of dbcAMP, but provided a strong band in the presence of this intracellular messenger. It associated with the endogenous promoter in pig granulosa cells, and this association was increased 3-5 fold in the cells treated with dbcAMP. Together these results indicate that dbcAMP increases the acetylation and phosphorylation of histones associated with the NPC-1 promoter and induces the recruitment of CBP to the promoter region that includes both CRE elements.

DISCUSSION

The NPC-1 protein mediates an essential step in the pathway by which low density lipoprotein (LDL)-borne cholesterol is assimilated into intracellular cholesterol pools (16). The LDL pathway serves as the most important primary

source of cholesterol for steroidogenesis in many species (6). Steroidogenesis is provoked by extracellular hormones via intracellular pathways that include cAMP, PKA, and the phosphorylation of CREB (17). As many of the elements that modulate LDL importation (e.g. the LDL receptor) are likewise driven by the downstream effectors of cAMP, it was expected that NPC-1 would be similarly regulated. Nonetheless, the prevailing view (10, 18, 19) is that NPC-1 functions as a housekeeping gene, and whatever control exists is post-transcriptional. Our findings provide strong evidence in contrast to this view. Overexpression of the catalytic subunit of PKA, or the PKA phosphorylation target, CREB, increased the signal from NPC-1 promoter-luciferase constructs. The response to overexpression of CREB was dramatically increased in cells treated with dbcAMP, or in cells where the PKA catalytic subunit was expressed. The failure of mutant constructs of both CREB and PKA to produce these effects, and their abrogation by blockade of PKA activity indicate the specificity of this response. Further, NPC-1 promoter activity was reduced in the Kin-8 cell line, known to be deficient in PKA (12). It is clear that CREB is not the sole transcription factor activated by cAMP (17) nor is CREB activated solely by cAMP through PKA (20). Nonetheless, the ensemble of the data confirms our preliminary observations of cAMP regulation of NPC-1 expression (9), and make a strong case for regulation of the porcine NPC-1 gene by the cAMP pathway (21). We suspect this to be the case for the mouse NPC-1 gene as well, as MATInspector analysis of the 5' flanking region in this species revealed five potential CRE sites in the first 500 bp upstream of the ATG (11). Further, the 2.0 kb mouse promoter-luciferase construct transfected into Y-1 cells responded to cAMP and CREB with the same magnitude of increase as the pig promoter (N. Gévry and B.D. Murphy, unpublished observations).

The deletion analysis of the porcine NPC-1 promoter conforms to the results for the human sequence for constitutive expression reported by Watari et al. (22), if the promoter constructs in that study are numbered from the

translation initiation codon. In the human sequence, elements essential to the constitutive response are found between -232 and -158 from the ATG (22). The corresponding sequence in the pig is -186 to -121. In the pig the constitutive response was constant throughout the larger fragments, while in the human sequence, constructs larger than 232 bp upstream of the ATG displayed more robust activity than did the -177 fragment.

Our previous study indicated the presence of two sites with sequence homology to CRE elements, one at -120 and the second at -430. EMSA employing recombinant CREB demonstrated that oligonucleotides derived from these sites formed a complex that migrated identically to the consensus CRE sequence, indicating their authenticity as sites of CREB binding in the porcine promoter. Deletion analysis revealed that the 1.8 kb promoter, in the presence of two intact CRE's, provided the greatest response. More abbreviated fragments containing both sites displayed a significantly higher promoter-driven luciferase signal than did those containing a single site. Mutational analysis indicated that the full-length promoter required only one of the two sites for maximal promoter activity in the presence of CREB and cAMP. These results suggest the presence of other sites on the full-length promoter that respond to phosphorylated CREB. These may be sequences with lower homology to the consensus CRE (23).

Promoter analysis indicated that orphan nuclear receptor SF-1 also plays a role in cAMP induction of NPC-1 transcription, as its overexpression increased the full-length signal. Further, there were additive effects with SF-1 and dbcAMP. A DNA sequence representing a SF-1 consensus recognition site is present at 245 bp upstream of the ATG (9). In the present study, EMSA, employing recombinant SF-1, confirmed its authenticity, and mutation of the site eliminated its capacity to respond to the constitutive SF-1 and dbcAMP. We propose that SF-1 binds to its cognate promoter element and synergises with CREB to increase transactivation of the NPC-1 gene. This interaction was first suggested by Parker and Schimmer (24) for the cytochrome P450 side chain

cleavage enzyme, and has been observed with other genes associated with steroidogenesis (25). A spectrum of interaction between SF-1 and cAMP in modulation of promoter activity has been described, ranging from additivity to synergy (26). Current data indicate that the NPC-1 promoter best fits the latter description. The SF-1-cAMP interaction explains the consistently higher NPC-1 promoter activity in response to cAMP in the Y-1 line, as these cells strongly express SF-1 (13). SF-1 shows a pattern of expression generally specific to endocrine and neural tissues (27). Although NPC-1 is ubiquitously expressed (10), we showed higher NPC-1 transcript levels in steroidogenic tissues (9), consistent with interaction between SF-1 and cAMP in its regulation. Several mechanisms of SF-1-cAMP interaction have been proposed, including direct interactions between CREB and SF-1 and recruitment of co-activators by the orphan nuclear receptor (26, 28). Indeed, in the present investigation, mutation of the proximal or distal CRE site eliminated the promoter response to constitutive SF-1 and dbcAMP. Further investigation will be necessary to determine the mechanisms of SF-1 and CREB in transactivation of the NPC-1 gene.

Among the important roles played by co-activators in transcription is the covalent modification of histones, which may be obligatory for the transactivation by CREB (29). Acetylation of histone H-3 in response to 8-Br-cAMP regulates the promoter of another cholesterol transport gene, steroidogenic acute regulatory protein (StAR) (30). We therefore employed two HDAC inhibitors, Trichostatin A and butyrate that have the net effect of hyperacetylating histones and consequent activation of transcription (31). Increases in dbcAMP-induced accumulation of NPC-1 transcripts in Y-1 cells occurred in the presence of HDAC inhibitors, indicating that the NPC-1 transcriptional response was coupled to acetylation of histone(s). This concept was further tested by ChIP analysis employing an antiserum against acetylated histone H-3 and primers that bracket the CRE's in the promoter. Clear increases

in promoter abundance associated with acetylated chromatin ensued after dbcAMP treatment both in Y-1 cell expressing a transfected promoter, and in primary porcine granulosa cells. These results occurred over the same time frame observed with another cholesterol transfer protein, the steroidogenic acute regulatory protein StAR (30). These results are further in harmony with observations of histone H-3 acetylation associated with the transactivation of a further two genes in the cholesterol homeostasis group, HMG-CoA reductase and the LDL receptor (32) It is possible that acetylation of other histones, particularly H4 may be associated with the NPC-1 promoter in response to cAMP. This concept merits further study.

CBP is a co-activator that associates with phosphorylated CREB (33), and SF-1 (34) and appears to bridge between CREB and the transcriptional complex (35). It also has inherent HAT activity, and may recruit other proteins with HAT activity (31). It has been shown to be necessary for transactivation of genes in the cholesterol homeostasis pathway (36). In the present investigation, the association of CBP with the CRE region of both the endogenous and transfected NPC-1 promoters in response to dbcAMP provides circumstantial evidence that CBP contributes to acetylation of histones associated with transactivation of the NPC-1 gene.

A second chromatin modification of importance to gene transcription is phosphorylation (37). Histone H-3 can be phosphorylated *in vitro* by the catalytic subunit of PKA (38) and FSH-induced histone H-3 phosphorylation in rat granulosa cells is blocked by PKA inhibitors (39). Phosphorylation and acetylation of histone H-3 are linked, and phosphorylation may precede acetylation (31, 37). Further, global phosphorylation of cells has pervasive effects on acetylation of histones,(40). Our ChIP analysis permits us to conclude that both the endogenous and transfected NPC-1 promoter sequences associate with phosphorylated as well as acetylated histone H-3. Further, there is a substantial increase in NPC-1-association with phosphorylated histone H-3 following

dbcAMP stimulation. Although histone H-3 phosphorylation has been traditionally linked to cell proliferation (37), there is precedent for an association with differentiation (38). NPC-1 expression increases in pig granulosa cells during differentiation (9), and the present study supports the view that histone H-3 phosphorylation plays a role in this process.

In summary, we present data demonstrating that NPC-1 transcription is regulated by the cAMP pathway. We propose that ligands that activate this signaling cascade direct NPC-1 expression via CREB, which associates as a dimer with the palindromic CRE sites (21) present in the porcine promoter.

Phosphorylation of CREB is sufficient to activate expression of its target genes, but additional cofactors are necessary for maximal response (21). An important cofactor is CBP, which is recruited to the transcriptional complex by phosphorylation of CREB. CBP has histone acetylase activity, resulting in acetylation of histone H-3 associated with the NPC-1 promoter, thereby increasing CREB-induced transactivation. There is evidence that SF-1-induced transactivation is enhanced in steroidogenic enzyme genes by SF-1-CBP interactions (34). Concurrent histone H-3 phosphorylation by PKA or by another kinase downstream from PKA further enhances the transcriptional responses, by mechanisms that are not well understood. It is certain that there are other pathways that modulate the expression of this gene, in particular, those associated with intracellular sterol regulation. These are under active investigation.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid Constructions

The 1.8 kb of NPC-1 gene promoter was cloned into pGL3 vector (Promega, Nepean, ON) and various deletion constructs were prepared by PCR with EcoRI and MluI insertions for directed cloning. Potential CRE and the SF-1 sites were mutated with the QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit

(Stratagene, LaJolla, CA). The wild type and mutant expression vectors pRC/RSV-PKA were a gift Dr. R. Maurer (Oregon Health Sciences University, Portland, OR); pRc/RSV-CREB from Dr. R. Goodman (Oregon Health Sciences University, Portland, OR); pRc/CMV-ACREB from Dr. C. Vinson (National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD); and expression vectors pRC/CMV-cSF-1, pRC/CMV-rSF-1 and pGEX-1 λ T-SF-1 for the production of fusion proteins were kindly provided by Dr. K. L. Parker (University of Texas Southwestern, Dallas, TX). All of plasmids for transfection were prepared using the Maxi Prep kit (Qiagen, Mississauga, ON).

Cell Culture, Transient Transfections, and Promotor Activity Assays

Porcine granulosa cells were aspirated from 3-5 mm follicles from ovaries recovered from pigs at slaughter and cultured in minimum essential medium (MEM, Gibco BRL, Burlington, ON) containing 1 mg/l insulin (Sigma, Oakville, ON), 0.1 mM non-essential amino acids (Gibco BRL), 5×10^4 UI/l penicillin (Gibco BRL), 50 μ g/l streptomycin (Gibco BRL), 0.5mg/l fungizone (Gibco BRL), and 10% fetal calf serum (Gibco BRL). Y-1 mouse adrenal tumor cells (CCL-79, ATCC, Manassas, VA) and Y-1 Kin-8 (gift of Dr. B. Schimmer, University of Toronto, Toronto, ON) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (Gibco/BRL, Burlington, ON) supplemented with 10% horse serum, 2.5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. SVG40 human granulosa cells (gift of Dr. P. Leung, University of British Columbia, Vancouver, BC) were cultured in Opti-MEM (Gibco/BRL), supplemented with 5 % FBS and antibiotics. The cells were transfected with 100 nM/well with deletion constructs of the pig NPC-1 promoter in the vector pGL3 using Effectene reagent (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Cells were co-transfected with the SV40 Renilla luciferase control vector pRL.SV40 (Promega) at a ratio of 10:1 of pNPC-LUC :pRL.SV40 to normalize results for transfection efficiency. The co-transfection experiments were performed with the transfection of 80 ng of CREB expression vectors and/or 80 ng PKA and/or 20 ng for the SF-1 expression vectors or an

empty expression vector for correction of total DNA. Some cultures were treated with 1 mM dbcAMP (Sigma, Oakville, ON) for 12h or 24 h and/or pretreated with the PKA inhibitor H89 or the MAPK inhibitor PD 98059 (10 μ M and 50 μ M respectively; Sigma) for 1 h. Luciferase activity was detected by the Promega Dual Luciferase Assay system and chemiluminescence measured in a Berthold 9501 luminometer. Control transfections included the inclusion of an equal amount of the promoter-less pGL3 basic plasmid (Promega).

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Nuclear extract were prepared from Y-1 cells treated with 1mM cAMP for 24 h according to the method of and Andrews and Faller (41). The EMSAs were performed as described (42) with some modifications. Double stranded oligonucleotides corresponding to the NPC-1 promoter region (Table 1) were labeled with α -³²P-deoxy-CTP by polynucleotide kinase. In general, Y-1 nuclear extract, or recombinant CREB or SF-1 were incubated with 1 ng of labelled probe in binding buffer (20% glycerol, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,25 mg/ml poly(dI-dC)-(dI-dC)) for 20 min at room temperature. For the supershift assay, ATF-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) was used and the binding reactions were incubated for a further 45 min on ice. The binding reaction products were loaded on a 6% nondenaturing polyacrylamide gel in 0.25 x Tris-buffered EDTA. Unlabeled wild type and mutant oligonucleotides were added to demonstrate specificity of binding.

RNA analysis

RNA was isolated from untreated cells or from cells treated with 1 mM dbcAMP (Sigma), Trichostatin A (100 ng/ml; BIOMOL, Plymouth Meeting, PA) or 15 mM sodium butyrate for 4 hours. Northern blot analysis of total RNA was performed as previously described (9). In brief, cultured cells were homogenized in 4 M guanidine isothiocyanate (Gibco/BRL), 26,5 mM sodium acetate (Sigma) and 0,12 M β -mercaptoethanol (Sigma) and stored at -70° C until analysis. Total

RNA was purified with Qiagen Easy Spin columns (Qiagen). Aliquots of 15 μg total RNA were subjected to electrophoresis on 1% agarose-formaldehyde gels using a 20 mM morpholinopropanesulfonic acid buffer (pH 7.0), transferred overnight to nylon membranes and cross-linked for 30 sec at 150 mJ in a UV chamber (Bio-Rad GS Gene Linker, Richmond, CA). Blots were hybridized with a 1 kb probe from the 5' region of the porcine NPC-1 open reading frame. All probes were labelled by random priming (Boehringer Mannheim, Laval, QC). Hybridized blots were subjected to phosphorimaging for visualization and quantitative estimate of the most prominent NPC-1 transcript.

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)

Chromatin immunoprecipitation assays were performed as described by Kuo and Allis (43) with minor modifications. The endogenous promoter was tested in primary porcine granulosa cells cultured for 24 h after plating. The 1.8 kb porcine NPC-1 promoter was transfected into Y-1 cells according to the procedures described above. At 24 h after transfection, Y-1 cells and primary porcine granulosa cells were treated with 1 mM dibutyl cAMP (Sigma) for 6 h and cross-linked by addition of formaldehyde to the medium at a final concentration of 1% for 10 min at 37°C. Cells were washed in phosphate-buffered saline, resuspended in 200 μl of ChIP Lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 and protease inhibitors) and sonicated with a Branson Sonifier 450 at power setting 2 with 10-s pulses at duty cycle 90. The chromatin solution was diluted 10 fold in ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris, pH 8.1, 16.7 mM NaCl and protease inhibitors). One tenth of the lysate was used for purification of total DNA. Each sample was precleared by incubating with 80 μl salmon sperm DNA/protein A-agarose 50% gel slurry (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY) for 30 min at 4°C. An aliquot of 5 μg of anti-acetyl histone H-3, anti-phosphorylated H-3 or CBP antibodies (Upstate Biotechnology) were added and immunoprecipitated at 4°C overnight. The immunoprecipitate was collected using salmon sperm

DNA/protein A-agarose and washed once with the following buffers in sequence: Low salt wash buffer (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl); High Salt Wash Buffer (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20mM Tris-HCl 8,1, 500 mM NaCl); LiCl wash buffer (0,25M LiCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,1); TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA). DNA-histone or DNA-CBP protein cross-links were reversed by incubation at 65°C for 4 hours followed by proteinase K treatment. DNA was recovered by purification with the Qiaquick PCR purification column (Qiagen). PCR was performed using total DNA as control, and immunoprecipitated DNA in presence of 2 μ Ci α -³²P-dCTP with a temperature cycle of 45 s at 94 C, 45 s at 52 C and 30 s at 72 C. The primers used for the PCR were CHA (5'- AAGGGG AGAAATGAGTTGAAGC-3') and CH1 (5'-GAATTCCAGCAGGAGGAG GCCGAA-3'). Primers for the open reading frame of the gene were employed as a control to demonstrate specificity of amplification of DNA associated with immunoprecipitated chromatin or CPB. As a second control, rabbit IgG was used in place of the histone or CBP antibodies to precipitate cell lysates. PCR products were separated on 6% nondenaturing polyacrylamide gels and subjected to phosphorimaging for visualization and quantification.

Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicate. Luciferase data are expressed as the mean \pm SEM. Analysis of variance was performed, and in the presence of a significant F value, followed by the Tukey-Kramer test to establish differences between treatment means. The minimum level of significance accepted was $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGEMENTS

The technical assistance of Mira Dobias and Sandra Ledoux is gratefully acknowledged.

Address reprint requests to: Dr. Bruce D. Murphy, Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe Québec Canada J2S7C6, email [REDACTED]

This work was supported by Grant MT-11018 from the Canadian Institutes of Health Research to B.D.M. and by grants to P. S-C. from Centre nationale de la recherche scientifique, INSERM, Centre hospitalier universitaire régionale, Fondation de la recherche médicale, Rhône-Poulenc Rorer Inc. (Bioavenir France) and Association pour la recherche contre le cancer.

REFERENCES

1. **Ioannou YA** 2001 Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:657-68.
2. **Pentchev PG, Brady RO, Blanchette-Mackie EJ, et al.** 1994 The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1225:235-43
3. **Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Patel S, Proestel M, Weintraub H** 1986 The cholesterol storage disorder of the mutant BALB/c mouse. A primary genetic lesion closely linked to defective esterification of exogenously derived cholesterol and its relationship to human type C Niemann-Pick disease. *J Biol Chem* 261:2772-7
4. **Higgins ME, Davies, J.P., Chen, F.W., Ioannou Y.A.** 1999 Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab* 68:1-13
5. **Ioannou YA** 2000 The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Mol Genet Metab* 71:175-181
6. **Murphy BD, Silavin SL** 1989 Luteotrophic agents and steroid substrate utilization. *Oxf Rev Reprod Biol* 11:179-223
7. **Roff CF, Strauss III JF, Goldin E, et al.** 1993 The murine Niemann-Pick type C lesion affects testosterone production. *Endocrinology* 133:2913-23

8. **Brown DE, Thrall MA, Walkley U, et al.** 1996 Metabolic abnormalities in feline Niemann-Pick type C heterozygotes. *J Inherit Metab Dis* 19:319-30
9. **Gevry N, Lacroix D, Song JH, Pescador N, Dobias M, Murphy BD** 2002 Porcine Niemann Pick-C1 protein is expressed in steroidogenic tissues and modulated by cAMP. *Endocrinology* 143:708-16
10. **Watari H, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, et al.** 2000 Determinants of NPC1 expression and action: key promoter regions, posttranscriptional control, and the importance of a "cysteine-rich" loop. *Exp Cell Res* 259:247-56.
11. **Gévry N, Murphy BD** 2002 The role and regulation of the Niemann-Pick C-1 gene in adrenal steroidogenesis. *Endocrine Research* 28:407-416
12. **Schimmer BP, Wong M, O'Brien D, Schulz P** 1986 Recovery of hormonal regulation in protein kinase defective adrenal cells through DNA-mediated gene transfer. *J Cell Physiol* 126:77-83
13. **Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, et al.** 1996 Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol* 10:1261-72.
14. **Young M, McPhaul MJ** 1998 A steroidogenic factor-1-binding site and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate response element-like elements are required for the activity of the rat aromatase promoter in rat Leydig tumor cell lines. *Endocrinology* 139:5082-93.
15. **Jung M** 2001 Inhibitors of histone deacetylase as new anticancer agents. *Curr Med Chem* 8:1505-11.
16. **Zhang M, Dwyer NK, Neufeld EB, et al.** 2001 Sterol-modulated glycolipid sorting occurs in niemann-pick C1 late endosomes. *J Biol Chem* 276:3417-25.
17. **Richards JS** 2001 New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 15:209-18.

18. **Ory DS** 2000 Niemann-Pick type C: A disorder of cellular cholesterol trafficking. *Biochim. Biophys Acta* 1529:331-339
19. **Morris JA, Zhang D, Coleman KG, Nagle J, Pentchev PG, Carstea ED** 1999 The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann- Pick C1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 261:493-8
20. **De Cesare D, Sassone-Corsi P** 2000 Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64:343-69
21. **Mayr B, Montminy M** 2001 Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599-609.
22. **Watari H, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer, NK, Watari, M, Burd, CG, Patel S, Pentchev PG, Strauss III JF** 2000 Determinants of NPC1 expression and action: Key promoter regions, posttranscriptional control and the importance of the "cysteine-rich" loop. *Exp Cell Res* 259:247-256
23. **Montminy M** 1997 Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Ann Rev Biochem* 66:807-822
24. **Parker KL, Schimmer BP** 1995 Transcriptional regulation of the genes encoding the cytochrome P-450 steroid hydroxylases. *Vitam Horm* 51:339-70
25. **Carlone DL, Richards JS** 1997 Evidence that functional interactions of CREB and SF-1 mediate hormone regulated expression of the aromatase gene in granulosa cells and constitutive expression in R2C cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61:223-31
26. **Ito M, Park Y, Weck J, Mayo KE, Jameson JL** 2000 Synergistic activation of the inhibin alpha-promoter by steroidogenic factor-1 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Mol Endocrinol* 14:66-81
27. **Parker KL, Schimmer BP** 1997 Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18:361-77.

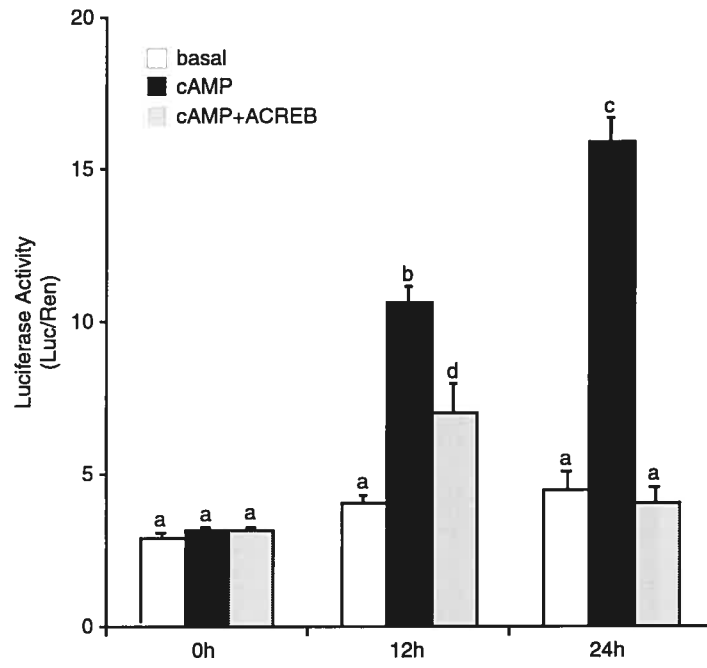
28. **Jacob AL, Lund J, Martinez P, Hedin L** 2001 Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator gcn5. *J Biol Chem* 276:37659-64.
29. **Korzus E, Torchia J, Rose DW, et al.** 1998 Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279:703-7.
30. **Christenson LK, Stouffer RL, Strauss III JF** 2001 Quantitative analysis of the hormone-induced hyperacetylation of histone H3 associated with the steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. *J Biol Chem* 276:27392-9.
31. **Roth SY, Denu JM, Allis CD** 2001 Histone Acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70:81-120.
32. **Bennett MK, Osborne TF** 2000 Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6340-4.
33. **Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH** 1993 Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365:855-9.
34. **Monte D, DeWitte F, Hum DW** 1998 Regulation of the human P450_{scc} gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300. *J Biol Chem* 273:4585-91
35. **Shaywitz AJ, Greenberg ME** 1999 CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-61
36. **Ericsson J, Edwards PA** 1998 CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J Biol Chem* 273:17865-70.

37. **Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P** 2000 Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103:263-71.
38. **DeManno DA, Cottom JE, Kline MP, Peters CA, Maizels ET, Hunzicker-Dunn M** 1999 Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Mol Endocrinol* 13:91-105.
39. **Salvador LM, Park Y, Cottom J, et al.** 2001 Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 276:40146-55.
40. **Galasinski SC, Louie DF, Gloor KK, Resing KA, Ahn NG** 2002 Global regulation of post-translational modifications of core histones. *J Biol Chem* (in press)
41. **Andrews NC, Faller DV** 1991 A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19:2499
42. **Murphy BD, Lalli E, Walsh LP, et al.** 2001 Heat shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Endocrinol* 15:1255-63.
43. **Kuo MH, Allis CD** 1999 In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19:425-33

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers employed in electromobility shift assays.

csCRE	5' -AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3'
	3' -TCTCTAACGGACTGCAGTCTCTCGATC-5'
dCRE	5' -CCCAACCCCTTGACGTGCCCCAGGGCG-3'
	3' -GGGTTGGGGAACGACGGGGGTCCGCG-5'
dCRE-mt	5' -CCCAACCCCTTTTTGTGCCCCAGGGCG-3'
	3' -GGGTTGGGGAACAAACACGGGGGTCCGCG-5'
pCRE	5' -GCCTTCCTTCCTGACCTGCGCGCGCAGCCAGCCGGCTCTGG-3'
	3' -CGGAAGGAAGGACTGGACGCGCGCGTCGGTCGGCCGAGACC-5'
pCRE-mt	5' -GCCTTCCTTCCTTTTCTGCGCGCGCAGCCAGCCGGCTCTGG-3'
	3' -CGGAAGGAAGGAAAAGACGCGCGCGTCGATCGGCCGAGACC-5'
csSF-1	5' -GGCTCTTGACCTTGAGCTTCCT-3'
	3' -CCGAGAACTGGAACGCAAGGA-5'
pSF-1	5' -GGTGCCGTGGCCTCACGAGGTCGGGTCCCGC-3'
	3' -CCACGGCACCGGAGTGCTCCAGCCCAGGGCG-5'
pSF-1-mt	5' -GGTGCCGTGGCAGAGAGAGGTCGGGTCCCGC-3'
	3' -CCACGGCACCGTCTCTCTCCAGCCCAGGGCG-5'

A.



B.

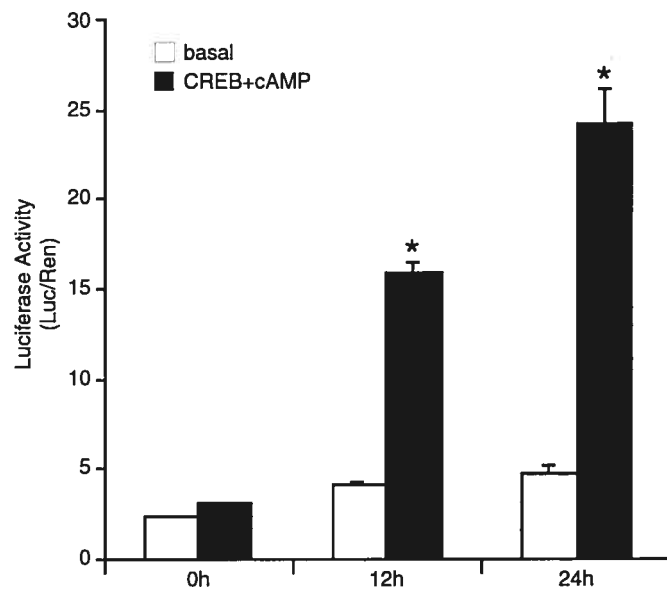
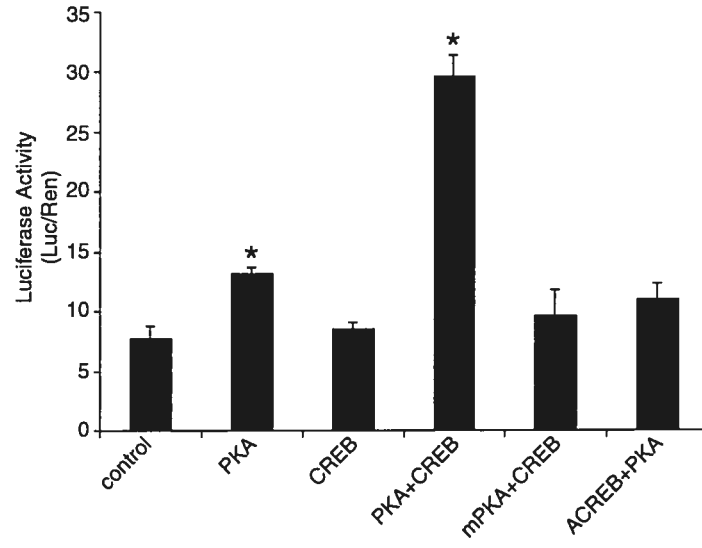
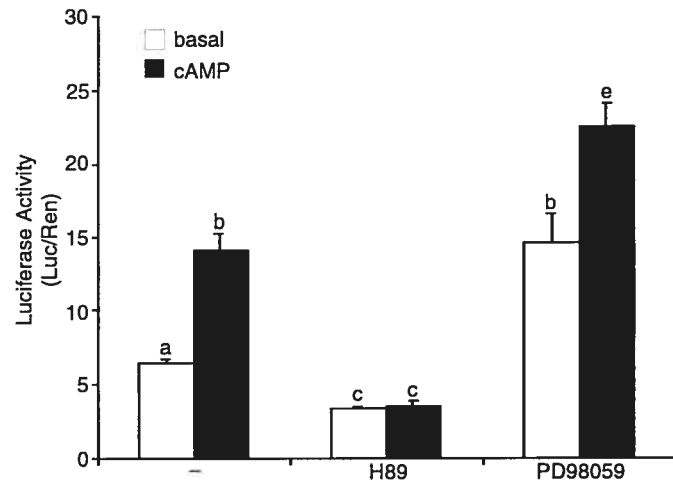


Fig. 1A. Treatment of Y-1 cells transfected with a plasmid constitutively expressing cAMP response element binding protein (CREB) with 1mM dibutyl cAMP (dbcAMP) increases NPC-1 promoter activity. Cells were transfected overnight with a plasmid expressing the 1.8 kb porcine NPC-1 promoter construct fused to the luciferase reporter. Concurrently, cultures represented by black bars were transfected with the CREB plasmid or with the ACREB, a dominant negative construct. All cultures were treated with dbcAMP and harvested at 0, 12 and 24 h after initiation of treatment. Bars represent mean \pm SEM of three independent experiments. Differing superscripts represent means that are significantly different from one another at $p < 0.05$. **1B.** The combination of dbcAMP and CREB increases NPC-1 promoter activity. Y-1 cells were transfected with a plasmids expressing CREB and the 1.8 kb NPC-1 promoter-luciferase construct, then treated with 1 mM dbcAMP. Cultures were terminated at 12 and 24 h and luciferase activity determined. Asterisks indicate differences from corresponding control values at $p < 0.05$.

A.



B.



C.

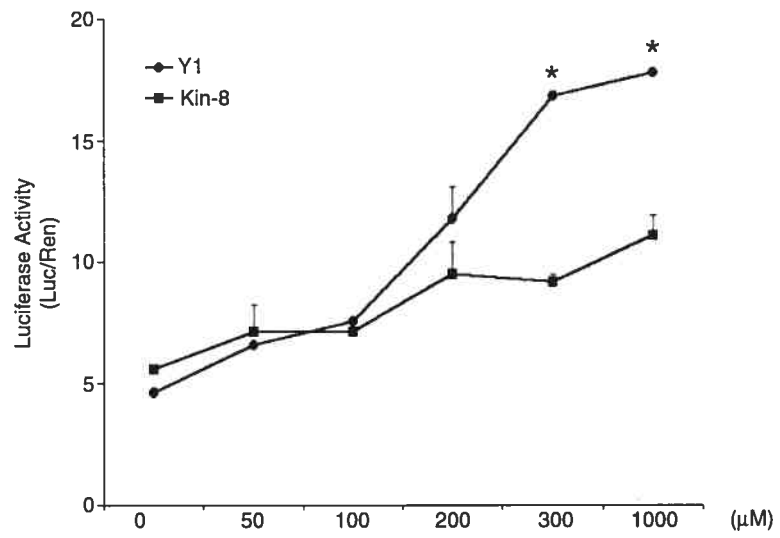


Fig. 2A. Protein kinase A (PKA) and CREB interact to increase NPC-1 promoter activity. Y-1 cells were transfected with the promoter-luciferase construct and with a plasmid overexpressing the catalytic subunit of PKA, PKA and CREB, mutant CREB (ACREB), mutant PKA (mPKA) and CREB, ACREB and PKA or an empty plasmid (control). Where indicated, cells were treated with 1mM dbcAMP and cultures were harvested at 24 h to determine luciferase signal abundance. Results represent means \pm SEM and the asterisk indicates means significantly in excess of control at $p < 0.05$.

2B. The protein kinase A inhibitor H-89 attenuates NPC-1 promoter activity in response to dbcAMP. Y-1 cells were pretreated with 10 μ M of the protein kinase A inhibitor H89 or 50 μ M of the MAP kinase inhibitor PD9809 for 1 h and then treated for 6 h with 1 mM dbcAMP.

2C. The response of the NPC-1 promoter is reduced in response to cAMP in the PKA deficient cell line Y-1 Kin 8. Y-1 and Kin-8 Cells were transfected with the 1.8 kb NPC-1 promoter-reporter construct, then treated ascending doses of dbcAMP for 24 h. Mean \pm SEM promoter activity, in terms of luciferase expression is presented, and means designated by asterisks are significantly different between the two cell types at $p < 0.05$.

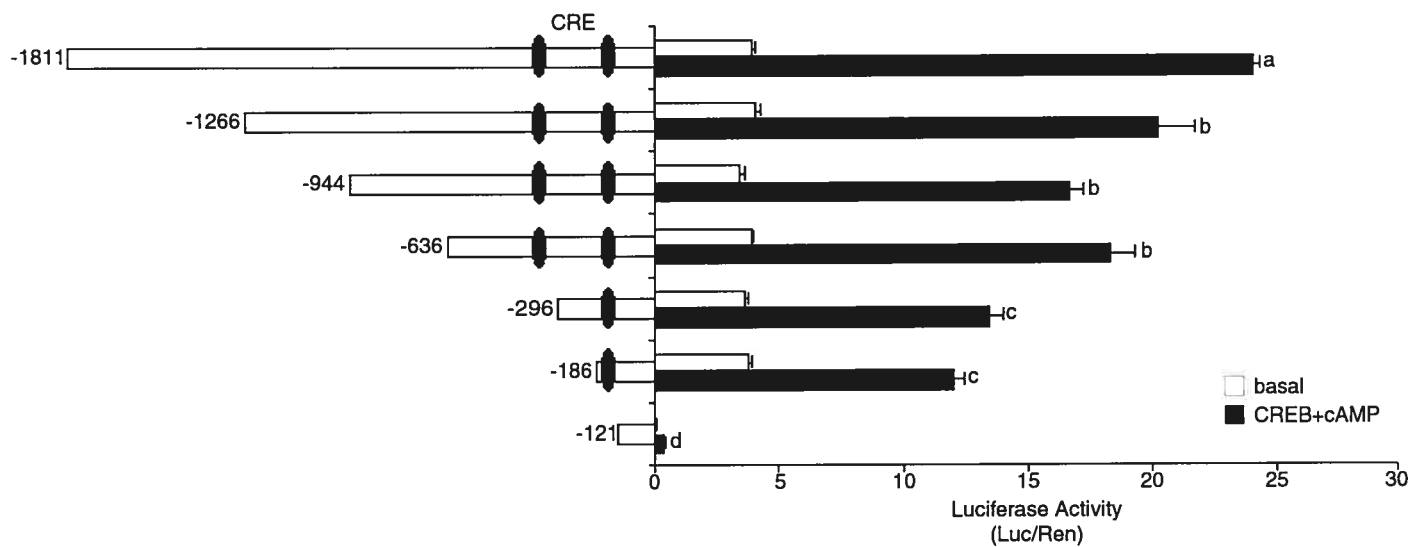


Fig 3. Deletion constructs of the NPC-1 promoter and the CREB-cAMP response. Promoter fragments fused to the luciferase reporter were transfected into Y-1 cells with or without the plasmid expressing CREB. All cultures were treated with 1 mM cAMP for 24 h. Approximate location of the potential CRE sites is indicated by the black oval. Means \pm SEM of triplicate transfection experiments are presented. Means bearing the same superscript (^{a, b, c}) are in homogenous subgroups ($p < 0.05$).

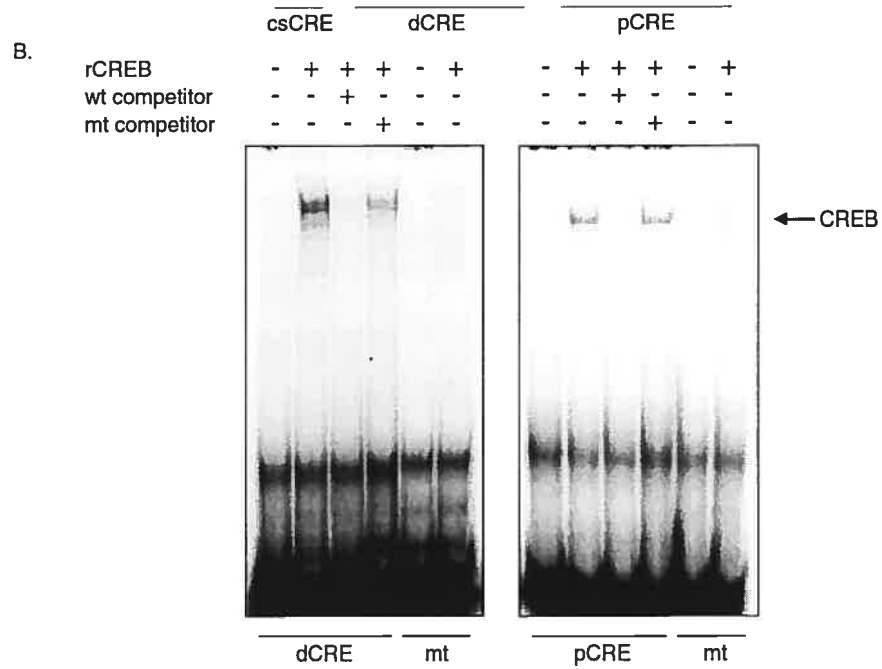
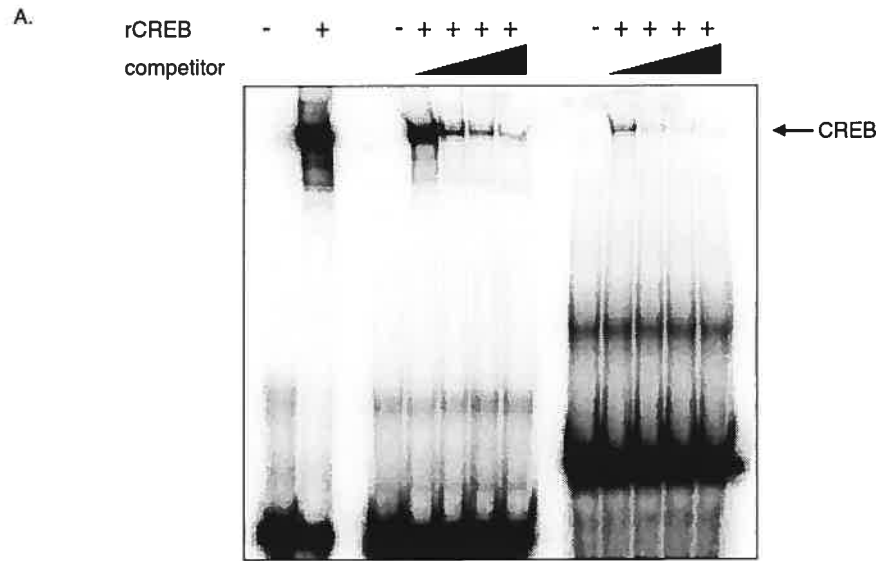


Fig 4A. Electromobility shift assays (EMSA) demonstrate the authenticity of CRE sites in the NPC-1 promoter. Recombinant CREB was incubated with double stranded oligonucleotides with consensus CRE sequence (csCRE, Table 1) or the proximal (pCRE) or distal (dCRE) sequence. In panel A, increasing amounts of unlabeled oligonucleotide were added to demonstrate specificity. In panel **4B**, unlabeled or mutated (mt, Table 1) oligonucleotides were added to the reaction tube. The complex formed with recombinant CREB is indicated by the arrow.

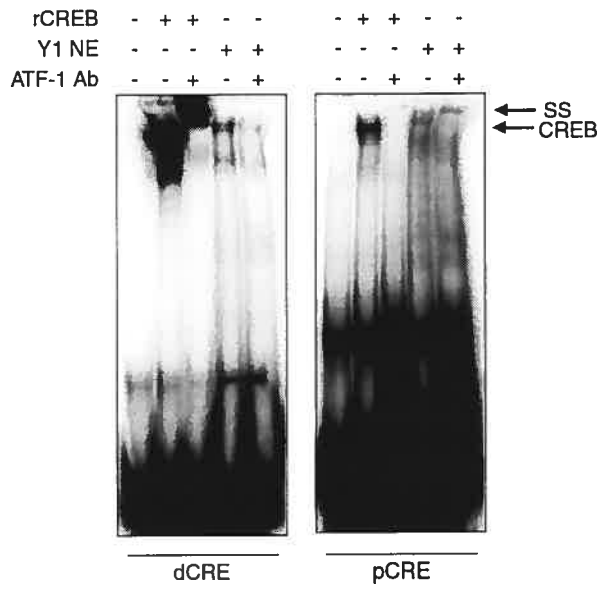


Fig. 5. Super shift EMSA showing specificity of CREB complex formation with nuclear extract from Y-1 cells. Aliquots of 10 ug of recombinant CREB (rCREB) or nuclear extract from Y-1 cells stimulated with 1 mM dbcAMP (Y-1 NE) were incubated in presence of oligonucleotide sequences representing the distal (dCRE) and proximal (pCRE) cAMP response elements from the NPC-1 promotor (Table 1). The formation of the CREB-DNA complex was decreased when ATF-1 antibody was added to incubation mixture, and unshifted (CREB) and shifted (SS) bands are indicated by arrows.

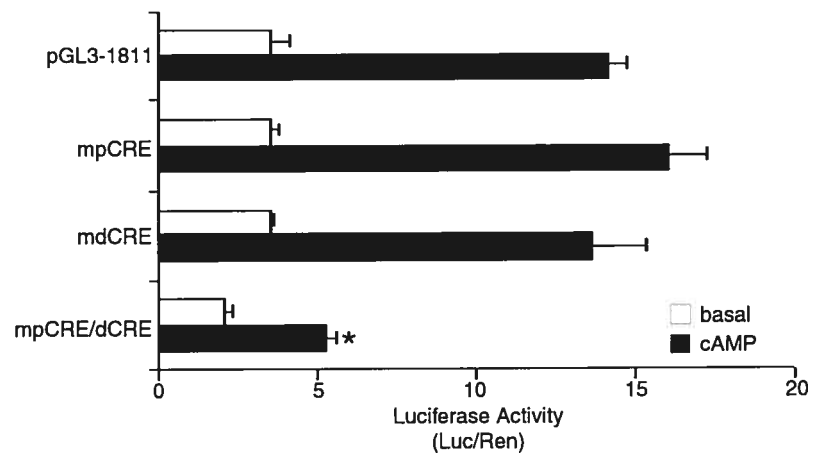


Fig. 6. Mutation of both CRE eliminates the response to CREB and cAMP. The proximal (mpCRE) and distal (mdCRE) CRE sites in the 1.8 kb porcine NPC-1 promoter were mutated. Constructs were transfected into Y-1 cells along with the plasmid constitutively expressing CREB. Cultures were treated with 1 mM dbcAMP overnight, and harvested for luciferase reporter quantification. When both sites were altered, the promoter activity response to CREB and cAMP was eliminated ($p < 0.05$).

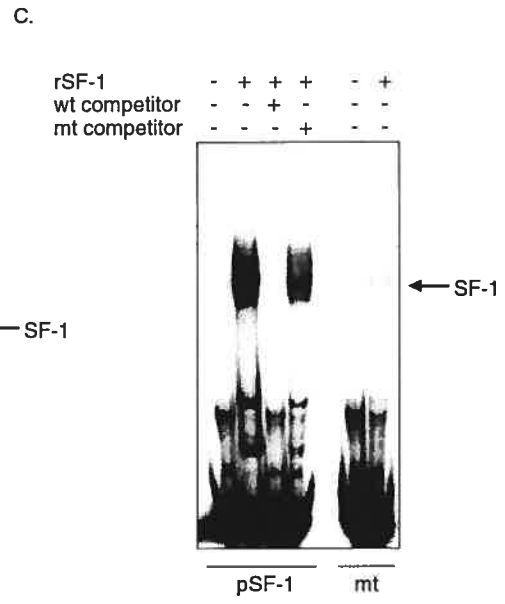
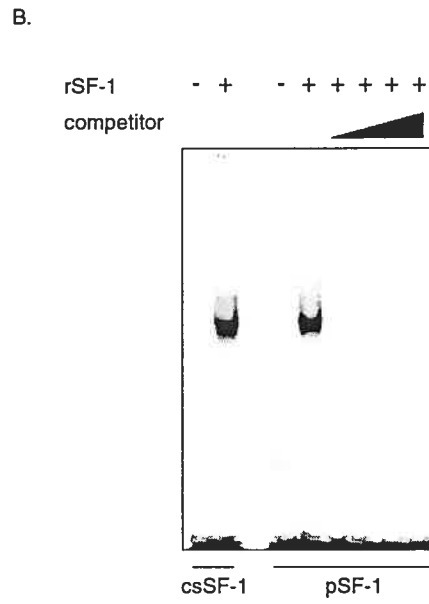
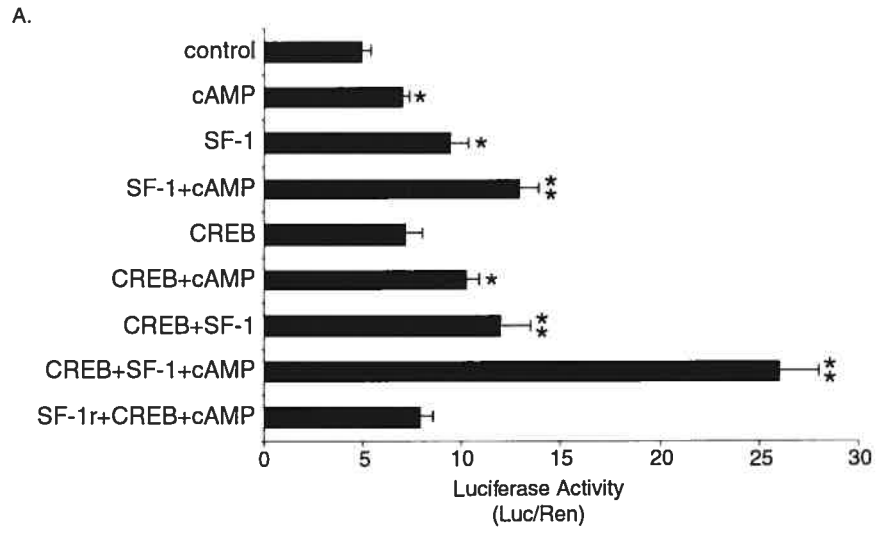


Fig. 7A. The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 (SF-1) interacts with CREB in induction of NPC-1 promoter activity. **A.** SVG40 cells were transfected with a plasmid overexpressing SF-1 alone or in combination with the CREB plasmid, or a plasmid bearing a mutant SF-1 (SF-1r). Cultures marked cAMP were treated with 1mM dbcAMP for 24 h prior to luciferase assay. Bars represent means \pm SEM of triplicate experiments. Means greater than the control mean at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **7B.** EMSA demonstrating complex formation by oligonucleotides representing the consensus SF-1 recognition site (csSF-1, Table 1) and the porcine promoter SF-1 (pSF-1, Table 1) with recombinant SF-1 (rSF-1). All concentrations of the unlabeled csSF-1 competitor prevented protein-oligonucleotide complex formation. **C.** Mutation of the SF-1 consensus site in the NPC-1 promoter prevents its interaction with recombinant SF-1. The pSF-1 probe and the mutated form (Table 1) were incubated in presence of rSF-1 and/or in the presence of mutated or wild type unlabeled oligonucleotide competitors.

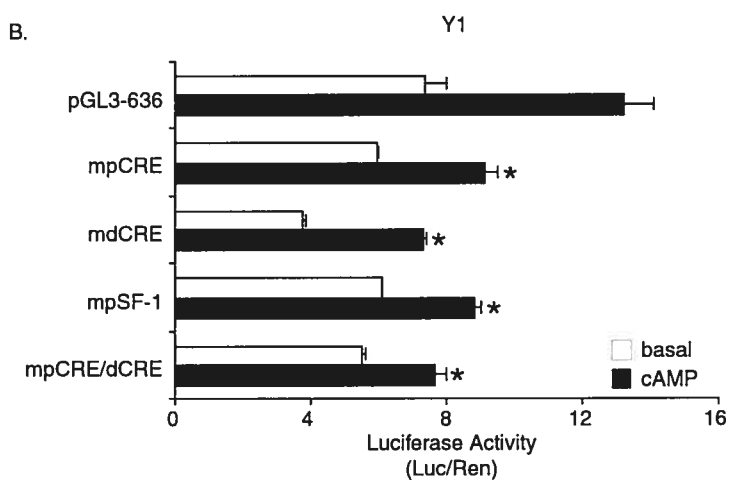
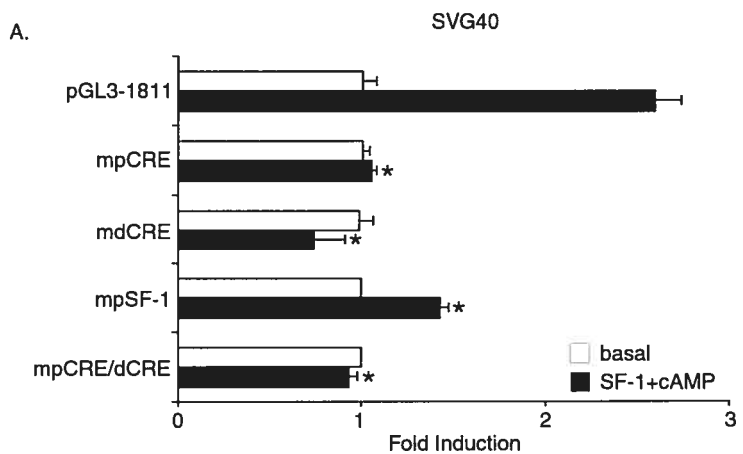


Fig. 8A. Mutation of CRE or SF-1 sites in the 1.8 kb NPC-1 promoter abrogates SF-1 + dbcAMP induction of transcription. The human granulosa cell line SVG-40 was transfected with promoter constructs mutated at the proximal (mpCRE) or distal (mdCRE) or both (mpCRE/mdCRE) of the CRE sites, or at the SF-1 site (mpSF-1). Cells were then treated with 1mM dbcAMP for 24 h and promoter activity assessed by luciferase assay. Bars represent the mean \pm SEM of three experiments and means bearing an asterisk have significantly lower activity compared to the wild type, dbcAMP treated promoter at $p < 0.05$. **8B.** Mutation of the CRE or SF-1 sites attenuates the NPC-1 promoter activity in response to cAMP in Y-1 cells. * Mean response differs from the wild type promoter (pGL3-636) at $p < 0.05$.

Fig. 9. Chromatin modification is associated with cAMP induction of NPC-1 expression. **A.** Northern blot showing the 5.0 kb Y-1 transcript that hybridizes with the NPC-1 probe. Cells were untreated, treated with 1mM dbcAMP, the histone deacetylase (HDAC) inhibitors Trichostatin A (TSA, 100 ng/ml) or 15 mM Na butyrate (But) or the HDAC inhibitors in the presence of 1mM dbcAMP. **B.** Immunoprecipitation assays employing antiserum against acetylated histone H-3 (H-3 Ac), histone H-3 phosphorylated at ser-10 (H-3 P) or CREB binding protein (CBP). Cultures of the Y-1 cell line were transfected with the NPC-1 promoter. Native promoter association with the proteins of interest was tested in primary porcine granulosa cells (PGC). Control cultures are in the columns designated C. Those in the marked cAMP were treated with 1mM dbcAMP for 6 h, after which chromatin was immunoprecipitated and a 500 bp promoter sequence containing both CRE elements was amplified by PCR. DNA control (designated Input) for the procedure was established by amplification of an equivalent amount of DNA that had not been subject to immunoprecipitation. Control for antibody specificity was established by precipitation with rabbit immunoglobulins, designated IgG.

Article 3**Mutation of the Niemann-Pick C-1 gene disrupts pituitary and ovarian function.**

Nicolas Y. Gévry, Flavia L. Lopes, Sandra Ledoux and Bruce D. Murphy

Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe Québec, Canada J2S 7C6

* Cet article traite des conséquences de la mutation du gène NPC-1 sur la fertilité des souris femelles. Ainsi, les résultats obtenus nous montre que l'infertilité de ces souris semble plutôt relié à un problème au niveau de l'axe hypothalamus-hypophyse qu'aux ovaires. Cet article est le premier à démontrer un problème au niveau du système endocrinien dans un modèle de la maladie de Niemann-Pick de type C.

RÉSUMÉ

Le gène Niemann-Pick C1 code pour une glycoprotéine impliquée dans le transport du cholestérol provenant des LDL. La mutation de ce gène cause une accumulation intracellulaire du cholestérol non-estérifié et une dyslipidose fatal. Nous avons investigué les conséquences endocrine et ovarienne d'une déficience de NPC-1 dans les souris Balb/c *npc^{nih-/-}*. Les femelles mutantes ne démontrent aucune cyclicité oestrale et sont infertiles. L'hypophyse est hypoplastique et la sécrétion de prolactine est grandement diminuée conséquemment à une dérégulation du ratio de la forme longue et courte du récepteur de dopamine D2. Cependant, les hormones de l'hypophyse et les récepteurs de GnRH ressemblent aux souris sauvages. À huit semaines, les ovaires et l'utérus des souris NPC-/- sont réduits en masse, en comparaison au souris sauvage. De plus, les ovaires des Balb/c *npc^{nih-/-}* montrent une perturbation au niveau de la croissance folliculaire, des ovocytes dégénérés et aucun corps jaune. L'expression de StAR et CYP19, des gènes clés impliqués dans la stéroïdogénèse, est remarquablement réduite. La transplantation des ovaires de souris NPC-/- sous la capsule rénale de souris WT rétabli l'ovulation et la formation de corps jaune. Le traitement par des gonadotrophines exogènes rétabli également l'ovulation et l'expression de CYP19 et StAR. De plus, cette mutation affecte la glande surrénale par la réduction de l'épaisseur des différentes zones et par la réduction de l'expression de StAR. Nous concluons que la mutation du gène dérègle les fonctions de l'hypophyse qui se traduit par une diminution de la masse corporelle et l'inhibition du développement folliculaire et de l'ovulation.

ABSTRACT

Human Niemann-Pick type C-1 disease results from mutation of a gene coding for a glycoprotein that processes low density lipoprotein-imported cholesterol. The consequence is accumulation of unesterified cholesterol and fatal lysosomal lipidosis. The orthologous gene is mutated in the Balb/c *npc^{nih-/-}*

mouse. We show that female homozygote mutant mice are infertile, with disrupted ovarian follicles, degenerate oocytes and no corpora lutea. Pituitary glands are hypoplastic and prolactin expression is dramatically reduced compared to wild type mice. Both long and short splice variants of dopamine-D2 receptors are overexpressed in mutant pituitaries. Mutant ovaries transplanted under wild type kidney capsules display ovulation and formation of corpora lutea. Gonadotropin treatment induces ovulation and restores expression of steroidogenic proteins. It is concluded that the Niemann Pick-C-1 mutation interferes with pituitary function by perturbing the hypothalamic-pituitary-ovarian feedback loop. Reduced estrogens, prolactin and gonadotropin expression prevent normal ovarian follicular development and ovulation.

INTRODUCTION

Niemann-Pick type C (NPC) disease is a fatal human autosomal recessive lipid disorder characterized by the accumulation of free cholesterol in late endosomes and lysosomes¹. The majority of NPC disease is attributed to mutation in the NPC-1 gene that codes for a 1278 amino acid protein¹ that processes low density lipoprotein (LDL)-imported cholesterol and aids in maintaining intracellular cholesterol homeostasis². NPC-1 displays domain homology with the resistance-nodulation-division (RND) protein pump family in prokaryotes, and is believed to be a bulk trans-organelle transporter of cholesterol³.

Niemann-Pick type C-1 disease occurs at a frequency of greater than 1:100,000 in human populations⁴ and can result from at least 100 different known mutations of the NPC-1 gene⁵. These appear to have arisen spontaneously, although frequency of the disease is elevated in geographically isolated regions, where clusters usually bear the same genotype^{1,6-8}. Mutation in the coding sequence of the gene results in progressive human pathology, including extensive lipid accumulation, loss of weight, hepatosplenomegaly,

neurodegeneration, ataxia and premature death⁸. Onset usually varies from birth to late adolescence, and severity of symptoms and age of the death of the afflicted varies⁹. Adult onset occurs¹⁰, and survival into the seventh decade has been reported^{11,12}.

Two mouse lines spontaneously display malfunction of NPC-1 and present symptoms identical to human NPC-1 disease, including premature death¹³. They provide important insight into the significance of NPC-1 mutation to sterol metabolism. The Balb/*c npc^{nih}/-* mouse has an insertion of intronic sequences and a premature termination sequence with consequent inactivation of the gene¹⁴. The C57BL/6J^{spm/spm} mouse produces NPC-1 mRNA with an intact coding sequence, with apparent mutations, resulting in expression of different forms (truncated and spliced) of the 3'UTR and reduced persistence of the cognate mRNA (Gévry and Murphy, unpublished data). NPC-1 mutations profoundly affect steroid synthetic organs, including the adrenals^{15,16} and Leydig cells, causing hypertrophied ER, a paucity of stored lipid, and compromised steroidogenesis¹⁷. The consequences include effects on secondary sex characteristics and deficient expression of renal and hepatic proteins¹⁷.

While it is known that females of both the Balb/*c npc^{nih}/-* and the C57BL/6J^{spm/spm} strains are infertile, there is little information on mechanisms of endocrine disruption that occur in NPC-1 gene mutation in humans or in either mouse model. We therefore undertook a comprehensive analysis of the pituitary-ovarian axis in the Balb/*c npc^{nih}/-* model to establish its significance to the pathology of the disease and to ovarian function. We show that there is pituitary, adrenal and ovarian dysfunction in the Niemann-Pick type C-1 mutant mouse.

RESULTS

Balb/c *npc^{nih-/-}* females are infertile.

The homozygous NPC-1 mutant mice were identified by the PCR genotype analysis (Fig. 1D). They demonstrated reduced body mass associated with smaller stature and reduced abdominal fat deposits (Fig. 1A and 1B). Gross examination indicated hepatomegaly and associated pale liver, due presumably to lipid accumulation (Fig. 1B). Ovaries were smaller and paler, and the reproductive tract was thinner in mutant relative to wild type (WT) mice (Fig. 1C). Daily vaginal smears revealed that WT and NPC-1 heterozygous mice showed regular 4-day estrous cycles, while female mice homozygous for NPC-1 mutations displayed no cyclic variation in exfoliated vaginal cells.

Three weeks after birth, macroscopic and histological analyses of the ovaries of WT and NPC-1 homozygous mutant mice indicated the presence of primary, secondary and early antral follicles (Fig. 2A and B). Histological observation and numerical analysis indicated no apparent variations relative to ovaries of WT mice (Fig. 2A and 2B). At 7-8 wks, when the WT mice were postpubertal, the Balb/c *npc^{nih-/-}* mice had ovaries half or less the mass of their WT counterparts (Fig. 2C and D). Uteri are also significantly thinner and of lower mass relative to the WT (Fig. 2G and H). Homozygous NPC-1 mutant mice displayed antral follicles at 7 weeks but no evidence of ovulation nor formation of corpora lutea (Fig. 2D). The larger of these follicles had degenerate oocytes (Fig. 2E). A major histological difference was found in the ovarian stroma which was hypertrophied, with extensive interstitial cell lipid accumulation in the homozygous mutants (Fig. 1F). Balb/c *npc^{nih-/-}* mice had reduced uterine diameter, due to the atrophy of all uterine components, the myometrium, endometrial stroma and the endometrial epithelium (Fig. 2G and H). There was also a reduced frequency and convolution of the endometrial glands in the homozygous mutant mouse relative to WT.

Adrenals of homozygous mutant and wild type mice were similar at three weeks (Fig. 2I and J), but were substantially smaller in Balb/c *npc^{nih}^{-/-}* mice at eight weeks (Fig. 2K and L). Comparison of adrenals acquired at eight weeks of age from WT and homozygous mutant NPC-1 mice showed striking differences in size, due to reduction in thickness of the zonae glomerulosa, fasciculate and reticularis and the medulla in the latter.

To determine the consequences of NPC1 deficiency on steroidogenesis at the molecular level, we analysed mRNA expression of cytochrome P450aromatase (Cyp19), the rate-limiting enzyme in estrogen synthesis and the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a key protein required for synthesis of pregnenolone, a precursor of progesterone. The expression of both was substantially compromised in ovaries of homozygous NPC-1 mutants in comparison with WT mice (Fig. 2M). Similarly, StAR expression in adrenals of mutant mice was decreased relative to WT (Fig. 2N).

Exogenous gonadotropin treatment and ovary transplantation restore ovulation and corpus luteum formation to homozygous mutant NPC-1 mice.

The ability of female homozygous mice to respond to exogenous gonadotropic hormones was assessed by injection of equine chorionic gonadotropin (eCG) to induce follicle development followed by human chorionic gonadotropin (hCG) 48 h later to induce ovulation (Fig. 3A). Gonadotropin treatment induced development numerous large antral follicles at 48 h in both WT and Balb/c *npc^{nih}^{-/-}* mutant, but these were in lower abundance in the mutant. The remarkable lipid accumulation in the ovarian stroma of untreated mutant mice (Fig. 1F) was reduced following gonadotropin treatment (data not shown). The injection of hCG after eCG induced formation of corpora lutea in both WT and mutant mice (Fig. 3A). As expected from differences in the numbers of large antral follicles, there were fewer than half the number of corpora lutea in the ovaries of mutant mice. Exogenous gonadotropin treatment

restored WT patterns of expression of both StAR and Cyp19 to the ovaries of mutant mice (Fig. 3C).

To address whether ovarian failure in NPC mutant mice was caused by factors intrinsic or extrinsic to the ovary, we transplanted a single mutant mouse ovary to the kidney capsule of adult ovariectomized WT mice. Vaginal swabs indicated the presence of ovarian cycles in recipient mice within 3 wk of transplants. In ovaries recovered at 6 weeks, there was evidence of large antral follicles and numerous corpora lutea, indicating that both preovulatory follicle development and ovulation had occurred beneath the host kidney capsule (Fig. 3B). Indeed, we found examples of oocytes entrapped in the renal parenchyma adjacent to corpora lutea (Fig 3B, lower right panel) demonstrating that ovulation had occurred in the host site.

Hypophysial consequences of NPC-1 mutation.

A consistent finding was that the anterior pituitary of the homozygous mutant NPC-1 mice was hypoplastic relative to WT mice (Fig 4A). Upon histological analysis, two major differences were noted between mutant and WT pituitaries. The first was the presence of vacuolated cells, suggestive of low rates of feedback control and consequent elevated hormone synthesis and secretion. The second was a dramatic reduction in frequency of acidophilic cells, as indicated by classic histological staining (Fig. 4 C-F). We therefore undertook further analysis to determine the specific modifications in the mutant pituitary. Immunohistochemistry indicated no difference in the abundance of cells containing the glycoprotein hormones, luteinizing hormone (LH), Follicle-stimulating hormone (FSH, (Fig. 5A). The frequency of growth hormone (GH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) positive cells did not differ between mutant and WT. Semi-quantitative RT-PCR demonstrating no difference in abundance of mRNA for FSH, LH, TSH, GH or the precursor of ACTH, proopiomelanocortin (POMC, Fig. 6A), confirming immunohistochemical observations. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor expression, as revealed by

RT-PCR, did not differ between wild type and mutant mice (Fig. 6A). LH in serum was substantially elevated in the mutant vs. the WT mouse, while serum FSH concentrations 25% greater in mutant relative to WT mice (Fig. 5C, $P < 0.01$). These findings are consistent with the view that feedback regulation of pituitary gonadotropins by steroids was compromised in mutant mice.

A striking and consistent difference between the strains of mice was the virtual absence of cells expressing prolactin in the mutants (Fig. 5A). This result concurred with substantially reduced abundance of pituitary prolactin mRNA and dramatic reduction in prolactin concentrations in circulation (Fig. 5D, $p < 0.01$). RT-PCR amplification of the long and short isoforms of the dopamine D2 receptor in pituitaries indicated there was greater expression of both in homozygous mutant mice, with the most profound increase in the short form (Fig 6A and B). This variation resulted in a profound reduction of the ratio of the long to short isoform in the mutant mouse relative to its WT counterpart (Fig. 6C).

DISCUSSION

The findings in the present study provide strong evidence for the view that infertility in the Balb/c *npc^{nih}/-* mouse is attributed to failure of maturation of ovarian follicles to the preovulatory stage following antral formation. This results in a disruption of the cascade of ovarian and pituitary hormone secretion, and prevents normal estrous cycles. Pharmacological doses of exogenous gonadotropins induce the latter stages of folliculogenesis, as well as ovulation and CL formation in mutant mice. Further, transplantation of the ovaries to WT hosts indicated that endogenous gonadotropins secreted by the ovariectomized host were sufficient to induce ovarian cyclicity and ovulation. Together these findings suggest that the major defect in the Balb/c *npc^{nih}/-* mouse is based in the central nervous system or the pituitary rather than at the ovarian level.

The Balb/*c npc^{nih}/-* pituitary, although hypoplastic, appeared to express and secrete quantities of glycoprotein hormones consistent with the WT pattern. Likewise, pituitary expression and circulating levels of growth hormone did not differ between the WT and mutant mice. The major difference in the mutant mouse was the near absence of lactotropes and low levels of circulating prolactin. The pituitary phenotype of the NPC-1 mutant strongly resembled that of a transgenic mouse overexpressing the short form of the D2 receptor developed by Iaccarino et al.(ref.18) where there was hypoplasia of lactotrophs and reduction in circulating prolactin. They showed that the ratio of the D2 isoforms directs both lactotrope proliferation and prolactin expression, a ratio favoring the long form causes increase in lactotropes and prolactin secretion, while overexpression of the short form has the opposite consequence¹⁸. In the current investigation, we report that the NPC-1 mutation is associated with increases in both forms of the D2 receptor, with a more pronounced increase in the short form and an isoform ratio in favor of the short form. The relative expression of D2 receptor splice variants by lactotropes is estrogen dependent, high concentrations induce predominant expression of the long form¹⁹ levels while low estrogen favors the short form of the D2 receptor²⁰. We conclude that pronounced reduction in Cyp19 expression by Balb/*c npc^{nih}/-* mouse ovaries results in reduced circulating estrogen, thereby altering pituitary D2 receptor isoform kinetics, with the consequence of lactotroph hypoplasia and reduced prolactin secretion.

There is further evidence implicating subnormal estrogen synthesis as the basis for infertility in Balb/*c npc^{nih}/-* mice. Mice with inactivating mutations of Cyp19 display disruption of estrogen synthesis, folliculogenesis and ovulation²¹, closely resembling the ovarian phenotype of the Balb/*c npc^{nih}/-* mutant. Cyp19 knockout results in a moderate elevation in circulating FSH and profound elevation in LH relative to WT animals²¹, again highly similar to Balb/*c npc^{nih}/-* female mice. The positive feedback effects of estrogen that induce the

preovulatory LH surge are compromised in the Cyp19 knockout mouse²¹, and appear likewise absent in the Balb/c *npc^{nih}/-* mouse.

The causes of reduced estrogen secretion in the NPC-1 mutant mice are not entirely clear. The factors necessary for steroidogenesis, including StAR protein and Cyp19, can be induced in ovaries of the mutant mouse by exogenous gonadotropin treatment. As there is substantial disruption of androgen production by the testis in male Balb/c *npc^{nih}/-* mice¹⁷, a defect in formation of androgen precursors for estrogen synthesis may be responsible for reduction in estrogen in female Balb/c *npc^{nih}/-* mice. It is well known that LH is the principal hormone required for androgen production in ovarian theca cells, and is likewise responsible for progesterone secretion in luteal cells. Prolactin induces expression of LH receptors in ovarian follicle cells²². Null mutation of the prolactin receptor reduces the number of growing follicles, and renders the mouse infertile due to defective luteal progesterone secretion²³. It is reasonable to hypothesize that absence of prolactin secretion in the Balb/c *npc^{nih}/-* mouse attenuates the ovarian response to LH, reducing androgen and estrogen synthesis and preventing the latter stages of folliculogenesis and ovulation. The fact that the prolactin receptor knockout mouse can ovulate, albeit at a reduced rate²³, and that ovulation can be induced by exogenous gonadotropins in the Balb/c *npc^{nih}/-* mouse in spite of lactotrope hypoplasia, suggests that requirement for prolactin at the ovarian level is not absolute.

While it is attractive to explain infertility in the Balb/c *npc^{nih}/-* mouse by invoking solely pituitary and ovarian effects, it remains highly possible that neural defects cause or contribute to the problem. Indeed, reversal of sterility in the Balb/c *npc^{nih}/-* mouse has been achieved by a strategy that directs transgenic expression of the WT NPC-1 protein primarily to the central nervous system²⁴. Neuronal degeneration in the Balb/c *npc^{nih}/-* mouse is progressive, and hypothalamic degeneration becomes more pronounced with age²⁵. As gonadotropin secretion is under hypothalamic control, progressive neural

degeneration could explain the failure in onset of pubertal and cyclic changes in the ovary. Further, the hypothalamus is the source of the dopamine that normally regulates mammalian prolactin secretion²⁶. It is further possible that the mutation directly affects the tubulo-infundibular dopaminergic system to alter dopamine release patterns, thereby altering prolactin secretion.

In summary, we show that the Balb/c *npc^{nih}/-* mouse is infertile due to a pattern of truncated folliculogenesis and reduced expression of Cyp19. Follicular development and ovulation can be provoked by treatment with exogenous gonadotropins or by transplantation of the mutant ovary beneath kidney capsules of WT mice. The major pituitary disruption is reduced presence of lactotropes and consequent near elimination of prolactin secretion.

METHODS

Animals

All animal studies were approved by the Comité de déontologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, accredited by the Canadian Council on Animal Care. Heterozygote NPC mutant mice (Balb/c *npc^{nih}/+*) were obtained from the colony of Dr Robert Erickson, maintained at 22 C on a 12 h light, 12 h dark cycle and provided pelleted diet and water ad libitum. Offspring bearing the homozygous genotype for the NPC-1 mutation were identified by PCR analyses of tail DNA using forward (5'- GTGCTGGACAGCCAAGTA-3') and reverse (5'- GATGGTCTGTTCTCCCATG-3') primers (Fig 1D). Wild type, heterozygote and homozygous mutant mice were subject to daily vaginal cytology analysis for a period of 6 wk. We examined ovaries from prepubertal (3 wk) and adult (8 wk) mice. To determine the ovarian competence, we administered 5 IU of eCG (Sigma, Oakville, ON, Canada), ip to mice at 8 wk of age. At 48 h after eCG, they received a bolus of hCG, (5 IU, Sigma) and ovaries were recovered for analysis 16 h later.

Ovarian Transplants

Wild-type (WT) adult female BALB/c mice were ovariectomized and a single ovary from an untreated mutant mouse per recipient was transplanted beneath the kidney capsule. Daily vaginal smears were taken beginning 1 wk after transplantation to establish whether ovarian cycles were occurring in transplanted ovaries. Mutant ovaries were recovered for analysis 6 wk after transplantation.

Histology and Immunohistochemistry

Ovaries, uteri, adrenals and pituitary glands of mutant mice were removed, fixed in 10% formalin at 4 C for 24 h, dehydrated, and embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m. Standard staining and immunohistochemical analysis of the pituitary tropic hormones was performed employing rabbit polyclonal antibodies against the pituitary hormones, LH, FSH, prolactin, ACTH, GH and TSH (NIH, NIDDK, Bethesda MD). The second antibody was labeled with the fluorochrome Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA). Control tissues were subjected to the same procedures except that first antibody was replaced with preimmune rabbit serum.

RNA isolation and analyses

Tissues were collected in RNA-later solution (Qiagen, Mississauga, Canada), and total RNA was extracted by homogenization in 300 μ l of RLT buffer with β -mercaptoethanol and with RNA extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Total RNA (250 ng for ovaries and 500 ng pituitary) was reverse-transcribed with the poly-dT and SuperScript (Life Technologies, Rockville, MD) at 37 C for 60 min. The cDNA was amplified by standard PCR reaction in the presence of 2 μ Ci of P^{32} -dCTP. Optimal conditions and PCR cycle numbers were determined for each set of primers. The following genes were amplified with the corresponding primers: for LH, 5'-GCCGGCCTGTCAACGCAACT-3' and 5'-GAGGGCTACAGGAAAGGAGA-3'; for FSH, 5'-TGAAGTACCAACATCACC-3' and 5'-

ACTATCACACTTGCCACAGT-3'; for prolactin, 5'-CTCACTACATCCATAACCCTGTATAC-3' and 5'-CATTTCCTTTGGCTTCAGGATAGGC-3' ; for POMC, 5'-GAGGACCTCAC CACGGAGAGCAAC -3' and 5'-GCGGAAGTGCTCCATGGAGTAGGA-3'; for TSH, 5'-ATGAGTGCTGCCGTCCTCC TCT CC-3' and 5'-GGTGCAGTAGTTGGTTCTGACAGC-3; for GH, 5'-ACCTGCACCCGCTGGCTGCTGAC AC-3' and 5'-GCTGCGCATGTTGGCGTC AAAGTTG-3'; for GnRH receptor, 5'-TCTTCTCTATGTATGCCCCAGCTT-3' and 5'-TGTAGTTTGC GTGGGTCTTGATGA-3'; for dopamine D2 receptor, 5'-CATCTCCATTT CCAGCTCCTGAG-3' and 5'-CCTTCATCGTCACCCTGCTGG-3'; StAR, 5'-GGGGACGAAGTGCTAAGTAAGATG -3' and 5'-CTGACTACCACCCCTCCCGATGCT-3'; for Cyp19, 5'-CCCCTGGACGAAAGTGCTATTGTG-3' and 5'-CTGCTTCGACCTCT GGATACTCTG-3'; and GAPDH was employed as a control, 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAGC-3' and 5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'. The identity of each PCR product was confirmed by direct sequencing. PCR products were analysed by polyacrylamide gels and quantified using the Storm 850 Phosphoimager (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé Canada).

Hormone Assays

Mice were anesthetized with an ip injection of 2,2,2-tribromoethanol (Sigma), and blood was collected by cardiac puncture. Serum levels of FSH, LH and prolactin were measured by radioimmunoassay using the service provided by Dr. A.F. Parlow (Torrance, CA). For each hormone, all samples were run in a single assay.

Statistical Analysis.

Physiological parameters between mutant and WT mice were compared using Student's t test. A level of probability of $P < 0.05$ was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

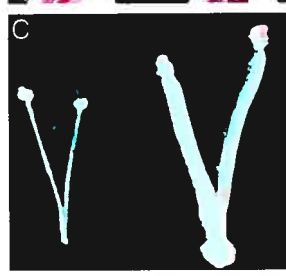
This investigation was supported by grant MT11018 from the Canadian Institutes of Health Research. We thank Dr. R. Erickson for supplying Balb/c *npc^{nih+/-}* mice, Dr. A.F. Parlow for assay of pituitary hormones, and M. Dobias for technical assistance.

REFERENCES

1. Carstea, E. D. et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* **277**, 228-31. (1997).
2. Davies, J. P. & Ioannou, Y. A. Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem* **275**, 24367-74. (2000).
3. Ioannou, Y. A. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 657-68. (2001).
4. Ory, D. S. Niemann-Pick type C: A disorder of cellular cholesterol trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**, 331-339 (2000).
5. Millat, G. et al. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet* **68**, 1373-85 (2001).
6. Winsor, E. J. & Welch, J. P. Genetic and demographic aspects of Nova Scotia Niemann-Pick disease (type D). *Am J Hum Genet* **30**, 530-8 (1978).
7. Millat, G. et al. Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet* **65**, 1321-9. (1999).

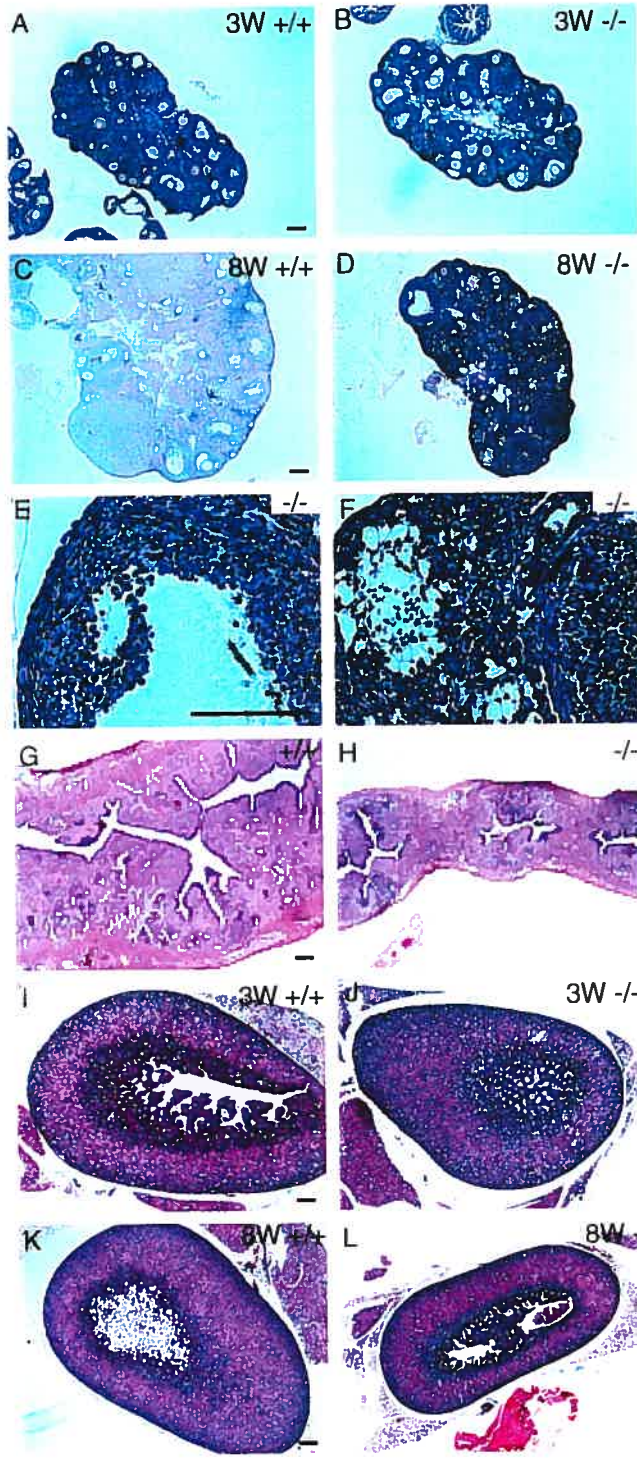
8. Patterson, M. C. et al. Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder . In: *Scriver C, Beaudet A, Sly W, Vale D, Vale D. The metabolic and molecular bases of inherited disease 8th ed.*, 3611-3634 (2001).
9. Schofer, O., Mischo, B., Puschel, W., Harzer, K. & Vanier, M. T. Early-lethal pulmonary form of Niemann-Pick type C disease belonging to a second, rare genetic complementation group. *Eur J Pediatr* **157**, 45-9 (1998).
10. Lossos, A. et al. Adult-onset Niemann-Pick type C disease. Clinical, biochemical, and genetic study. *Arch Neurol* **54**, 1536-41 (1997).
11. Vanier, M. T. & Suzuki, K. Recent advances in elucidating Niemann-Pick C disease. *Brain Pathol* **8**, 163-74 (1998).
12. Vanier, M. T. et al. Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta* **1096**, 328-37 (1991).
13. Xie, C., Burns, D. K., Turley, S. D. & Dietschy, J. M. Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick type C disease but turnover is increased. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 1106-17 (2000).
14. Loftus, S. K. et al. Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* **277**, 232-5. (1997).
15. Gevry, N. Y. & Murphy, B. D. The role and regulation of the Niemann-Pick C1 gene in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res* **28**, 403-12. (2002).
16. Kamiya, S., Yamagami, T., Umeda, M., Sugiyama, M. & Daigo, M. Lectin histochemistry of foamy cells in non-nervous tissues of feline sphingomyelinosis. *J Comp Pathol* **105**, 241-5. (1991).
17. Roff, C. F. et al. The murine Niemann-Pick type C lesion affects testosterone production. *Endocrinology* **133**, 2913-23 (1993).
18. Iaccarino, C. et al. Control of lactotrop proliferation by dopamine: essential role of signaling through D2 receptors and ERKs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14530-5. (2002).

19. Kukstas, L. A. et al. Different expression of the two dopaminergic D2 receptors, D2415 and D2444, in two types of lactotroph each characterised by their response to dopamine, and modification of expression by sex steroids. *Endocrinology* **129**, 1101-3 (1991).
20. Guivarc'h, D., Vincent, J. D. & Vernier, P. Alternative splicing of the D2 dopamine receptor messenger ribonucleic acid is modulated by activated sex steroid receptors in the MMQ prolactin cell line. *Endocrinology* **139**, 4213-21. (1998).
21. Britt, K. L. et al. The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* **79**, 181-5 (2001).
22. Gafvels, M., Bjurulf, E. & Selstam, G. Prolactin stimulates the expression of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in the rat corpus luteum and rescues early pregnancy from bromocriptine-induced abortion. *Biol Reprod* **47**, 534-40 (1992).
23. Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. & Kelly, P. A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* **19**, 225-68 (1998).
24. Loftus, S. K. et al. Rescue of neurodegeneration in Niemann-Pick C mice by a prion-promoter-driven Npc1 cDNA transgene. *Hum Mol Genet* **11**, 3107-14 (2002).
25. Ong, W. Y. et al. Neurodegeneration in Niemann-Pick type C disease mice. *Exp Brain Res* **141**, 218-31 (2001).
26. Ben-Jonathan, N. & Hnasko, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* **22**, 724-63 (2001).
27. Ericsson, J. & Edwards, P. A. CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J Biol Chem* **273**, 17865-70. (1998).

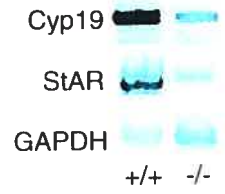


-/- +/+

Fig. 1. Gross morphology of the Balb/c *npc^{nih}-/-* mouse. There are differences in body size (A), body fat reserves and liver size (B) and relative size of the reproductive tract (C). The Balb/c *npc^{nih}-/-* mutation results in an intronic insertion that can be recognized by PCR amplification (D).



M.



N.

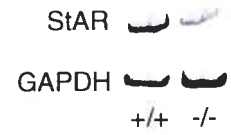
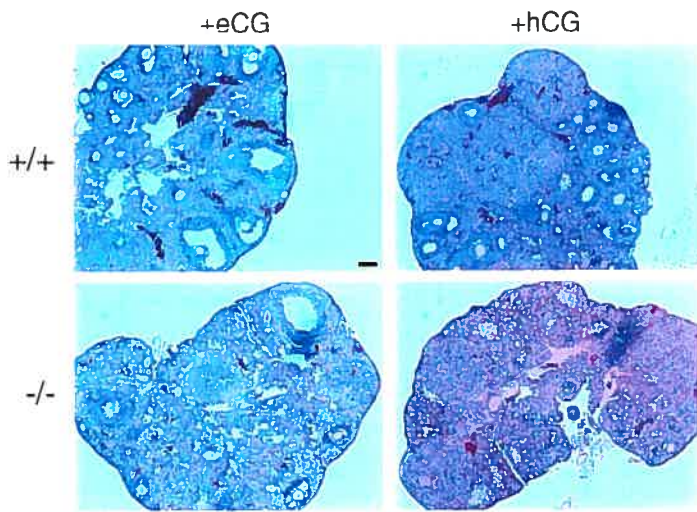
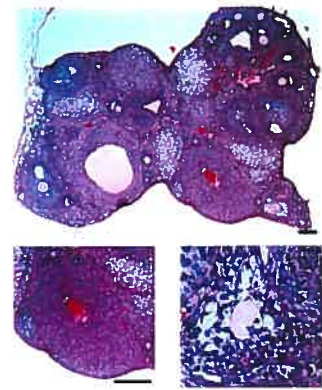


Fig. 2. Ovarian, uterine and adrenal morphology of the Balb/c *npc^{nih}/-* and WT mice. There is similarity in the ovaries at 3 wks (A-B), reduced size ovaries and lack of evidence of ovulation at 8 wks in the mutant ovaries (C-D). There is evidence of degeneration of oocytes (E) and lipid accumulation in the ovarian stroma (F) in Balb/c *npc^{nih}/-* mice. Uterine cross sections from WT (G) and mutant mice show reduction in endometrial thickness and endometrial gland proliferation. Adrenals of WT (I) and Balb/c *npc^{nih}/-* mice (J) are similar at 3 wks, but there are reductions in adrenal mass and thickness of the constituent layers of the mutant adrenal at 8 wks (K-L). Semiquantitative PCR of Cyp19 and StAR in the ovaries of adult mice demonstrated reduced expression of both (M), while StAR expression is quantitative similar in the mutant and WT adrenals at 8 wks (N). The bar represent 100 μ m..

A.



B.



C.

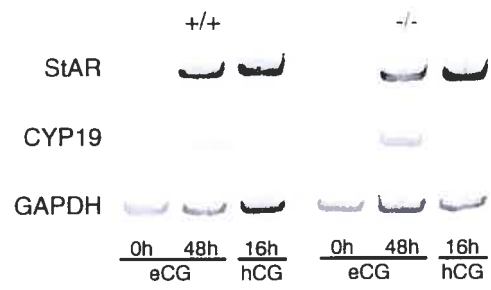
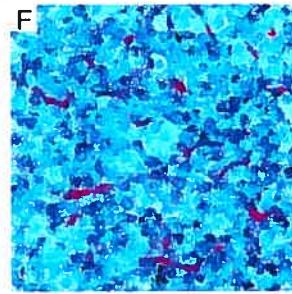
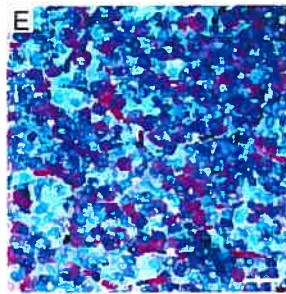
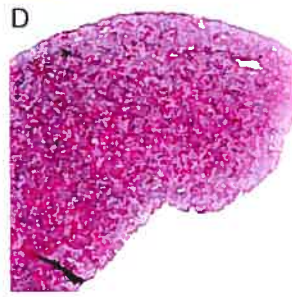
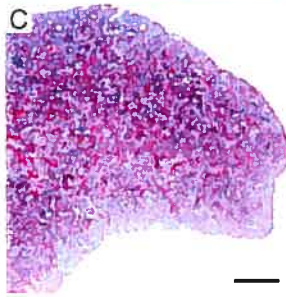
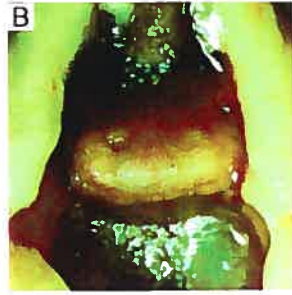
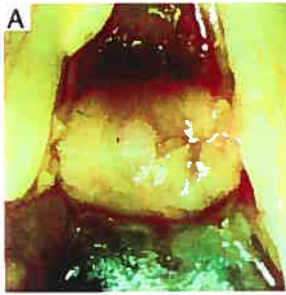


Fig. 3. Restoration of ovulation in Balb/c *npc^{nih-/-}* mice by exogenous gonadotropins and by transplantation of ovaries to the kidney capsule of ovariectomized WT mice. Panel A shows the effects of 5 IU equine chorionic gonadotropin (eCG) to induce folliculogenesis and 5 IU of human chorionic gonadotropin to induce ovulation. Ovaries of Balb/c *npc^{nih-/-}* mice had fewer large follicles in response to eCG and fewer ovulations in response to human chorionic gonadotropin (hCG). Gonadotropin treatment restored the StAR and Cyp19 expression to WT levels (C). Panel B shows a section of an ovary from a Balb/c *npc^{nih-/-}* mouse 6 wks after transplantation to the kidney capsule of an ovariectomized, WT mouse. Evidence of ovulation includes the formation of corpora lutea (upper and lower left panels) and an extraovarian oocyte (lower right panel). The bars represent 100 μ m.

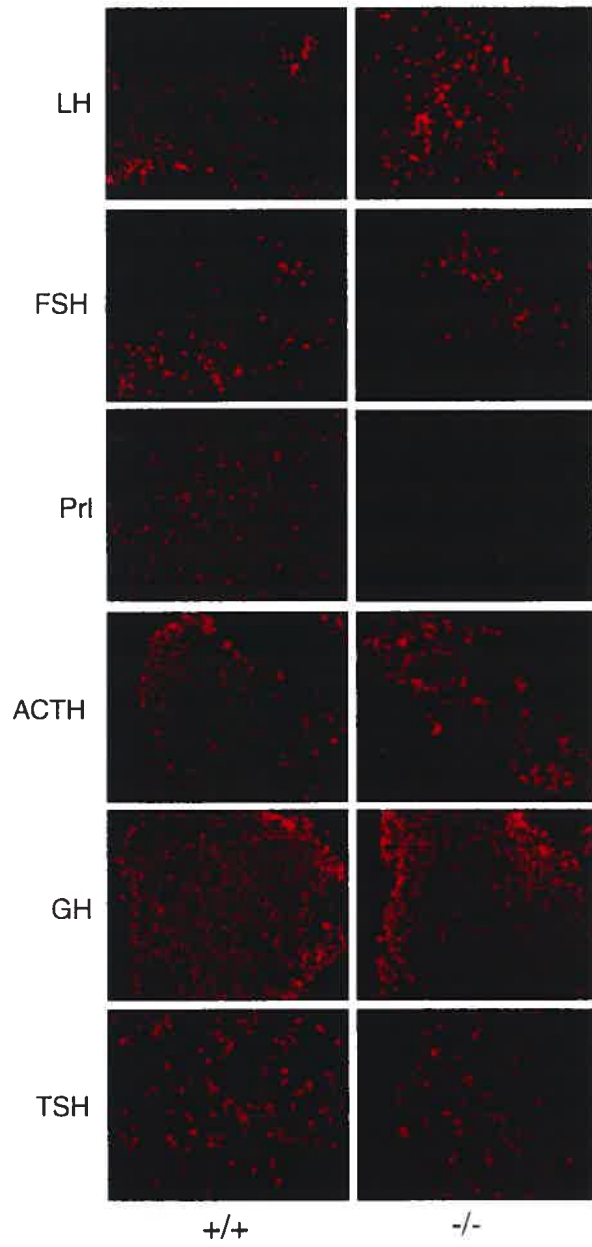


+/+

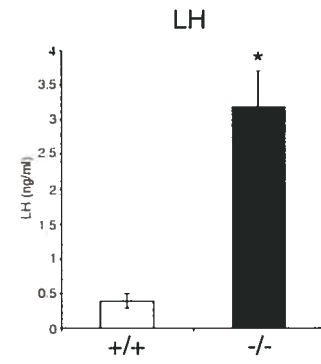
-/-

Fig. 4. The Balb/*c npc^{nih-/-}* mouse has pituitary hypoplasia and reduction in acidophilic cells. The inferior aspect of the pituitary from WT (A) and Balb/*c npc^{nih-/-}* (B) mice shows gross differences in the size of the glands. The low (C-D) and high (E-F) power views showing reduced numbers of acidophils in the pituitary of the Balb/*c npc^{nih-/-}* mouse. The bar represents 100 μm .

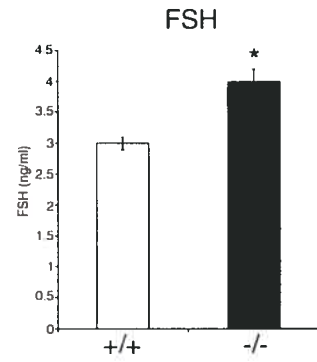
A.



B.



C.



D.

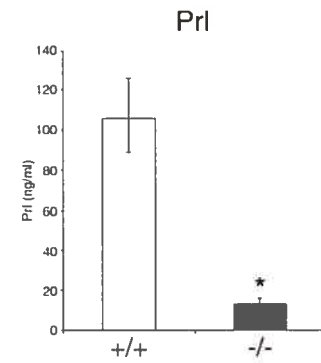
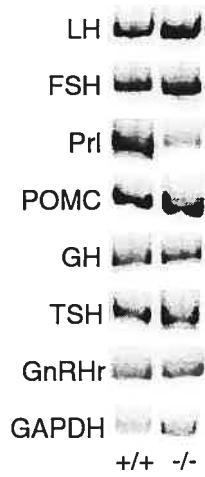
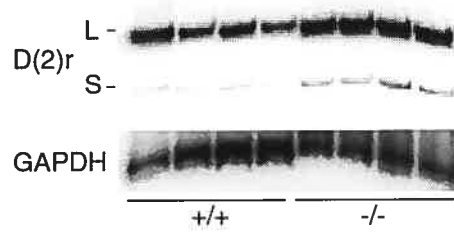


Fig. 5. A. Comparison of the frequency of pituitary cells that are immunopositive for each of the six pituitary hormones, LH, FSH, prolactin, ACTH, GH, and TSH. The red signal marks immunopositive cells that bind specific first antibodies revealed by a second antibody labeled with the Cy3 fluorochrome. Bars represent 75 μm . B-D. Concentrations of LH, FSH and prolactin in peripheral circulation as measured by radioimmunoassay in WT and Balb/c *npc^{nh-/-}* mutant mice. *Significantly different from WT at $P < 0.01$.

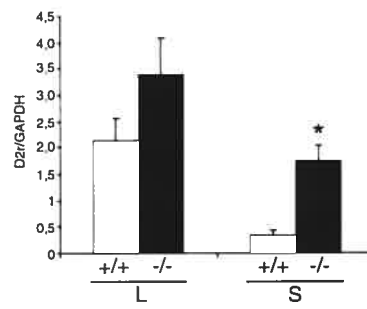
A.



B.



C.



D.

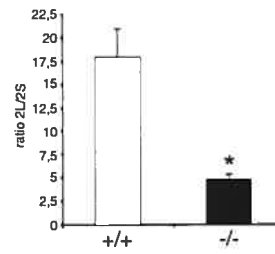


Fig 6. Semiquantitative PCR demonstrating expression of pituitary hormones and pituitary gland receptors in WT and Balb/c *npc^{nih}/-* mutant mice. A. Relative abundance of mRNA for pituitary hormones and GnRH receptor in the pituitary glands of the two mouse strains. B. Gels of PCR products resulting from amplification of the long (L) and short (S) forms of the dopamine D2 receptor. C. Densitometric quantification of PCR products for the long and short forms of the D2 receptor. D. Ratios of the long and short forms of the D2 receptor in WT and Balb/c *npc^{nih}/-* mutant mice.

Article 4**THE ROLE AND REGULATION OF THE NIEMANN-
PICK C1 GENE IN ADRENAL STEROIDOGENESIS**

Nicolas Y. Gévry and Bruce D. Murphy

Centre de recherche en reproduction animale

Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal

St-Hyacinthe, QC, Canada J2S7C6

* Cet article est le prolongement de l'article 3 et traite des conséquences de la mutation du gène NPC-1 sur la glande surrénale. Ainsi, de même que pour les ovaires, la surrénale démontre une altération de sa morphologie. De plus, d'autres résultats sur le mécanisme de régulation du gène NPC-1 par l'AMPc viennent appuyer les articles 1 et 2.

THE ROLE AND REGULATION OF THE NIEMANN-PICK C1 GENE IN ADRENAL STEROIDOGENESIS

Nicolas Y. Gévry and Bruce D. Murphy*

Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine
Vétérinaire, Université de Montréal, St. Hyacinthe, QC, Canada J2S7C6

ABSTRACT

The Niemann-Pick C-1 (NPC-1) gene codes for an intracellular membrane glycoprotein that processes low density lipoprotein (LDL)-imported cholesterol. Its absence is characterized by pathologic accumulation of cholesterol in endosomes and lysosomes. Niemann-Pick C-1 is involved in steroidogenesis in the adrenal, ovary, testis, and placenta. We investigated adrenal morphology of the BALB/c NPC-1^{-/-} mutant mouse. Adrenals of mutant and wild type mice were similar at three weeks, but were substantially smaller in NPC-1^{-/-} mice at eight weeks. The major histological difference was reduction in the thickness of the zona fasciculata, due to decreased cell volume. Lipid accumulation, revealed by Oil Red-O staining, was restricted to the zona fasciculata in wild type mice, but was found throughout the cortex in NPC-1 mutants. The 5'-flanking region of the mouse NPC-1 gene was cloned and sequenced. Comparison of the proximal promoter region revealed a C₁G island and two consensus sequences for the cAMP response element (CRE). The role of the PKA pathway in transactivation of the NPC-1 promoter was probed by transient transfection of a 2.2 kb fragment of the 5'-flanking region fused to the luciferase reporter into mouse adrenal Y-1 and Leydig tumor cells and into nonsteroidogenic monkey kidney CV-1 cells. This promoter fragment displayed significant constitutive transcription, which was enhanced 3–5 fold in steroidogenic cells by treatment with 1 mM cAMP. The cAMP response was

*Corresponding author. Fax: (1) 450-778-8103; E-mail: [REDACTED]

RÉSUMÉ

Le gène Niemann-Pick C1 (NPC-1) code pour une glycoprotéine membranaire qui est impliquée dans le transport du cholestérol dérivé des lipoprotéines à faible densité (LDL). Son absence est caractérisée par une accumulation pathologique du cholestérol dans les lysosomes et les endosomes. La protéine NPC-1 est importante pour la stéroïdogénèse de la surrénale, des ovaires, des testicules et du placenta. Nous avons examiné la morphologie de la surrénale dans les souris Balb/c npc^{nih-/-}. La surrénale des souris mutante et sauvage est similaire à trois semaines. Cependant, après la puberté les glandes de la surrénale des souris mutantes sont substantiellement plus petites. La différence histologique majeure est la réduction de l'épaisseur de la zone fasciculée causée par une réduction du volume des cellules. L'accumulation de lipide, révélé par la coloration à l'huile rouge-O, est retrouvée dans toutes les zones de la surrénale en comparaison aux souris sauvages où le cholestérol est restreint à la zone fasciculée. La région promotrice du gène NPC-1 chez les souris a été clonée et séquencée. L'analyse de la région proximale du promoteur révèle la présence d'une île CpG et de deux sites consensus d'éléments de réponse à l'AMPc (CRE). Le rôle de la voie de PKA dans la transactivation du promoteur NPC-1 a été testé par la transfection d'un fragment de 2,2 kb du promoteur cloné dans un vecteur rapporteur de luciférase dans les cellules de surrénale de souris Y1 et dans les cellules non-stéroïdogénique CV-1. Ce fragment du promoteur montre une activité constitutive qui est induit de 3-5 fois par l'ajout de 1 mM d'AMPc dans les cellules stéroïdogéniques. Cependant, cette induction par l'AMPc n'est pas présente dans les cellules CV-1. Nous concluons que le gène NPC-1 est régulé par l'AMPc. De plus, NPC-1 joue un rôle dans l'homéostasie du cholestérol intracellulaire et est essentiel pour le développement et les fonctions de la surrénale.

ABSTRACT

The Niemann-Pick C-1 (NPC-1) gene codes for an intracellular membrane glycoprotein that processes LDL-imported cholesterol. Its absence is characterized by pathologic accumulation of cholesterol in endosomes and lysosomes. NPC-1 is involved in steroidogenesis in the adrenal, ovary, testis and placenta. We investigated adrenal morphology of the BALB/c NPC-1^{-/-} mutant mouse. Adrenals of mutant and wild type mice were similar at three weeks, but were substantially smaller in NPC-1^{-/-} mice at eight weeks. The major histological difference was reduction in the thickness of the zona fasciculata, due to decreased cell volume. Lipid accumulation, revealed by Oil Red-O staining, was restricted to the zona fasciculata in wild type mice, but was found throughout the cortex in NPC-1 mutants. The 5'-flanking region of the mouse NPC-1 gene was cloned and sequenced. Comparison of the proximal promoter region revealed a CpG island and two consensus sequences for the cAMP response element (CRE). The role of the PKA pathway in transactivation of the NPC-1 promoter was probed by transient transfection of a 2.2 kb fragment of the 5'-flanking region fused to the luciferase reporter into mouse adrenal Y-1 and Leydig tumor cells and into nonsteroidogenic monkey kidney CV-1 cells. This promoter fragment displayed significant constitutive transcription, which was enhanced 3-5 fold in steroidogenic cells by treatment with 1 mM cAMP. The cAMP response was muted in CV-1 cells. We conclude that the NPC-1 gene is regulated by cAMP. It plays a role in normal cholesterol homeostasis and is essential for normal adrenal development and function.

INTRODUCTION

The Niemann-Pick C-1 (NPC-1) gene codes for a membrane glycoprotein involved in processing of low density lipoprotein (LDL)-imported cholesterol and in intracellular cholesterol homeostasis (1). Its absence is characterized by pathologic accumulation of cholesterol in endosomes and lysosomes, resulting in

premature death, from neuronal disruption (2, 3). Recent evidence indicates that NPC-1 protein resides primarily in the late endosomes and functions as a bulk trans-organelle transporter of cholesterol (1).

Cholesterol substrate for synthesis of steroid hormones is supplied principally by importation from extracellular sources in the form of low density or high density borne cholesterol (4). NPC-1 is in the LDL pathway, and mice homozygous for mutations of NPC-1 have impaired basal and ligand-induced testosterone synthesis (5). NPC-1 is highly expressed in steroidogenic tissues including the theca and luteal cells of the pig ovary (6), and NPC-1 mutant mice are infertile (7). Tissue distribution studies indicate that the pig adrenal expresses NPC-1 at high levels relative to other tissues (6). Cats bearing inactivating mutations in NPC-1 display adrenal insufficiency (8). NPC-1 mutant mice accumulate free, but not esterified cholesterol in the adrenal (9). Together, these studies provide ample reasons to believe that NPC-1 plays an important intracellular trafficking role in adrenal steroidogenesis. We therefore investigated NPC-1 in the adrenals of mutant and wild type mice. Our previous study indicated that cAMP was an important transcriptional regulator of NPC-1 in the pig (6), and this prompted us to investigate the NPC-1 promoter activity in the context of the mouse adrenal, using the Y-1 mouse adrenal tumor cells.

MATERIALS AND METHODS

Animal and cell models.

Heterologous NPC mutant mice (NPC^{+/-}) with a BALB/c background were obtained from the colony of Dr. Robert Erickson and bred in our laboratory. As the site of the mutation is known, animals were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) amplification of genomic DNA (10). The homozygote wild type animals (NPC^{+/+}) were compared to homozygous mutant mice (NPC^{-/-}) at eight weeks of age. The mouse Y1 adrenal tumor cell line (CCL-79, ATCC,

Manassas, VA) was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (Gibco/BRL, Burlington, ON) supplemented with 10 % horse serum, 2.5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. The mouse MA-10 Leydig tumor cell line, the gift of Dr. M. Ascoli, was cultured in Waymouths MB/752 medium supplemented with 15 % horse serum. The CV-1 green monkey kidney line was acquired from ATCC and cultured in MEM with 10 % fetal bovine serum.

Cloning of the 5'-flanking region of the mouse NPC-1 gene

The mouse NPC-1 promoter was cloned by means of the Universal Genome Walker Kit (Clontech, Palo Alto CA) according to the strategy that we previously described (6). The consequent fragment of 2.2 kb was cloned into the p-GEMT Easy vector (Promega, Nepean ON) and sequenced. Sequence comparison analysis was achieved using the MatInspector (Abteling Genetik, Braunschweig, Germany) and Clustal (European Bioinformatics Institute, Cambridge UK) software.

Plasmid Constructions, Transient Transfections, and Promoter Activity Assays

The 2.2 kb of NPC-1 gene promoter was cloned into pGL3 vector (Promega, Nepean, ON) with EcoRI. The expression vector, pRc/RSV-CREB, was a gift from Dr. Richard Goodman. All plasmids for transfection were prepared using the Maxi Prep kit (Qiagen, Mississauga, ON). Y-1 and MA-10 cells were transfected with 100 nM/well with 2.2 kb of the mouse NPC-1 promoter in the vector pGL3 using Effectene reagent (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Cells were co-transfected with the SV40 Renilla luciferase control vector pRL.SV40 (Promega) at a ratio of 10:1 of pNPC-LUC:pRL.SV40 to normalize results for transfection efficiency. CV-1 cells were transfected with the 4 µg mouse promoter using a standard Ca-PO₄ protocol. To correct for transfection efficiency, 1 µg of plasmid pCH110 expressing the β-galactosidase gene, was co-transfected according to procedures previously described (11). To determine the role of cAMP, co-transfection experiments were performed in which 80 ng of CREB expression vectors or an empty expression

vector for correction of total DNA were inserted using the Effectine reagent. Some cultures were treated with 1mM dbcAMP (Sigma, Oakville, ON) for 12 h. Luciferase activity was detected by the Promega Dual Luciferase Assay system and chemiluminescence measured in a Berthold 9501 luminometer. Control transfections included the inclusion of an equal amount of the promoter-less pGL3 basic plasmid (Promega).

Histological analysis.

Adrenals were recovered from wild type and NPC-1 mutant mice at eight weeks of age. Tissues were snap frozen on dry ice or fixed in 4% paraformaldehyde. Formaldehyde treated tissues were dehydrated, embedded in paraffin, cut at 7 μ thickness and stained with hematoxylin and eosin according to standard procedures. Frozen adrenals were cut on a cryostat and subjected to Oil Red O staining then counterstained with hematoxylin.

RESULTS

Effects of NPC-1 mutation on the adrenal

Comparison of adrenals acquired at eight weeks of age from wild type BALB/c mice (homozygotes NPC^{+/+}) and homozygous mutant mice (NPC^{-/-}) showed striking differences. The first was in size, the latter were consistently half or less the size of their wild type counterparts. This difference comprised a reduction in the thickness of the both the zona glomerulosa and the zona fasciculata, and the thickness of the medulla was likewise diminished (Figures 1 A and 1B). In the mutant mouse, the cells of the zona fasciculata had reduced dimensions, and the vascular channels appeared to be rectified relative to their more convoluted counterparts in same region in the wild type adrenal (Figures 1 C and 1D). Lipid accumulation, as evidenced by the presence of clear vesicles, was much reduced in the mutant zona fasciculata as well (Figure 1 D). A further conspicuous difference was in the thickness of the so-called fetal zone or x-zone that separates the zona fasciculata from the medulla. This region was expanded

in the mutant mouse adrenal relative to the wild type, accompanied by alterations in the morphology of the adjacent medullary chromaffin cells (Figure 1 E and F). Lipid staining with Oil-red-O revealed a further striking difference between the wild type, and NPC^{-/-} mice. In the former, lipid was concentrated in the zona fasciculata, and relatively absent in the zona granulosa and fetal zone (Figure 2). In the NPC^{-/-} mutant mouse, lipids revealed by this stain were distributed throughout the adrenal, with a strong medullary and fetal zone positive signal (Figure 2).

Sequence of the mouse NPC-1 promoter and induction of promoter activity by cAMP.

A fragment of 2.2 kb of the mouse promoter was analyzed, first by determination of the potential CRE sites, then by comparison with the other known NPC-1 promoter sequences, the human and the pig. Primer extension analysis has not been performed in any species, thus, the precise site of initiation of transcription was not clear, nor is it known whether multiple start sites exist. Homology of the first 434 bp upstream from the ATG translation start site with the human promoter was 51 %, while similar comparison with the pig promoter yielded 54 % homology (Figure 3). This region was rich in the nucleotides G and C, and had the characteristics of a CpG island. There were two CRE sites in the proximal 434 nt, bearing 100 % core homology to the canonical CRE. The first was at -104 nt, and the second at -182 nt upstream of the ATG. Neither was found at the same sites as the CRE elements in the human and pig promoters.

The mouse promoter construct showed constitutive activity in both steroidogenic (Y-1 and MA-10) and non-steroidogenic (CV-1) cells (Figure 4.) The response of the two steroidogenic cell types to 1 μ M dbcAMP averaged 3.5 fold ($p < 0.01$), while there was no significant response relative to control in CV-1 cells (Figure 4). Constitutive expression of CREB in Y-1 cells resulted a modest but significant increase in transcriptional activity ($p < 0.05$), while transfection of

CREB followed by treatment with cAMP induced a response that was the magnitude of the sum of the CREB and cAMP responses (Figure 5, $p < 0.01$).

DISCUSSION

NPC^{-/-} mutant mouse displays substantial reduction in adrenal size, and in the thickness of the zona fasciculata. The fact that these differences are not detected in postnatal and prepubertal animals (data not shown), suggests that this hypoplasia is not a congenital defect. The morphology of the NPC^{-/-} mouse adrenal displays characteristics similar to transgenic SF-1^{+/-} mice (12), in that the zona fasciculata is hypoplastic. There is further similarity to the Dax-1^{-Y} mouse, in the retention of the fetal zone (12). The Oil-red-O distribution in the NPC-1^{-/-} mutant strongly resembles the StAR knockout mouse rescued at birth by corticosteroid replacement (13). In that model, there is age-dependent accumulation of lipid across the adrenal cortex. The Oil-red-O findings in the NPC-1^{-/-} mouse are consistent with the known effects of loss of NPC-1 function where there is pathological accumulation of cholesterol in all tissues (2), and, in particular, elevated concentrations of unesterified cholesterol in the adrenal glands (9). In the SF-1^{+/-} heterozygote phenotype cortical hyperplasia is accompanied by reduced corticosteroid output and increased ACTH levels. It is not known whether the NPC-1^{-/-} mouse displays similar functional impairment.

The mouse NPC-1 promoter

Determination of the sequence of the mouse 5'-flanking region provides the third such report for this gene, after the human (14) and pig (6). The number and location of transcription start sites is unknown, thus, the current sequence and comparisons are based on distance from the translation initiation codon. Comparison of the first 434 bp revealed a CpG island, consistent with similar sequences in the human and pig promoters (14). It is clear from promoter activity assessment in all three species that there is significant constitutive transcription of the NPC-1 gene. From early studies of the human promoter it

was suggested that ligand or cytoplasmic induction of expression were minor (14). More recent investigation of the pig promoter has demonstrated robust cAMP (6, 15) and sterol regulatory element binding protein regulation of NPC-1 transcription (16). Indeed, the mouse sequence displays two well-defined CRE in the proximal promoter, in the same region, but not at the same sites as those found in the pig (15). Further, cAMP induction of promoter activity can be demonstrated in mouse adrenal tumor and Leydig tumor cells, both of which have steroidogenic capability. Further, experiments presented herein indicate that steroidogenic cells express NPC-1 more vigorously relative to a non-steroidogenic cell line, consistent with the view that the magnitude of constitutive expression of human NPC-1 varies among cell hosts (14). It is reasonable from the current investigation to conclude that constitutive expression of NPC-1 in the mouse is augmented by ligand and cAMP induction of transcription in the mouse adrenal.

In summary, mice bearing inactivating mutations of the NPC-1 gene have altered adrenal morphology and variant distribution of adrenal lipids. Adrenal tumor cell lines respond to cAMP by transactivation of the NPC-1 gene. Together, the evidence argues for a role of NPC-1 in adrenal steroidogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by funds from the Canadian Institutes of Health Research Operating Grant MT 11018 to B.D.M. We thank Dr. E. Lalli for aid in the early phases of the transfection study and S. Ledoux for aid with the investigation of morphology of the adrenal.

REFERENCES

1. Ioannou YA Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 2:657-68.

2. Pentchev PG, Brady RO, Blanchette-Mackie EJ, et al. The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *Biochim Biophys Acta* **1994** 1225:235-43
3. Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Patel S, Proestel M, Weintroub H The cholesterol storage disorder of the mutant BALB/c mouse. A primary genetic lesion closely linked to defective esterification of exogenously derived cholesterol and its relationship to human type C Niemann-Pick disease. *J Biol Chem* **1986** 261:2772-7
4. Murphy BD, Silavin SL Luteotrophic agents and steroid substrate utilization. *Oxf Rev Reprod Biol* **1989** 11:179-223
5. Roff CF, Strauss JFd, Goldin E, et al. The murine Niemann-Pick type C lesion affects testosterone production. *Endocrinology* **1993** 133:2913-23
6. Gévry N, Lacroix D, Song J-H, Pescador N, Dobias M, Murphy BD Porcine Niemann Pick-C1 is expressed in steroidogenic tissues and modulated by 3'5'-cyclic adenosine monophosphate. *Endocrinology* **2002** 143:708-16
7. Erickson RP, Kiela M, Devine PJ, Hoyer PB, Heidenreich RA *mdr1a* deficiency corrects sterility in Niemann-Pick C1 protein deficient female mice. *Mol Reprod Dev* **2002** 62:167-73
8. Brown DE, Thrall MA, Walkley SU, et al. Metabolic abnormalities in feline Niemann-Pick type C heterozygotes. *J Inherit Metab Dis* **1996** 19:319-30
9. Xie C, Turley SD, Dietschy JM Cholesterol accumulation in tissues of the Niemann-pick type C mouse is determined by the rate of lipoprotein-cholesterol uptake through the coated-pit pathway in each organ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999** 96:11992-7
10. Xie C, Turley SD, Dietschy JM Centripetal cholesterol flow from the extrahepatic organs through the liver is normal in mice with mutated Niemann-Pick type C protein (NPC1). *J Lipid Res* **2000** 41:1278-89

11. Murphy BD, Lalli E, Walsh LP, et al. Heat shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Endocrinol* **2001** 15:1255-63.
12. Babu PS, Bavers DL, Beuschlein F, et al. Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology* **2002** 143:665-73
13. Hasegawa T, Zhao L, Caron KM, et al. Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol Endocrinol* **2000** 14:1462-71
14. Watari H, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, et al. Determinants of NPC1 expression and action: key promoter regions, posttranscriptional control, and the importance of a "cysteine-rich" loop. *Exp Cell Res* **2000** 259:247-56.
15. Gévry N, Murphy BD Regulation of the Niemann-Pick C1 gene promoter by cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) and cyclic AMP response element binding protein (CREB). *Biology of Reproduction* **2001** 64 (Suppl. 1):264
16. Gévry NY, Murphy BD The Role of sterol regulatory element-binding proteins in the transactivation of Niemann-C1 promoter. Annual Meeting, Endocrine Society, San Francisco. **2002**

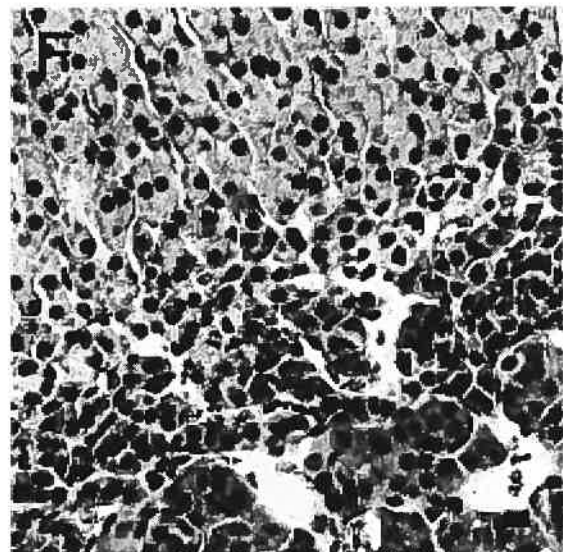
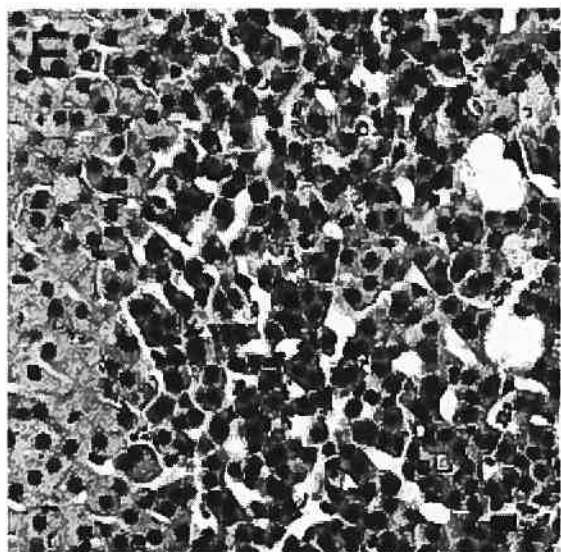
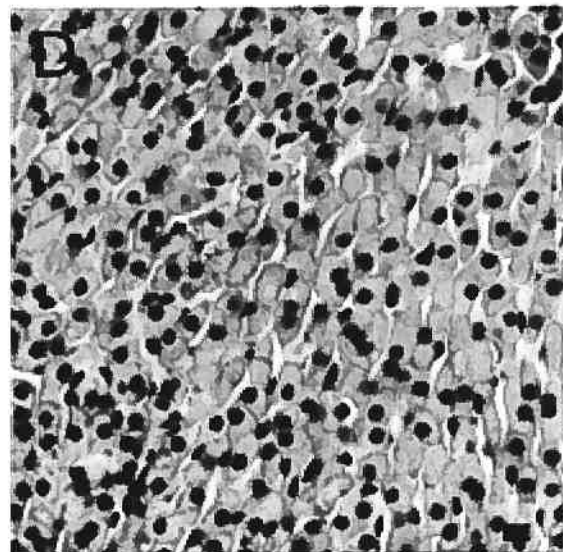
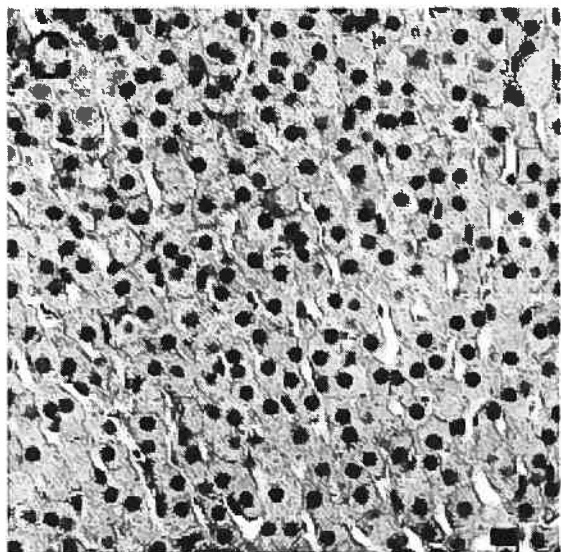
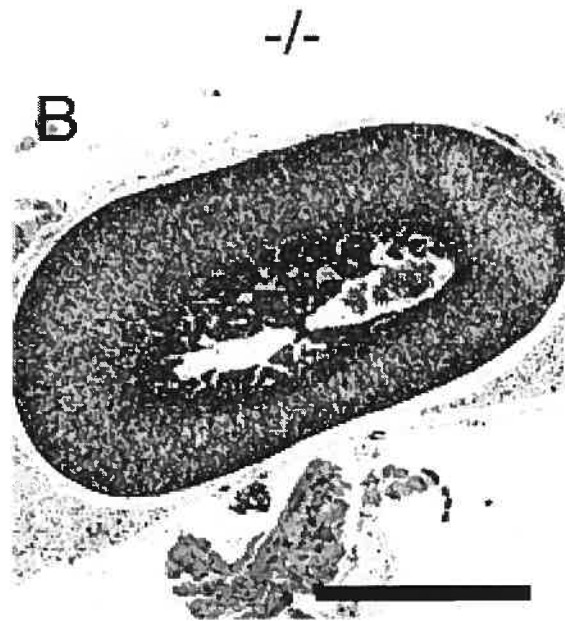
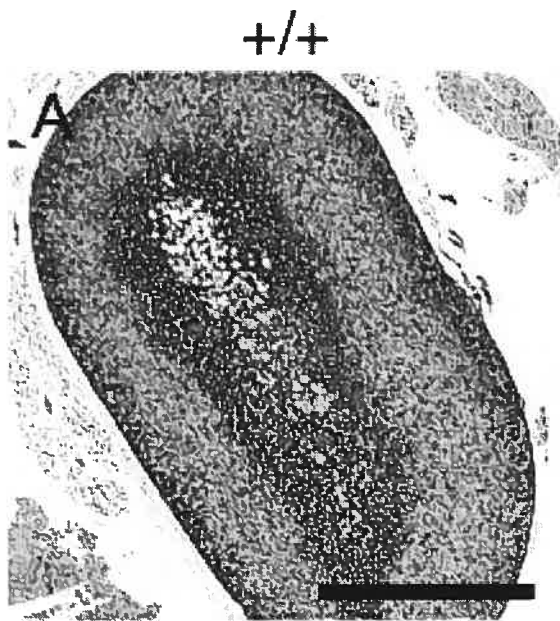


Figure 1. Photomicrographs of the adrenals of wild type (+/+) and NPC-1 mutant (-/-) mice. Tissues were collected from mice at eight weeks of age, fixed and sectioned. Panels A and B are representative cross-sections of whole adrenals, and the magnification bar indicates 0.5 mm. Panels C and D are higher power photomicrographs of the zona fasciculata, and the bar represents 50 μ . Panels E and F show the fetal zone, at the same magnification as in panels C and D.

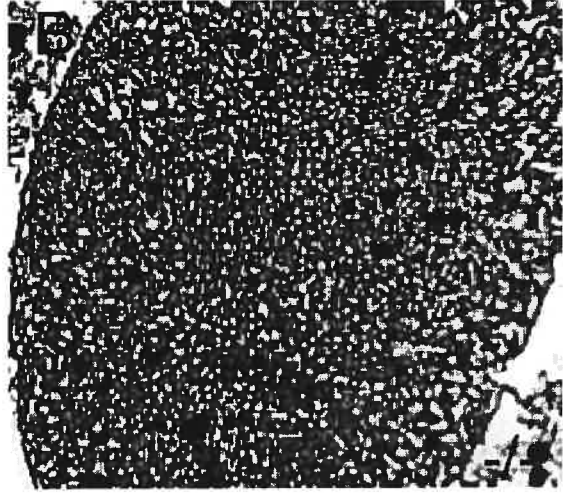
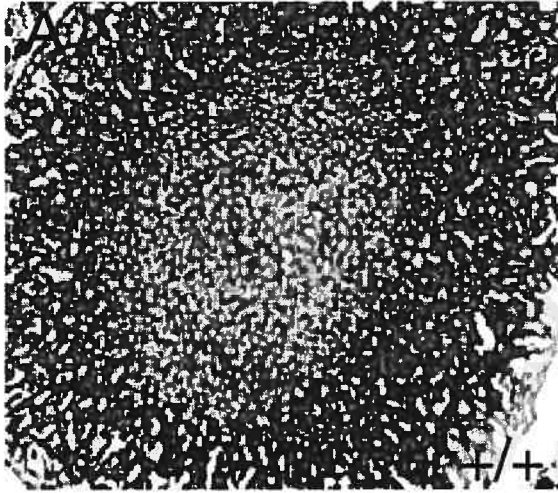


Figure 2. Lipids in wild type (+/+) and mice bearing an inactivating mutation of the NPC-1 gene (-/-). Cryostat sections of adrenals stained with Oil-red-O to show localization of lipids, primarily in the zona fasciculata of the wild type mouse and throughout the adrenal of the NPC-1 mutant.

```

human AAAGCATCACGGCCAGAAACCGTTGG..CACAACT..CCACAGTACTCT
pig AAAGGTTCAGCGGCTCAAGTCGGGCGTCCCCAAC..CCCTTGACGTGCC -356
mouse TTAGGGTGTGGGGGCGGGGAAGGTGTTCCAAAACCTGATCTAAGGCACG

human CCCGGGCCG AGCCAGACTCCATA..AGTCCCGCGCCTGCGCCCGGGGAT
pig CCCAGGCGC AGCAGGGCGG.AGA..AGCGCAGAGCCGCGCGTTGGGAGGG -306
mouse CCCACAAGG GCGGGGGCTACGCAGACGCCGGAGAAAAGGG...GGGTTA

human TGCAGGGGC.TGAGGAGAAGGGCAACACGGGGACCTTGAAGCGGG GTCG
pig TGCC TGCCCTCACGAGGT.....CGGGTCCGCTTAGCCCC GCCC -256
mouse GCCG TCCTAGAGGGCGCTGCAGACGTGGCTCGGCAAAGGGCTTGGCC

human CGGCGGCGCC...CAGCCCGGGCCAGG.GAGT....CCCGGCAGCGGC
pig CTGTCCCGCC...AAGACGATCCAGG.GCGT....CCCGGCAGTGGC -206
mouse CAGCAATCGCTCTAAGCCGGGTCCCTGAGAGTTTAGCCCGCCTCCGGG

human ACCTCCAGAAA..GG.GCGGAGCCGACGACGCCTTCCTCCTTCCTGACCG
pig TCCACCCAGAAGTGG.GAGGGCCGACGACGCCTTC...CTTCCTGACCT -156
mouse GAGGGCCCGAGAGGCAGCAGCGCTGACACCGCCTCCGTCCTTCCTGCCTT

human GCGCGCGCAGCCTGCTGCGCGGTCAGCGCCTGCTCCTGCTCCTCCGCTC
pig GCGCGCGCAGCCAGCCGGCTCTG...GTGTCTGTTCC..CTCC....CTC -106
mouse GCGCACACAGTCCGCCGTCT.....GCTCTTGCCCC..CTCC....TTG

human CTCTGCGCG GGTGCTGAAACA.GCCCGGGGAAGTAGAGCCGCCTC...
pig AGCCGCGCGGCAGCCTGAGAG.TCTCGGG.ACGCTGAACCG..... -56
mouse GTCAGGCGCCGGTTCCGAACCTTGCCCGCCAGTECCCGACGCTCGGGT

human CGGGGAGCCCAACCCAGCCGAACGCCGCCGGCGTCAGCAGCCTTCCGCGGC
pig ...GA...CTGCCAGCTGAAC..CTCGGACGTCCGCCGCCCGCGCTCGC -6
mouse CGCGGTGCTCCGCGAGCCGAAC...T..GAGAGCTGTAGCCCCCGCGCGGC

human CACAGCATGACCGCTCGCGGCGTGGCCCTTGGCC
pig GGCAGCATGAGCGCGCGGGCCCGGCCCTTCGGCC +28
mouse GACAGCATGGGTGCGCACCAACCGGCCCTTCGGCC

```

Figure 3. Comparison of the proximal fragment of the mouse NPC-1 5'-flanking region with corresponding regions of the pig and human NPC-1 promoters. Black indicates nucleotide identity among all three species, gray indicates identity between two, and nucleotides on white background show no identity. The putative CpG island is delineated by a single underline, while regions with high homology to the CRE core sequences have a double underline.

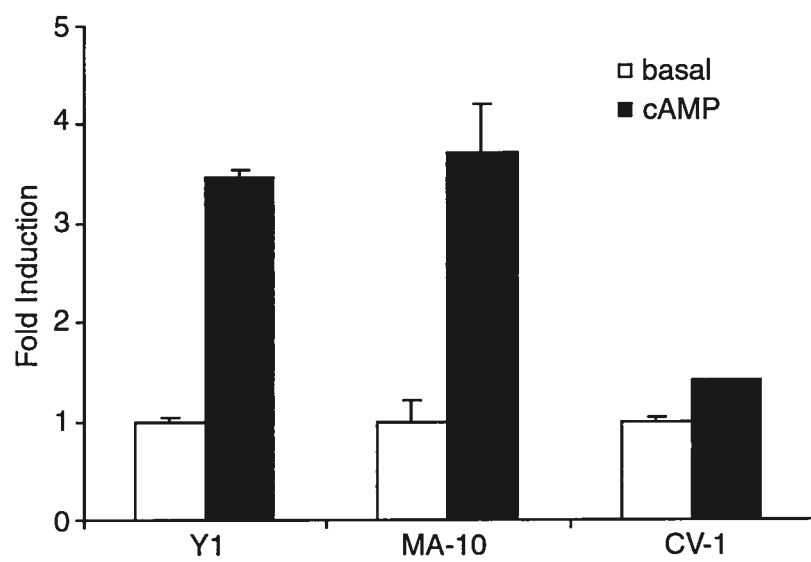


Figure 4. Activity of the 2.2 kb mouse NPC-1 promoter-luciferase construct in mouse adrenal Y-1 tumor cells, mouse MA-10 Leydig tumor cells and monkey kidney CV-1 cells. Cells were treated for 12 h with 1mM dbcAMP. Constitutive values for each cell type were designated 1.0, and relative fold induction was calculated.

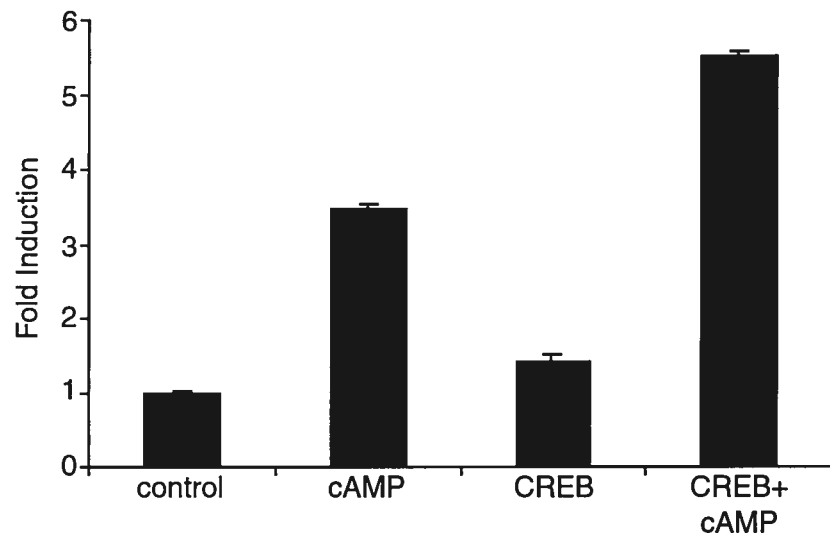


Figure 5. Additive effects of cAMP response element binding protein and cAMP on transactivation of the mouse NPC-1 gene in mouse adrenal Y-1 cells, as revealed by transient transfection assays. A construct inducing constitutive expression of CREB was transfected along with the mouse NPC-1 promoter-luciferase construct. In treatment designated CREB+cAMP, cells were treated for 12 h with 1mM dbcAMP.

IV. Discussion générale

L'ensemble des résultats rassemblés dans ce recueil présente de nouvelles informations sur le rôle et la régulation de la protéine NPC-1 dans la stéroïdogénèse, et plus particulièrement, dans son implication dans la lutéinisation. Comme nous avons pu le constater à travers cet ouvrage, le transport du cholestérol dans la cellule demeure une étape cruciale pour le maintien de l'intégrité et des fonctions cellulaires. Néanmoins, l'information entourant la compréhension des mécanismes de distribution du cholestérol reste nébuleuse. Par conséquent, il est important de comprendre le pourquoi et le comment de ces mécanismes dans la distribution ordonnée du cholestérol intracellulaire. Ainsi la découverte de la protéine NPC-1 a entrouvert la porte sur la distribution du cholestérol dérivé des LDLr. Le caractère neuro-pathologique associé avec la mutation du gène NPC-1 a amené des études intensives sur les mécanismes de la protéine au niveau du système neurologique. Cependant, jusqu'à ce jour aucune ou peu de recherches n'avaient été faites sur l'implication et la régulation de NPC-1 dans un système stéroïdogénique.

Comme nous le savons maintenant, l'apport du cholestérol au site de production de la prégnégnolone s'avère une étape limitative de la stéroïdogénèse (Stocco, 2001a). Donc, l'entrée du cholestérol provenant des LDLr vers le pool stéroïdogénique semble d'une importance capitale puisque la principale source de cholestérol utilisée par la majorité des mammifères provient de cette voie (Gwynne & Strauss, 1982). Ainsi, la protéine NPC-1 jouerait un rôle charnière entre l'entrée du cholestérol des LDL et les différentes organelles de la cellule. Toutefois, il sera nécessaire d'approfondir son véritable mécanisme avant de tirer des conclusions trop hâtives.

1.1. L'implication de la protéine NPC-1 dans la stéroïdogénèse

Les résultats des études effectuées au niveau du corps jaune et du système de culture *in vitro* des cellules de granulosa porcines, montrent bien l'implication de la protéine NPC-1 dans le processus de différenciation. La lutéinisation *in vivo* chez le porc est caractérisée par une augmentation de la sécrétion de progestérone de plus de 40 fois (Kieborz, Silvia & Edgerton, 1991). Ainsi, les résultats montrent une augmentation de l'expression du messenger de NPC-1 avec les différents stages de la lutéinisation. De plus, ces résultats sont corroborés avec le système de lutéinisation *in vitro* des cellules de granulosa où la sécrétion de progestérone est aussi augmentée d'environ une centaine de fois (Magnus, 1901). La grande production de progestérone retrouvée *in vivo* et *in vitro* chez le porc requiert un apport accru en cholestérol vers les mitochondries. Le chemin suivi par le cholestérol en association avec les protéines impliquées dans ce processus, nous permet de tirer des conclusions sur la régulation de la voie empruntée. Comme nous avons discuté précédemment, la principale voie d'apport du cholestérol dans les cellules stéroïdogéniques est faite via les LDLr chez la majeure partie des mammifères (Chaffin, Dissen & Stouffer, 2000; Grummer & Carroll, 1988; LaVoie *et al.*, 1997; Reaven *et al.*, 1994; Soumano & Price, 1997; Veldhuis *et al.*, 1986; Yamada *et al.*, 1998) incluant le modèle porcin. Une augmentation de l'expression des gènes de cette voie est nécessaire pour un apport suffisant du cholestérol aux mitochondries. Sekar *et al.* ont déjà rapporté une augmentation de l'expression du gène codant pour les LDLr durant la lutéinisation. La protéine charnière NPC-1 doit donc être capable de répondre à cette hausse de l'entrée du cholestérol pour permettre une utilisation de celui-ci. Il existe maintenant un lien direct entre les différents transporteurs du cholestérol lors de la lutéinisation. Il se résume par une augmentation de l'expression de l'ARNm des gènes LDLr, NPC-1 et StAR.

La figure 1 résume les trois sources du cholestérol intracellulaire. Comme nous pouvons le voir, NPC-1 assure la distribution du cholestérol libre provenant de l'internalisation et de l'endocytose des LDLr (Ioannou, 2001). Ainsi, cette distribution fera en sorte d'augmenter le pool de cholestérol intracellulaire et ainsi le rendre accessible à la protéine StAR sous la forme de cholestérol libre. Les autres sources de cholestérol illustrées sont celles provenant des HDLr (2) et de la production de cholestérol novo de l'ACAT (3).

1.2. Les mécanismes de régulation du gène NPC-1

La stéroïdogénèse dans les différents tissus incluant le corps jaune et la surrénale est engendrée en réponse à un stimulus extracellulaire via les hormones peptidiques comme la LH et l'ACTH. Ces éléments de réponse sont caractérisés par l'augmentation de la voie de signallement de l'AMPC-PKA et l'activation de facteurs de transcription comme la phosphorylation de CREB (Richards, 2001). Il est sensé de prédire que l'activation du gène NPC-1 au moment de la lutéinisation est le résultat de l'induction engendrée par le pic de LH et de l'augmentation de l'AMPC intracellulaire. Comme dans le cas du gène StAR, l'activation de la transcription menée par les éléments de réponse à l'AMPC représente une grosse partie du signallement positif de ce gène (Christenson & Strauss, 2001; Manna *et al.*, 2002). Toutefois, ces résultats viennent contredire l'ancienne mentalité qui caractérisait le gène NPC-1 comme étant un gène constitutivement exprimé (Morris *et al.*, 1999; Ory, 2000; Watari *et al.*, 2000). De plus, les résultats sur la distribution tissulaire montrant une forte expression de NPC-1 dans les tissus stéroïdogéniques comme la surrénale, les testicules et les ovaires en comparaison avec les autres tissus non ou peu stéroïdogéniques, nous permettaient d'entrevoir une possible régulation de ceux-ci.

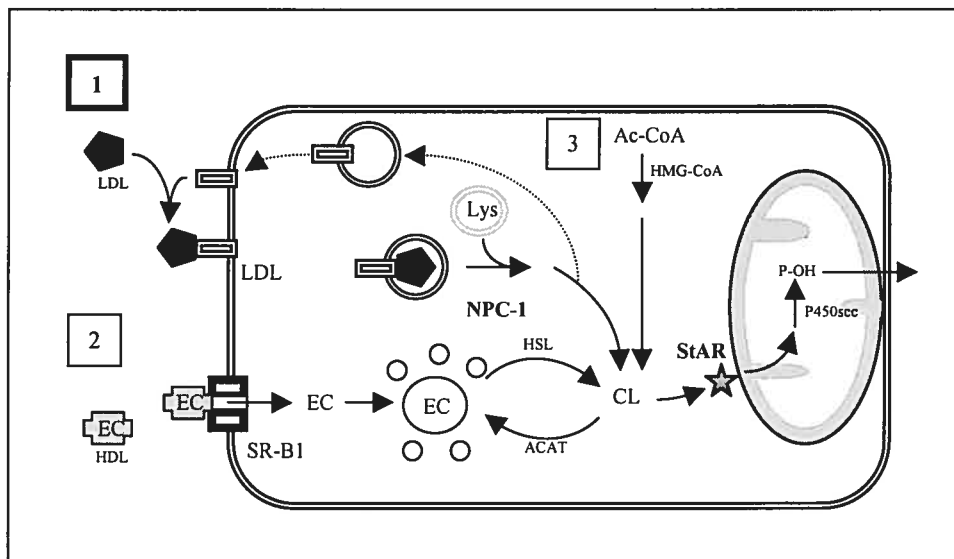


Figure 1. Les trois différentes sources d'apport du cholestérol libre dans les cellules stéroïdogéniques : (1) l'internalisation et l'endocytose des LDLr libèrent les esters de cholestérol qui seront hydrolysés et transportés dans le cytoplasme par la protéine NPC-1 sous la forme de cholestérol libre; (2) les esters de cholestérol provenant des particules de HDL sont internalisés et clivés par l'enzyme lipase hormono-sensible; et (3) la synthèse de cholestérol novo par l'acyl coenzyme A: cholestérol-acyl transférase (ACAT), CL cholestérol libre; EC, esters de cholestérol; Lys, lysosome; P-OH, prégnénolone.

Les résultats obtenus avec l'analyse de l'activité du promoteur NPC-1 porcin en réponse à l'AMPc, montrent l'implication de deux facteurs de transcription activés au moment du déclenchement du processus de lutéinisation. Premièrement, la découverte de deux sites potentiels d'interaction avec CREB sur la séquence du promoteur NPC-1, a permis de démontrer par différentes techniques (transfection transitoire, co-transfection, gel à retardement) l'authenticité et la responsabilité de ces deux sites en réponse à l'activation de PKA.

Un des aspects importants à mentionner est l'utilisation des cellules cancérigènes Y1 de surrénale de souris nécessaire pour démontrer l'activation par l'AMPc. À ce moment, il était primordial de comprendre pourquoi les cellules de Y1 donnaient une meilleure réponse au moment de l'activation par l'AMPc en comparaison avec l'utilisation de d'autres types cellulaires comme les cellules de granulosa. Un caractère particulier des cellules Y1 est la surexpression du facteur de transcription SF-1 qui est aussi activée par le second messenger (Aesoy *et al.*, 2002). Cette surexpression associée avec la perte ou la diminution de l'expression de SF-1 engendrée par l'immortalisation des cellules de granulosa (résultat non-présenté) nous amena à faire l'hypothèse que le facteur SF-1 était essentiel à la régulation du promoteur NPC-1 par CREB. Cette interaction a été suggérée pour la première fois par Parker et Schimmer (Parker & Schimmer, 1995) dans l'activation du gène P450scc et a été observée par la suite sur plusieurs autres gènes associés à la stéroïdogénèse (Carlone & Richards, 1997). Ces effets se distinguent soit par un effet additif avec l'activation faite par CREB ou par une synergie dans l'activation des gènes cibles (Ito *et al.*, 2000). Plusieurs mécanismes d'interaction entre SF-1 et CREB ont été suggérés, incluant le recrutement de co-facteurs par le récepteur nucléaire orphelin (Ito *et al.*, 2000; Jacob *et al.*, 2001). Néanmoins, l'ajout du facteur de

transcription SF-1 dans le mécanisme général d'activation en réponse à l'AMPC venait expliquer les différences retrouvées au niveau des différents types cellulaires utilisés.

Maintenant, il est clair que seule la présence des différents facteurs de transcription n'est pas suffisante pour induire l'activation de la transcription. La transcription est plutôt un mécanisme dynamique qui fait intervenir d'une manière spatio-temporelle plusieurs facteurs et co-facteurs dont le but ultime est de créer un environnement favorable pour la fixation de l'ARN polymérase II qui est nécessaire à l'initiation de la transcription. Comme ce fut décrit dans la revue de littérature, la régulation épigénétique par la modification post-transcriptionnelle des histones semble un pré-requis à l'activation des gènes. Désormais, il existe plusieurs évidences que le remodelage de la chromatine s'effectue par la modification du corps des histones dans l'activation des gènes cibles (Strahl & Allis, 2000; Struhl, 1998; Wu, 1997). Cette modification du corps des histones se fait par l'addition covalente d'un groupe acétyle ou phosphore aux résidus lysine ou sérine des histones H-3 ou H-4. L'acétylation neutralise les charges positives des histones et la phosphorylation, ajoute des charges négatives, ce qui a pour conséquence de diminuer l'affinité des histones à l'ADN (Struhl, 1998). Le résultat final de ces modifications est la déstabilisation des nucléosomes et de la structure de la chromatine, qui elle a pour but d'augmenter l'accessibilité aux facteurs et co-facteurs de transcription à une région spécifique du promoteur cible.

Le recrutement de différents co-facteurs est important dans l'activation via le facteur CREB, du fait qu'il joue un rôle dans la modification des histones (Korzus *et al.*, 1998). De plus, il a déjà été démontré que l'acétylation des histones H-3 en réponse à l'AMPC régule

StAR, un autre transporteur de cholestérol activé pendant la lutéinisation (Christenson *et al.*, 2001b). Donc, les résultats obtenus concordent avec le modèle d'un mécanisme global et dynamique d'activation des gènes.

L'acétylation des histones H-3 dans le promoteur proximal de NPC-1 en réponse à l'AMPc est conséquent à la phosphorylation de CREB (Mayr & Montminy, 2001). CREB a besoin d'être phosphorylé pour permettre le recrutement du co-facteur CBP possédant une activité acétyl-transférase envers les histones (Chrivia *et al.*, 1993). De récentes études ont démontré que SF-1 en conjonction avec PKA, CREB et CBP, induit d'une manière synergique le promoteur de l'inhibine α (Ito *et al.*, 2000). Ce qui permet de mentionner que CBP n'est pas seulement recruté par CREB phosphorylé, mais aussi par SF-1 (Clemens *et al.*, 1994; Monte, DeWitte & Hum, 1998). Les résultats de l'essai par immuno-précipitation de la chromatin (ChIP), montrent d'une façon éloquente la présence de CBP en présence d'AMPc associé à la partie proximale du promoteur NPC-1. Ainsi, sa présence permettrait de faire le pont entre les facteurs de transcription SF-1 et CREB et le complexe de la machinerie transcriptionnelle. Ces données s'harmonisent aussi avec d'autres observations qui démontrent l'association de l'acétylation des histones H-3 avec des gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol comme l'HMG-CoA et les LDLr (Bennett & Osborne, 2000). Le rôle de PKA en réponse à ces événements est principalement lié à la phosphorylation de CREB (Mayr & Montminy, 2001) et au recrutement de CBP (Ito *et al.*, 2000; Kwok *et al.*, 1994).

Cependant, la translocation de la sous-unité catalytique de PKA vers le noyau de cellules en réponse aux hormones peptidiques, résulte en la phosphorylation de CREB et des histones H-3 (DeManno *et al.*, 1999). Il a été déjà démontré que la sous-unité de PKA est capable de phosphoryler les histones H-3 *in vitro* (DeManno *et al.*, 1999) et que cette phosphorylation associée avec l'induction de la FSH dans les cellules de granulosa de rats

peut être bloquée par l'ajout d'inhibiteurs de PKA (Salvador *et al.*, 2001). Les expériences de CHIP sur la phosphorylation de l'histone H-3 concordent avec une augmentation de cette modification des histones en réponse à l'AMPc. Toutefois, la phosphorylation des histones a longtemps été liée avec la prolifération cellulaire (Cheung, Allis & Sassone-Corsi, 2000), sauf qu'il y a certains précédents qui l'associent aussi avec la différenciation (DeManno *et al.*, 1999).

D'autres résultats d'un article en préparation et non-présentés dans cette thèse, démontrent une association du facteur de transcription SREBP avec le promoteur NPC-1. SREBP représente un facteur essentiel à la régulation des gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol (Sakai & Rawson, 2001). Ainsi, les données globales de cette étude montrent une activation du promoteur NPC-1 par une surexpression de SREBP et par la déplétion de cholestérol dans les cellules de granulosa. De plus, il a été possible d'associer une augmentation de l'acétylation des histones H-3 en réponse à une baisse de cholestérol intracellulaire. Cette association cadre bien avec le modèle qu'au moment du déclenchement du processus de lutéinisation par le pic de LH, il se produit dans les cellules une baisse momentanée et courte du cholestérol intracellulaire. Cette baisse favorise donc l'activation du facteur de transcription SREBP (Lopez & McLean, 1999) et l'activation des gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol intracellulaire.

En prenant l'ensemble des résultats sur la régulation de l'expression de NPC-1, il est difficile de déterminer l'ordre des événements entre la liaison des facteurs de transcription, le recrutement des co-facteurs et la modification de la structure de la chromatine engendrée par la phosphorylation et l'acétylation des histones. La figure 2 résume bien le

modèle d'activation du gène NPC-1 par l'AMPc dans les cellules stéroïdogéniques. Les ligands extracellulaires qui induisent la stéroïdogénèse comme l'ACTH dans la surrénale, la LH dans les cellules lutéales et dans les cellules de Leydig, activent la voie classique de l'adénylate cyclase qui elle résulte en une production d'AMPc. Ce second messenger va par la suite activer la PKA en libérant sa sous-unité catalytique dont le but est d'aller phosphoryler la sérine 133 de CREB. CREB s'associe en dimère sur les sites de reconnaissance; SF-1 se lie et interagit avec CREB pour activer la transcription. Comme discuté précédemment, la phosphorylation de CREB est suffisante pour activer l'expression des gènes cibles, mais l'addition de co-facteurs est nécessaire pour une réponse maximale (Mayr & Montminy, 2001). Par la suite, CBP est recruté au complexe de transcription. CBP, avec son activité acétyl-transférase, va acétyler les histones H-3 associés avec le promoteur NPC-1 et favoriser une augmentation de la transcription. Simultanément, l'histone H-3 est phosphorylé par la PKA ou un autre kinase en aval de PKA. La conséquence finale de ces modifications est de permettre la liaison de la machinerie transcriptionnelle, dites générale, et l'apport de l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription. Il est possible d'ajouter indirectement au modèle d'activation de NPC-1, le facteur de transcription SREBP, qui est présent dans l'activation des gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et qui est capable d'interagir avec CREB (Bennett & Osborne, 2000; Halder *et al.*, 2002), SF-1 (Lopez & McLean, 1999; Shea-Eaton *et al.*, 2001) et avec le co-facteur CBP (Ericsson & Edwards, 1998).

1.3. Les souris mutées sur le gène NPC-1

Il a nous été permis, avec l'utilisation de souris mutantes du gène NPC-1 (NPC-/-), de déterminer son rôle dans la stéroïdogénèse. Le point de départ de cette investigation a été sans aucun doute la caractéristique

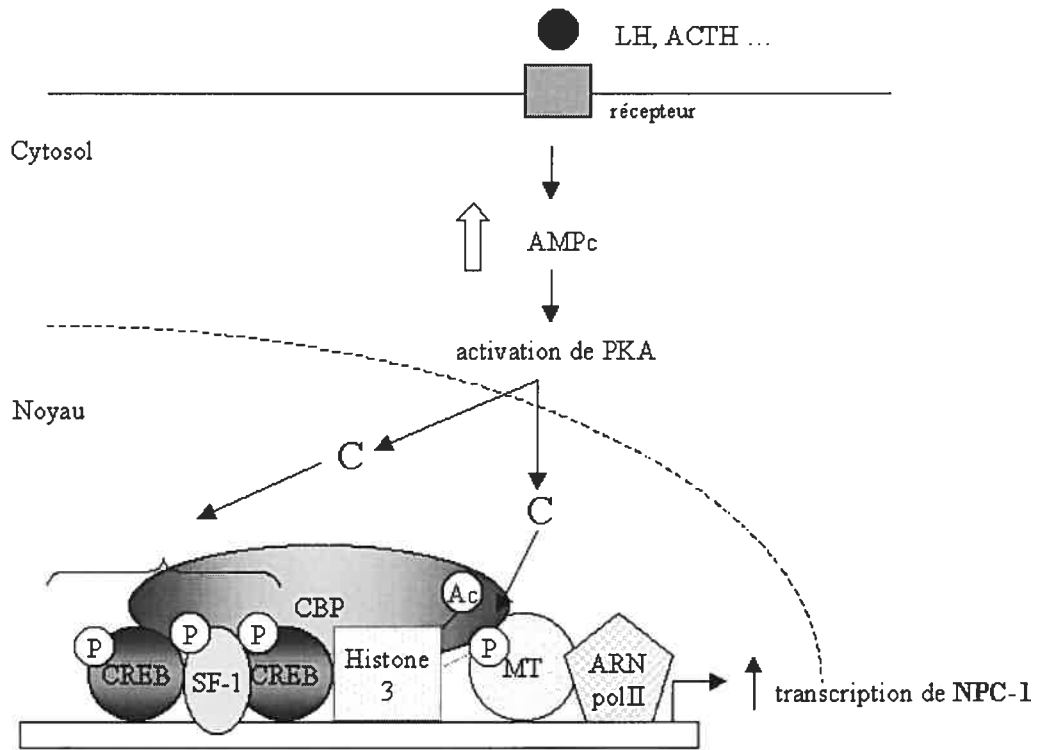


Figure 2. Modèle d'activation du promoteur NPC-1 par la voie de l'AMPc-PKA. La LH (pour les cellules de la thèque, lutéales et Leydig) ou l'ACTH (cortex de la surrénale) induisent la formation de l'AMPc et la libération de la sous-unité catalytique de la protéine kinase A (PKA). Cette enzyme a de multiples effets, ce qui inclut la phosphorylation directe de CREB, le recrutement du co-activateur CBP et la phosphorylation directe ou indirecte de l'histone H-3. Conséquemment, cette induction de l'activation du gène NPC-1 engendre une interaction entre le facteur CREB et SF-1 et une modification épigénétique par l'acétylation de l'histone H-3.

d'infertilité retrouvée chez les mâles et femelles. Ces souris représentent un modèle d'appoint important dans la compréhension de la maladie de Niemann-Pick de type C et permettent une plus grande latitude du point de vue expérimental. À ce jour, peu de personnes ont entrepris de comprendre les problèmes endocriniens de cette maladie reliée à la fertilité et au fonctionnement de la glande surrénale.

Les résultats obtenus ont démontré un niveau de complexité beaucoup plus grand que ce à quoi on pouvait s'attendre. Les causes de l'infertilité chez la femelle ne sont pas exclusivement dues à une défaillance de l'ovaire, mais elles sont aussi causées par un problème de l'axe hypothalamus-hypophyse. Ces hypothèses ont pu être établies après les expériences d'induction de l'ovulation avec l'injection de gonadotrophines exogènes et principalement par la transplantation d'ovaires de souris mutantes dans des souris normales. Les résultats ainsi obtenus démontrent un rétablissement du processus de l'ovulation et de la formation du corps jaune. Par conséquent, le problème semblait plutôt extrinsèque qu'intrinsèque à l'ovaire.

Une analyse approfondie de l'hypophyse a révélé une partie du problème de cette mutation. Ces souris démontrent une hypoplasie de l'hypophyse caractérisée par une diminution considérable de la production de prolactine et une sécrétion plus grande de FSH et de LH. Une diminution de la production de la prolactine ne vient pas expliquer directement le problème lié à l'ovulation et à la formation du corps jaune. Les souris mutantes sur le gène de la prolactine ou sur le récepteur montrent une irrégularité dans le cycle oestral, une absence de pseudo-gestation, un problème au niveau du développement des glandes mammaires et elles sont infertiles (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Toutefois, ces souris ne démontrent pas

une stérilité totale, l'ovulation est diminuée, mais la principale défaillance vient plutôt au niveau de l'implantation de l'embryon. Donc, le problème relié à la fertilité des souris NPC-1 semble plus général qu'un simple problème de production de la prolactine. Un problème de sécrétion d'œstradiol relié à un manque de la hausse du pic préovulatoire de LH et à un problème de la production de prolactine caractérise l'infertilité de ces souris. Ces différents points de régulation se retrouvent reliés. La hausse du niveau d'oestradiol est nécessaire à l'induction de la sécrétion de la LH (Hillier, 2001) au niveau de l'axe de l'hypothalamus-hypophyse et elle est aussi essentielle à l'induction de la prolactine (Freeman *et al.*, 2000).

L'activation des récepteurs de dopamine D2 régule plusieurs fonctions dans le système nerveux central et dans la glande hypophysaire (Baik *et al.*, 1995; Picetti *et al.*, 1997; Saiardi *et al.*, 1997). Dans l'hypophyse, les voies de transduction des récepteurs de dopamine D2 régulent négativement la synthèse et la sécrétion de la prolactine (Ben-Jonathan, 1985; Elsholtz *et al.*, 1991). Les récepteurs de dopamine D2 existent sous deux isoformes distinctes; la forme longue et courte. Les deux isoformes sont générées par un épissage alternatif du même gène. Des expériences *in vitro* ont suggéré que les deux isoformes pourraient activer différentes voies de signallement *in vivo* (Guiramand *et al.*, 1995). Quelques découvertes récentes sur la régulation de la production et de la sécrétion de la prolactine ont été faites à partir de souris surexprimant les deux différentes isoformes des récepteurs de la dopamine D2 (Iaccarino *et al.*, 2002). Les résultats au niveau de l'hypophyse obtenus avec les souris surexprimant la forme courte ressemblent beaucoup à ceux obtenus avec les souris NPC-/- . Ainsi, les deux types de souris montrent une hypoplasie de l'hypophyse et une diminution de la synthèse de prolactine. De plus, les autres hormones ne sont pas affectées par ces changements. La conclusion de ces résultats

montre qu'un changement dans le ratio de la forme longue sur la forme courte affecte différents paramètres dans la régulation de la prolactine. Un ratio qui favorise la forme longue affecte la sécrétion de la prolactine et un ratio qui privilégie la forme courte affecte plutôt la synthèse de prolactine et le nombre de cellules lactotrophes. Donc, les souris normales doivent posséder un contrôle strict du ratio des deux isoformes pour répondre à une baisse ou à une hausse de synthèse et de sécrétion de prolactine. Il y a aussi une autre étude qui vient appuyer ces résultats (Guivarc'h, Vincent & Vernier, 1998) et qui montre l'implication des stéroïdes dans la régulation du ratio des deux isoformes. Les données ainsi obtenues, dévoilent sous l'effet de l'oestradiol ou de la testostérone, que les cellules lactotrophes favorisent l'expression de la forme longue et que sous des conditions de privation d'hormones le ratio est diminué, ce qui indique une hausse de la forme courte. Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus sur la régulation de la prolactine viennent s'expliquer par un dérèglement du ratio en faveur de la forme courte dans les souris NPC -/-. L'hypoplasie de l'hypophyse associée au patron d'expression du récepteur dopamine D2 peut être aussi le résultat d'un manque dans le contrôle de rétroaction de l'oestradiol sur les cellules sécrétant la dopamine dans l'hypothalamus (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). Ainsi, une inactivation des deux isoformes du récepteur dopamine D2 amène une hyperplasie et une sécrétion accrue de prolactine. Cependant, cette hyperplasie peut se changer en hypoplasie par une castration des ovaires et conséquemment une réduction des estrogènes (Hentges & Low, 2002).

Il est aussi possible que l'infertilité des souris NPC-/- soit causée par la diminution de la sécrétion de l'oestradiol dans les cellules de granulosa des follicules en croissance. Une inactivation du gène responsable de la production d'oestradiol (CYP19) chez les souris femelles résulte en une perturbation de la folliculogénèse et de l'ovulation (Britt *et al.*, 2001). Ces

souris montrent un niveau sérique de FSH et LH semblable au souris NPC-/- . Ainsi, l'effet positif des estrogènes sur l'induction du pic de LH est compromis. Cependant, le mécanisme en cause dans la réduction de la sécrétion d'estrogènes dans les souris NPC-/- n'est pas bien compris. Le problème de production et de sécrétion d'androgènes retrouvés chez les souris mâles suggère (Roff *et al.*, 1993) une possible défectuosité dans la formation des précurseurs d'androgènes nécessaire à la production de l'oestradiol dans les souris femelles. Il est bien connu que la LH est requise pour la production des androgènes dans les cellules de Leydig et dans les cellules de la thèque et qu'elle est aussi responsable de la sécrétion de progestérone par les cellules lutéales. De plus, la prolactine est capable d'induire l'expression des récepteurs de LH dans les cellules de l'ovaire (Gafvels, Bjurulf & Selstam, 1992). Donc, il serait raisonnable de penser que l'absence de prolactine dans les souris NPC -/- peut atténuer la réponse des ovaires à la LH, tout en diminuant la sécrétion d'oestradiol et prévenant l'ovulation. Toutefois l'ensemble de ces résultats suggère que la prolactine n'est pas absolument nécessaire à l'ovaire.

Néanmoins, il est important d'ajouter qu'il est aussi possible que cette infertilité soit causée par un problème neuronal. Loftus et al. ont démontré par une stratégie de thérapie génique avec l'aide de vecteurs viraux, exprimant le gène NPC et dirigé vers le système nerveux central, qu'il était possible d'allonger la vie des souris mutantes et de les rendre fertiles (Loftus *et al.*, 2002). De plus, la neuro-dégénération causée dans les souris NPC -/- est progressive et caractérisée par une dégénérescence accrue de l'hypothalamus avec l'âge (Ong *et al.*, 2001). Comme la sécrétion des gonadotrophines et de la prolactine est sous le contrôle de l'hypothalamus, celle-ci pourrait expliquer les différences entre les souris normales et mutantes avant et après la puberté.

1.4. Directions Futures

Le mécanisme de transport du cholestérol par la protéine NPC-1 demeure encore mal compris. Les recherches à ce sujet pourraient permettre de mieux comprendre l'essentiel de cette voie de distribution du cholestérol. De plus, il n'y a pas encore d'évidence frappante entre l'implication de NPC-1 dans l'augmentation du cholestérol intracellulaire et la hausse de la production des stéroïdes. Il serait important de comprendre le rôle que joue le domaine senseur au cholestérol dans la structure de NPC-1. Une mutation dans ce domaine inactive complètement la protéine ce qui provoque une accumulation du cholestérol dans les lysosomes (Watari *et al.*, 1999b). Une hypothèse serait de dire que ce domaine en contact avec le cholestérol apporterait un changement de conformation de la structure de la protéine NPC-1. Ce changement serait essentiel à l'activation de la protéine et aux étapes subséquentes de distribution du cholestérol.

La compréhension des mécanismes de régulation de la transcription du gène NPC-1 est relativement récente. Beaucoup de gens jusqu'à aujourd'hui pensaient que NPC-1 était exprimé constitutivement. Cependant, nos récentes découvertes semblent dire le contraire. La complexité des mécanismes de régulation ouvre la porte sur différentes possibilités dans l'activation de NPC-1. Des études plus approfondies sur la régulation de NPC-1 apporteraient sans aucun doute la découverte de nouveaux facteurs de transcription impliqués dans différentes voies d'activation. Il serait important aussi de mieux comprendre le rôle des co-facteurs dans l'activation de NPC-1. Les données obtenues à ce sujet ne sont que partielles. Les co-facteurs sont essentiels dans l'établissement d'un pont entre les différents facteurs de transcription et entre la machinerie de transcription.

Les découvertes sur les problèmes endocriniens reliés à la mutation du gène NPC-1 présentent une nouvelle vision sur la maladie de Niemann-Pick de type C1. Ainsi, elles permettent de spéculer sur la relation des différents symptômes avec les problèmes de l'axe hypothalamus-hypophyse. L'hypothalamus est un point très important dans la régulation de la synthèse des différentes hormones peptidiques. Il semble exister un lien entre la neuro-dégénération de la maladie et la présence des différents neurones présents dans l'hypothalamus. Donc, une étude plus détaillée de l'hypothalamus et des différents neurones donnerait l'heure juste sur son implication dans le dérèglement de l'hypophyse.

V. Conclusion

Par nos études, nous avons démontré l'expression de la protéine NPC-1 dans la stéroïdogénèse, et plus particulièrement dans le processus de lutéinisation chez le porc. L'implication de NPC-1, comme transporteur de cholestérol, semble essentiel pour l'apport du substrat pour la synthèse de la progestérone. Ainsi, l'expression du messageur de NPC-1 est beaucoup plus abondante dans les tissus stéroïdogéniques que dans les tissus somatiques. De plus, son expression suit le patron de régulation de la différenciation et du potentiel stéroïdogénique du corps jaune. Par conséquent, son expression qui est constitutive à la base, répond à la stimulation par l'AMPc.

L'étude sur les mécanismes de régulation du gène NPC-1 via l'AMPc a permis de voir un processus de transcription complexe. Ainsi, nous avons démontré l'activation du promoteur NPC-1 par le principal joueur dans la réponse à l'AMPc, soit le facteur de transcription CREB. L'activation de la voie des PKA, responsable de la phosphorylation de CREB, semble nécessaire à une activation maximale. De plus, nos recherches prouvent l'implication de SF-1, un autre facteur de transcription de réponse à l'AMPc, dans la régulation de NPC-1 dans les cellules stéroïdogéniques par une possible interaction avec CREB. L'activation engendrée par ces facteurs de transcription ne peut avoir lieu sans la présence de co-facteurs comme CBP. Ainsi, comme les résultats d'immunoprécipitation de la chromatine le démontrent, le co-facteur CBP est davantage lié au complexe de transcription après stimulation à l'AMPc. Le rôle de CBP est, entre autres, de faciliter la liaison du complexe de la machinerie transcriptionnelle par l'acétylation des histones (H-3 dans ce cas) qui favorise un relâchement de la structure de la chromatine. Nous avons aussi associé la phosphorylation de l'histone H-3 au promoteur proximal de NPC-1 en réponse à

l'AMPc. Toutes ces modifications, sont essentielles à l'activation maximale de l'expression NPC-1.

Contre toute attente, les résultats sur le rôle de NPC-1 dans la stérilité des souris NPC -/- ne sont pas ceux attendus. Toutefois, la complexité de l'implication de cette mutation chez les souris a permis de démontrer une complication au niveau de l'axe hypothalamus-hypophyse. Ainsi, une défaillance dans la synthèse de prolactine en association à un manque de production d'œstradiol, et probablement aussi dû à la non-présence du pic de LH, crée une infertilité totale des souris femelles. La balance du ratio entre la forme longue et la forme courte du récepteur de dopamine D2 semble importante dans la régulation à la baisse de la synthèse de prolactine par les cellules lactotrophes de l'hypophyse.

En résumé, la protéine NPC-1 semble être un élément essentiel au maintien de la capacité de production de la progestérone des cellules stéroïdogéniques. Elle s'avère une protéine charnière de la distribution du cholestérol provenant de la voie des LDL vers d'autres organelles cellulaires.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. & Krieger, M.** (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518-20.
- Aesoy, R., Mellgren, G., Morohashi, K. & Lund, J.** (2002). Activation of cAMP-dependent protein kinase increases the protein level of steroidogenic factor-1. *Endocrinology* 143, 295-303.
- Akaboshi, S., Yano, T., Miyawaki, S., Ohno, K. & Takeshita, K.** (1997). A C57BL/KsJ mouse model of Niemann-Pick disease (spm) belongs to the same complementation group as the major childhood type of Niemann-Pick disease type C. *Hum Genet* 99, 350-3.
- Allen, W. M. & Wintersteiner, O.** (1934). Crystalline progesterin. *Sciences* 80, 190-191.
- Azhar, S., Nomoto, A., Leers-Sucheta, S. & Reaven, E.** (1998). Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model. *J Lipid Res* 39, 1616-28.
- Baik, J. H., Picetti, R., Saiardi, A., Thiriet, G., Dierich, A., Depaulis, A., Le Meur, M. & Borrelli, E.** (1995). Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377, 424-8.
- Barnes, F. L.** (2000). The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology* 53, 649-58.
- Batra, S.** (1986). Effect of estrogen and progesterone treatment on calcium uptake by the myometrium and smooth muscle of the lower urinary tract. *Eur J Pharmacol* 127, 37-42.

Baulieu, E. E. (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52, 1-32.

Ben-Jonathan, N. (1985). Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev* 6, 564-89.

Ben-Jonathan, N. & Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22, 724-63.

Bennett, M. K. & Osborne, T. F. (2000). Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6340-4.

Besley, G. T., Hoogeboom, A. J., Hoogeveen, A., Kleijer, W. J. & Galjaard, H. (1980). Somatic cell hybridisation studies showing different gene mutations in Niemann-Pick variants. *Hum Genet* 54, 409-12.

Binkley, S. A. (1995). *Endocrinology* , 261-280.

Boerboom, D., Pilon, N., Behdjani, R., Silversides, D. W. & Sirois, J. (2000). Expression and regulation of transcripts encoding two members of the NR5A nuclear receptor subfamily of orphan nuclear receptors, steroidogenic factor-1 and NR5A2, in equine ovarian cells during the ovulatory process. *Endocrinology* 141, 4647-56.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19, 225-68.

Britt, K. L., Drummond, A. E., Dyson, M., Wreford, N. G., Jones, M. E., Simpson, E. R. & Findlay, J. K. (2001). The ovarian phenotype of

the aromatase knockout (ArKO) mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79, 181-5.

Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.

Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11041-8.

Brown, R. C. & Papadopoulos, V. (2001). Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in adrenal and brain steroidogenesis. *Int Rev Neurobiol* 46, 117-143.

Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. & Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-51.

Butenandt, A., Westphal, U. & Coblentz, H. (1934). Über einen abbau des stigma-sterins zu corpus-luteum-worksaamen stoffen; ein beitrage zur konstitution des corpus-luteum-hormons (vorlauf mitteil). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 67, 1611-1616.

Campbell, B. K., Baird, D. T. & Webb, R. (1998). Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cultured in a serum-free system. *J Reprod Fertil* 112, 69-77.

Carlone, D. L. & Richards, J. S. (1997). Evidence that functional interactions of CREB and SF-1 mediate hormone regulated expression of the aromatase gene in granulosa cells and constitutive expression in R2C cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61, 223-31.

Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M. A., Pavan, W. J., Krizman, D. B., Nagle, J., Polymeropoulos, M. H., Sturley, S. L., Ioannou, Y. A., Higgins, M. E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneski, C. R.,

Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Neufeld, E. B., Chang, T. Y., Liscum, L., Tagle, D. A. & et al. (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277, 228-31.

Carstea, E. D., Polymeropoulos, M. H., Parker, C. C., Detera-Wadleigh, S. D., O'Neill, R. R., Patterson, M. C., Goldin, E., Xiao, H., Straub, R. E., Vanier, M. T. & et al. (1993). Linkage of Niemann-Pick disease type C to human chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2002-4.

Chaffin, C. L., Dissen, G. A. & Stouffer, R. L. (2000). Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys. *Mol Hum Reprod* 6, 11-8.

Cherradi, N., Defaye, G. & Chambaz, E. M. (1994). Characterization of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with bovine adrenocortical mitochondria. *Endocrinology* 134, 1358-64.

Cherradi, N., Rossier, M. F., Vallotton, M. B., Timberg, R., Friedberg, I., Orly, J., Wang, X. J., Stocco, D. M. & Capponi, A. M. (1997). Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450_{scc} and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 272, 7899-907.

Cheung, P., Allis, C. D. & Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-71.

Christenson, L. K., Osborne, T. F., McAllister, J. M. & Strauss, J. F., 3rd. (2001a). Conditional response of the human steroidogenic acute regulatory protein gene promoter to sterol regulatory element binding protein-1a. *Endocrinology* 142, 28-36.

- Christenson, L. K., Stouffer, R. L. & Strauss, J. F., 3rd.** (2001b). Quantitative analysis of the hormone-induced hyperacetylation of histone H3 associated with the steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. *J Biol Chem* 276, 27392-9.
- Christenson, L. K. & Strauss, J. F., 3rd.** (2000). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1529, 175-87.
- Christenson, L. K. & Strauss, J. F., 3rd.** (2001). Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res* 32, 576-86.
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R. & Goodman, R. H.** (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-9.
- Clemens, J. W., Lala, D. S., Parker, K. L. & Richards, J. S.** (1994). Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134, 1499-508.
- Concannon, P., Hansel, W. & McEntee, K.** (1977). Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod* 17, 604-13.
- Cook, B., Kaltenbach, C. C., Norton, H. W. & Nalbandov, A. V.** (1967). Synthesis of progesterone in vitro by porcine corpora lutea. *Endocrinology* 81, 573-584.
- Cook, B. & Nalbandov, A. V.** (1968). The effect of some pituitary hormones on progesterone synthesis in vitro by the luteinized ovary of the common opossum. *J. Reprod. Fertil.* 15, 267-275.
- Cooke, B. A.** (1999). Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 151, 25-35.

Crivello, J. F. & Jefcoate, C. R. (1978). Mechanisms of corticotropin action in rat adrenal cells. I. The effects of inhibitors of protein synthesis and of microfilament formation on corticosterone synthesis. *Biochim Biophys Acta* 542, 315-29.

Cruz, J. C., Sugii, S., Yu, C. & Chang, T. Y. (2000). Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem* 275, 4013-21.

Cummings, A. M. & Yochim, J. M. (1984). Differentiation of the uterus in preparation for gestation: a model for the action of progesterone. *J Theor Biol* 106, 353-74.

Davie, J. R. & Spencer, V. A. (1999). Control of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl*, 141-8.

Davies, J. P., Chen, F. W. & Ioannou, Y. A. (2000). Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* 290, 2295-8.

Davies, J. P. & Ioannou, Y. A. (2000). Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem* 275, 24367-74.

Degenhart, H. J., Visser, H. K., Boon, H. & O'Doherty, N. J. (1972). Evidence for deficient 20-cholesterol-hydroxylase activity in adrenal tissue of a patient with lipoid adrenal hyperplasia. *Acta Endocrinol* 71, 512-518.

DeGrella, R. F. & Simoni, R. D. (1982). Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. *J Biol Chem* 257, 14256-62.

DeManno, D. A., Cottom, J. E., Kline, M. P., Peters, C. A., Maizels, E. T. & Hunzicker-Dunn, M. (1999). Follicle-stimulating hormone

promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Mol Endocrinol* 13, 91-105.

Demeter-Arlotto, M., Rainey, W. E. & Simpson, E. R. (1993).

Maintenance and regulation of 17 alpha-hydroxylase expression by bovine thecal cells in primary culture. *Endocrinology* 132, 1353-8.

Devoto, L., Kohen, P., Vega, M., Castro, O., Gonzalez, R. R.,

Retamales, I., Carvalho, P., Christenson, L. K. & Strauss, J. F. (2002).

Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 186, 137-41.

Devoto, L., Vega, M., Kohen, P., Castro, A., Castro, O., Christenson,

L. K., Carvalho, P. & Strauss, J. F., 3rd. (2000). Endocrine and

paracrine-autocrine regulation of the human corpus luteum during the mid-luteal phase. *J Reprod Fertil Suppl* 55, 13-20.

Dooley, K. A., Bennett, M. K. & Osborne, T. F. (1999). A critical role for cAMP response element-binding protein (CREB) as a Co-activator in sterol-regulated transcription of 3-hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A synthase promoter. *J Biol Chem* 274, 5285-91.

Elsholtz, H. P., Lew, A. M., Albert, P. R. & Sundmark, V. C. (1991).

Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine.

Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *J Biol Chem* 266, 22919-25.

Epstein, L. F. & Orme-Johnson, N. R. (1991). Regulation of steroid hormone biosynthesis. Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells. *J Biol Chem* 266, 19739-45.

Ericsson, J. & Edwards, P. A. (1998). CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element- binding protein-regulated transcription. *J Biol Chem* 273, 17865-70.

- Farkash, Y., Timberg, R. & Orly, J.** (1986). Preparation of antiserum to rat cytochrome P-450 cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology* 118, 1353-65.
- Feuilloley, M. & Vaudry, H.** (1996). Role of the cytoskeleton in adrenocortical cells. *Endocr Rev* 17, 269-88.
- Fimia, G. M., De Cesare, D. & Sassone-Corsi, P.** (1999). CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* 398, 165-9.
- Fitzpatrick, S. L., Carlone, D. L., Robker, R. L. & Richards, J. S.** (1997). Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 62, 197-206.
- Fitzpatrick, S. L. & Richards, J. S.** (1993). cis-acting elements of the rat aromatase promoter required for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induction in ovarian granulosa cells and constitutive expression in R2C Leydig cells. *Mol Endocrinol* 7, 341-54.
- Foulkes, N. S. & Sassone-Corsi, P.** (1996). Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1288, F101-21.
- Fraenkel, L.** (1903). Die function des corpus luteum. *Arch. Gynaekol.* 68, 438-545.
- Fraenkel, L. & Cohn, D. F.** (1901). Experimentelle untersuchungen uber den einfluss des corpus luteum auf de insertion des eies. *Anat. Anz.* 20, 294-300.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A. & Nagy, G.** (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80, 1523-631.

Gafvels, M., Bjurulf, E. & Selstam, G. (1992). Prolactin stimulates the expression of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in the rat corpus luteum and rescues early pregnancy from bromocriptine-induced abortion. *Biol Reprod* 47, 534-40.

Gallegos, A. M., Atshaves, B. P., Storey, S. M., Starodub, O., Petrescu, A. D., Huang, H., McIntosh, A. L., Martin, G. G., Chao, H., Kier, A. B. & Schroeder, F. (2001). Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. *Prog Lipid Res* 40, 498-563.

Giguere, V., Tremblay, A. & Tremblay, G. B. (1998). Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* 63, 335-9.

Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russell, D. W. & Schneider, W. J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1, 1-39.

Golos, T. G., Soto, E. A., Tureck, R. W. & Strauss, J. F., 3rd. (1985). Human chorionic gonadotropin and 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate stimulate [¹²⁵I]low density lipoprotein uptake and metabolism by luteinized human granulosa cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 61, 633-8.

Gonzalez, G. A. & Montminy, M. R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675-80.

Gonzalez-Robayna, I. J., Alliston, T. N., Buse, P., Firestone, G. L. & Richards, J. S. (1999). Functional and subcellular changes in the A-kinase-signaling pathway: relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Mol Endocrinol* 13, 1318-37.

- Grummer, R. R. & Carroll, D. J.** (1988). A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J Anim Sci* 66, 3160-73.
- Grunstein, M.** (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-52.
- Guiramand, J., Montmayeur, J. P., Ceraline, J., Bhatia, M. & Borrelli, E.** (1995). Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 270, 7354-8.
- Guivarc'h, D., Vincent, J. D. & Vernier, P.** (1998). Alternative splicing of the D2 dopamine receptor messenger ribonucleic acid is modulated by activated sex steroid receptors in the MMQ prolactin cell line. *Endocrinology* 139, 4213-21.
- Gwynne, J. T. & Strauss, J. F., 3rd.** (1982). The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* 3, 299-329.
- Halder, S. K., Fink, M., Waterman, M. R. & Rozman, D.** (2002). A cAMP-responsive element binding site is essential for sterol regulation of the human lanosterol 14 α -demethylase gene (CYP51). *Mol Endocrinol* 16, 1853-63.
- Hall, J. M., Couse, J. F. & Korach, K. S.** (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276, 36869-72.
- Hall, P. F.** (1984). Cellular organization for steroidogenesis. *Int Rev Cytol* 86, 53-95.
- Hall, P. F.** (1985). Role of cytochromes P-450 in the biosynthesis of steroid hormones. *Vitam Horm* 42, 315-68.
- Hall, P. F.** (1995). The roles of microfilaments and intermediate filaments in the regulation of steroid synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55, 601-5.

- Halvorson, L. M., Kaiser, U. B. & Chin, W. W.** (1996). Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1. *J Biol Chem* 271, 6645-50.
- Hansen, J. C., Tse, C. & Wolffe, A. P.** (1998). Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 37, 17637-41.
- Hanukoglu, I.** (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 43, 779-804.
- Hartmann, M. & Wettstein, A.** (1934). Zur kenntis der corpus luteum hormone. *Helv. Chem. Acta* 17.
- Hasegawa, T., Zhao, L., Caron, K. M., Majdic, G., Suzuki, T., Shizawa, S., Sasano, H. & Parker, K. L.** (2000). Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol Endocrinol* 14, 1462-71.
- Heikinheimo, M., Ermolaeva, M., Bielinska, M., Rahman, N. A., Narita, N., Huhtaniemi, I. T., Tapanainen, J. S. & Wilson, D. B.** (1997). Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology* 138, 3505-14.
- Hentges, S. T. & Low, M. J.** (2002). Ovarian dependence for pituitary tumorigenesis in D2 dopamine receptor- deficient mice. *Endocrinology* 143, 4536-43.
- Hillier, S. G.** (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 179, 39-46.
- Hoeffler, J. P., Meyer, T. E., Yun, Y., Jameson, J. L. & Habener, J. F.** (1988). Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242, 1430-3.

- Hwang, J. & Menon, K. M.** (1983). Characterization of low density and high density lipoprotein receptors in the rat corpus luteum and regulation by gonadotropin. *J Biol Chem* 258, 8020-7.
- Iaccarino, C., Samad, T. A., Mathis, C., Kercret, H., Picetti, R. & Borrelli, E.** (2002). Control of lactotrop proliferation by dopamine: essential role of signaling through D2 receptors and ERKs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14530-5.
- Ikeda, Y., Lala, D. S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M. P. & Parker, K. L.** (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* 7, 852-60.
- Ioannou, Y. A.** (2001). Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 657-68.
- Ito, M., Park, Y., Weck, J., Mayo, K. E. & Jameson, J. L.** (2000). Synergistic activation of the inhibin alpha-promoter by steroidogenic factor-1 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Mol Endocrinol* 14, 66-81.
- Jacob, A. L., Lund, J., Martinez, P. & Hedin, L.** (2001). Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5. *J Biol Chem* 276, 37659-64.
- Jefcoate, C. R.** (1992). Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450scc in steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 43, 751-767.
- Johnson, W. J., Phillips, M. C. & Rothblat, G. H.** (1997). Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. *Subcell Biochem* 28, 235-76.
- Juengel, J. L., Larrick, T. L., Meberg, B. M. & Niswender, G. D.** (1998). Luteal expression of steroidogenic factor-1 mRNA during the estrous cycle and in response to luteotropic and luteolytic stimuli in ewes. *Endocrine* 9, 227-32.

- Kaltenbach, C. C., Graber, J. W., Niswender, G. D. & Nalbandov, A. V.** (1968). Effect of hypophysectomy on the formation and maintenance of corpora lutea in the ewe. *Endocrinology* 82, 4753-4759.
- Kamiya, S., Yamagami, T., Umeda, M., Sugiyama, M. & Daigo, M.** (1991). Lectin histochemistry of foamy cells in non-nervous tissues of feline sphingomyelinosis. *J Comp Pathol* 105, 241-5.
- Kaplan, M. R. & Simoni, R. D.** (1985). Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Cell Biol* 101, 446-53.
- Kieborz, K. R., Silvia, W. J. & Edgerton, L. A.** (1991). Changes in uterine secretion of prostaglandin F2 alpha and luteal secretion of progesterone in response to oxytocin during the porcine estrous cycle. *Biol Reprod* 45, 950-4.
- Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G. & Gruenberg, J.** (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1, 113-8.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G.** (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-7.
- Kotzka, J., Muller-Wieland, D., Roth, G., Kremer, L., Munck, M., Schurmann, S., Knebel, B. & Krone, W.** (2000). Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *J Lipid Res* 41, 99-108.
- Krieger, M.** (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 68, 523-58.

- Krisans, S. K.** (1996). Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* 804, 142-64.
- Krueger, R. J. & Orme-Johnson, N. R.** (1983). Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein. *J Biol Chem* 258, 10159-67.
- Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R. & Goodman, R. H.** (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-6.
- Lalli, E. & Sassone-Corsi, P.** (1994). Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 269, 17359-62.
- LaVoie, H. A., Benoit, A. M., Garmey, J. C., Dailey, R. A., Wright, D. J. & Veldhuis, J. D.** (1997). Coordinate developmental expression of genes regulating sterol economy and cholesterol side-chain cleavage in the porcine ovary. *Biol Reprod* 57, 402-7.
- Li, X., Peegel, H. & Menon, K. M.** (1998). In situ hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type 1) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for mRNA expression and induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis. *Endocrinology* 139, 3043-9.
- Lin, D., Gitelman, S. E., Saenger, P. & Miller, W. L.** (1991). Normal genes for the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450scc, in congenital lipid adrenal hyperplasia. *J Clin Invest* 88, 1955-62.
- Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J. F., 3rd, Clark, B. J., Stocco, D. M., Saenger, P., Rogol, A. & Miller, W. L.** (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267, 1828-31.

- Liscum, L. & Dahl, N. K.** (1992). Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 33, 1239-54.
- Liscum, L. & Faust, J. R.** (1994). Compartmentation of cholesterol within the cell. *Curr Opin Lipidol* 5, 221-6.
- Loftus, S. K., Erickson, R. P., Walkley, S. U., Bryant, M. A., Incao, A., Heidenreich, R. A. & Pavan, W. J.** (2002). Rescue of neurodegeneration in Niemann-Pick C mice by a prion-promoter-driven *Npc1* cDNA transgene. *Hum Mol Genet* 11, 3107-14.
- Loftus, S. K., Morris, J. A., Carstea, E. D., Gu, J. Z., Cummings, C., Brown, A., Ellison, J., Ohno, K., Rosenfeld, M. A., Tagle, D. A., Pentchev, P. G. & Pavan, W. J.** (1997). Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277, 232-5.
- Lopez, D. & McLean, M. P.** (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinology* 140, 5669-81.
- Lucy, M. C., Savio, J. D., Badinga, L., De La Sota, R. L. & Thatcher, W. W.** (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 70, 3615-26.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J.** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-60.
- Luger, K. & Richmond, T. J.** (1998). The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 8, 140-6.
- Luo, X., Ikeda, Y. & Parker, K. L.** (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-90.
- Lynch, J. P., Lala, D. S., Peluso, J. J., Luo, W., Parker, K. L. & White, B. A.** (1993). Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor,

regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol Endocrinol* 7, 776-86.

Magnus. (1901). Ovariets betydning for svangerskabet med saerligt hensyn til corpus luteum. *Nor. Mag. Laegevidensk.* 62, 1138-1145.

Maizels, E. T., Mukherjee, A., Sithanandam, G., Peters, C. A., Cottom, J., Mayo, K. E. & Hunzicker-Dunn, M. (2001).

Developmental regulation of mitogen-activated protein kinase-activated kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in vivo during corpus luteum formation in the rat. *Mol Endocrinol* 15, 716-33.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-9.

Mann, R. K. & Beachy, P. A. (2000). Cholesterol modification of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1529, 188-202.

Manna, P. R., Dyson, M. T., Eubank, D. W., Clark, B. J., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Zeleznik, A. J. & Stocco, D. M. (2002). Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. *Mol Endocrinol* 16, 184-99.

Martin, V., Carrillo, G., Torroja, C. & Guerrero, I. (2001). The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking. *Curr Biol* 11, 601-7.

Maslar, I. A., Powers-Craddock, P. & Ansbacher, R. (1986). Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium: effects of continuous and intermittent progesterone treatment. *Biol. Reprod.* 37, 741-750.

Mayr, B. & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.

Mayr, B. M., Canettieri, G. & Montminy, M. R. (2001). Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10936-41.

McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 3-12.

Meidan, R., Girsh, E., Blum, O. & Aberdam, E. (1990). In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. *Biol Reprod* 43, 913-21.

Meyer, T. E. & Habener, J. F. (1993). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr Rev* 14, 269-90.

Michael, M. D., Michael, L. F. & Simpson, E. R. (1997). A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Mol Cell Endocrinol* 134, 147-56.

Miller, W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 9, 295-318.

Miller, W. L. (1997). Congenital lipoid adrenal hyperplasia: the human gene knockout for the steroidogenic acute regulatory protein. *J Mol Endocrinol* 19, 227-40.

- Miller, W. L.** (1998). Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12, 67-81.
- Mizzen, C., Kuo, M. H., Smith, E., Brownell, J., Zhou, J., Ohba, R., Wei, Y., Monaco, L., Sassone-Corsi, P. & Allis, C. D.** (1998). Signaling to chromatin through histone modifications: how clear is the signal? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 469-81.
- Molkentin, J. D.** (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275, 38949-52.
- Monte, D., DeWitte, F. & Hum, D. W.** (1998). Regulation of the human P450scc gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300. *J Biol Chem* 273, 4585-91.
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. & Goodman, R. H.** (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6682-6.
- Morris, J. A., Zhang, D., Coleman, K. G., Nagle, J., Pentchev, P. G. & Carstea, E. D.** (1999). The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann- Pick C1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 493-8.
- Moutsatsou, P. & Sekeris, C. E.** (1997). Estrogen and progesterone receptors in the endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 816, 99-115.
- Murphy, B. D.** (2000). Models of luteinization. *Biol Reprod* 63, 2-11.
- Murphy, B. D. & Silavin, S. L.** (1989). Lutetrophic agents and steroid substrate utilization. *Oxf Rev Reprod Biol* 11, 179-223.
- Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux, R., Jadot, M. & Lobel, P.** (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290, 2298-301.

Neufeld, E. B., Cooney, A. M., Pitha, J., Dawidowicz, E. A., Dwyer, N. K., Pentchev, P. G. & Blanchette-Mackie, E. J. (1996). Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem* 271, 21604-13.

Neufeld, E. B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A. M., Dwyer, N. K., Roff, C. F., Ohno, K., Morris, J. A., Carstea, E. D., Incardona, J. P., Strauss, J. F., 3rd, Vanier, M. T., Patterson, M. C., Brady, R. O., Pentchev, P. G. & Blanchette-Mackie, E. J. (1999). The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem* 274, 9627-35.

Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K. & McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80, 1-29.

Nohturfft, A., DeBose-Boyd, R. A., Scheek, S., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1999). Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11235-40.

Ohashi, M., Carr, B. R. & Simpson, E. R. (1982). Lipoprotein-binding sites in human corpus luteum membrane fractions. *Endocrinology* 110, 1477-82.

Ohleth, K. M. & Bagnell, C. A. (1999). Relaxin secretion and gene expression in porcine granulosa and theca cells are stimulated during in vitro luteinization. *Biol Reprod* 60, 499-507.

Olefsky, J. M. (2001). Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276, 36863-4.

Ong, W. Y., Kumar, U., Switzer, R. C., Sidhu, A., Suresh, G., Hu, C. Y. & Patel, S. C. (2001). Neurodegeneration in Niemann-Pick type C disease mice. *Exp Brain Res* 141, 218-31.

- Ory, D. S.** (2000). Niemann-Pick type C: a disorder of cellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1529, 331-9.
- Osborne, T. F.** (2000). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 275, 32379-82.
- Padykula, H. A., Coles, L. G., Okulicz, W. C., Rapaport, S. I., McCracken, J. A., King, N. W., Jr., Longcope, C. & Kaiserman-Abramof, I. R.** (1989). The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment. *Biol Reprod* 40, 681-90.
- Pall, M., Hellberg, P., Brannstrom, M., Mikuni, M., Peterson, C. M., Sundfeldt, K., Norden, B., Hedin, L. & Enerback, S.** (1997). The transcription factor C/EBP-beta and its role in ovarian function; evidence for direct involvement in the ovulatory process. *Embo J* 16, 5273-9.
- Papadopoulous, V.** (1998). Structure and function of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenic cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 130-142.
- Parker, K. L. & Schimmer, B. P.** (1995). Transcriptional regulation of the genes encoding the cytochrome P-450 steroid hydroxylases. *Vitam Horm* 51, 339-70.
- Parkington, H. C.** (1983). Electrical properties of the costo-uterine muscle of the guinea-pig. *J Physiol* 335, 15-27.
- Pate, J. L. & Condon, W. A.** (1982). Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol* 28, 551-62.
- Patel, S. C., Suresh, S., Kumar, U., Hu, C. Y., Cooney, A., Blanchette-Mackie, E. J., Neufeld, E. B., Patel, R. C., Brady, R. O., Patel, Y. C., Pentchev, P. G. & Ong, W. Y.** (1999). Localization of Niemann-Pick C1

- protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1657-62.
- Pederson, R. C.** (1988). Cholesterol biosynthesis, storage, and mobilization in steroidogenic organs. *Biology of Cholesterol*, 39-69.
- Pentchev, P. G., Brady, R. O., Blanchette-Mackie, E. J., Vanier, M. T., Carstea, E. D., Parker, C. C., Goldin, E. & Roff, C. F.** (1994). The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1225, 235-43.
- Pescador, N., Houde, A., Stocco, D. M. & Murphy, B. D.** (1997). Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in luteinized porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 57, 660-8.
- Pescador, N., Stocco, D. M. & Murphy, B. D.** (1999). Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biol Reprod* 60, 1453-61.
- Petrescu, A. D., Gallegos, A. M., Okamura, Y., Strauss, J. F., 3rd & Schroeder, F.** (2001). Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics. *J Biol Chem* 276, 36970-82.
- Picetti, R., Saiardi, A., Abdel Samad, T., Bozzi, Y., Baik, J. H. & Borrelli, E.** (1997). Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. *Crit Rev Neurobiol* 11, 121-42.
- Pon, L. A., Epstein, L. F. & Orme-Johnson, N. R.** (1986a). Acute cAMP stimulation in Leydig cells: rapid accumulation of a protein similar to that detected in adrenal cortex and corpus luteum. *Endocr Res* 12, 429-46.

- Pon, L. A., Hartigan, J. A. & Orme-Johnson, N. R. (1986b).** Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein. *J Biol Chem* 261, 13309-16.
- Prenant, A. (1898).** La valeur morphologique du corps jaune. Son action physiologique et therapeutique possible. *Rev. Gen. Sci. Pure Appl.* 9, 646-650.
- Quinn, P. G. (1993).** Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription. *J Biol Chem* 268, 16999-7009.
- Rajapaksha, W. R., McBride, M., Robertson, L. & O'Shaughnessy, P. J. (1997).** Sequence of the bovine HDL-receptor (SR-BI) cDNA and changes in receptor mRNA expression during granulosa cell luteinization in vivo and in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 134, 59-67.
- Reaven, E., Tsai, L., Spicher, M., Shilo, L., Philip, M., Cooper, A. D. & Azhar, S. (1994).** Enhanced expression of granulosa cell low density lipoprotein receptor activity in response to in vitro culture conditions. *J Cell Physiol* 161, 449-62.
- Reinhart, A. J., Williams, S. C., Clark, B. J. & Stocco, D. M. (1999).** SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP beta (CCAAT/enhancer binding protein-beta) cooperate to regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter. *Mol Endocrinol* 13, 729-41.
- Retamales, I., Carrasco, I., Troncoso, J. L., Las Heras, J., Devoto, L. & Vega, M. (1994).** Morpho-functional study of human luteal cell subpopulations. *Hum Reprod* 9, 591-6.
- Richards, J. S. (2001).** New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 15, 209-18.

- Richards, J. S., Hedin, L. & Caston, L. (1986).** Differentiation of rat ovarian thecal cells: evidence for functional luteinization. *Endocrinology* 118, 1660-8.
- Roberts, A. J. & Skinner, M. K. (1990).** Hormonal regulation of thecal cell function during antral follicle development in bovine ovaries. *Endocrinology* 127, 2907-17.
- Robker, R. L. & Richards, J. S. (1998).** Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod* 59, 476-82.
- Roff, C. F., Strauss, J. F., 3rd, Goldin, E., Jaffe, H., Patterson, M. C., Agritellis, G. C., Hibbs, A. M., Garfield, M., Brady, R. O. & Pentchev, P. G. (1993).** The murine Niemann-Pick type C lesion affects testosterone production. *Endocrinology* 133, 2913-23.
- Saiardi, A., Bozzi, Y., Baik, J. H. & Borrelli, E. (1997).** Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* 19, 115-26.
- Sakai, J. & Rawson, R. B. (2001).** The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport. *Curr Opin Lipidol* 12, 261-6.
- Salvador, L. M., Maizels, E., Hales, D. B., Miyamoto, E., Yamamoto, H. & Hunzicker-Dunn, M. (2002).** Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology* 143, 2986-94.
- Salvador, L. M., Park, Y., Cottom, J., Maizels, E. T., Jones, J. C., Schillace, R. V., Carr, D. W., Cheung, P., Allis, C. D., Jameson, J. L. & Hunzicker-Dunn, M. (2001).** Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 276, 40146-55.

Sanders, S. L. & Stouffer, R. L. (1997). Localization of steroidogenic enzymes in macaque luteal tissue during the menstrual cycle and simulated early pregnancy: immunohistochemical evidence supporting the two-cell model for estrogen production in the primate corpus luteum. *Biol Reprod* 56, 1077-87.

Scallen, T. J., Pastuszyn, A., Noland, B. J., Chanderbhan, R., Kharroubi, A. & Vahouny, G. V. (1985). Sterol carrier and lipid transfer proteins. *Chem Phys Lipids* 38, 239-61.

Sekar, N., Garmey, J. C. & Veldhuis, J. D. (2000). Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (stAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{scc}) enzyme. *Mol Cell Endocrinol* 159, 25-35.

Shea-Eaton, W. K., Trinidad, M. J., Lopez, D., Nackley, A. & McLean, M. P. (2001). Sterol regulatory element binding protein-1a regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 142, 1525-33.

Shimizu, K., Hayano, M., Gut, M. & Dorfman, R. I. (1961). The transformation of 20-hydroxycholesterol to isocaproic acid and C21 steroids. *J Biol Chem* 236, 695-699.

Silverman, E., Eimerl, S. & Orly, J. (1999). CCAAT enhancer-binding protein beta and GATA-4 binding regions within the promoter of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene are required for transcription in rat ovarian cells. *J Biol Chem* 274, 17987-96.

Simpson, E. R. & Waterman, M. R. (1983). Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. *Can J Biochem Cell Biol* 61, 692-707.

- Sirois, J. & Richards, J. S.** (1993). Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis- acting C/EBP beta promoter element. *J Biol Chem* 268, 21931-8.
- Slotta, K. H., Rushig, H. & Fels, E.** (1934). Reindarstellung der hormone aus dem corpus luteum. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 67.
- Somers, J. P., Benyo, D. F., Little-Ihrig, L. & Zeleznik, A. J.** (1995). Luteinization in primates is accompanied by loss of a 43-kilodalton adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein isoform. *Endocrinology* 136, 4762-8.
- Soto, E., Silavin, S. L., Tureck, R. W. & Strauss, J. F., 3rd.** (1984). Stimulation of progesterone synthesis in luteinized human granulosa cells by human chorionic gonadotropin and 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate: the effect of low density lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab* 58, 831-7.
- Soumano, K. & Price, C. A.** (1997). Ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome P450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod* 56, 516-22.
- Steinden, S. T. & Shapiro, S. S.** (1983). Progesterone-altered secretory proteins from cultured human endometrium. *Endocrinology* 112, 862-870.
- Sterneck, E., Tessarollo, L. & Johnson, P. F.** (1997). An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 11, 2153-62.
- Stevens, V. L., Xu, T. & Lambeth, J. D.** (1993). Cholesterol trafficking in steroidogenic cells. Reversible cycloheximide-dependent accumulation of cholesterol in a pre- steroidogenic pool. *Eur J Biochem* 216, 557-63.

Stocco, D. M. (2000). Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta* 1486, 184-97.

Stocco, D. M. (2001a). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63, 193-213.

Stocco, D. M. (2001b). Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol* 15, 1245-54.

Stocco, D. M. & Chaudhary, L. R. (1990). Evidence for the functional coupling of cyclic AMP in MA-10 mouse Leydig tumour cells. *Cell Signal* 2, 161-70.

Stocco, D. M. & Chen, W. (1991). Presence of identical mitochondrial proteins in unstimulated constitutive steroid-producing R2C rat Leydig tumor and stimulated nonconstitutive steroid-producing MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* 128, 1918-26.

Stocco, D. M. & Clark, B. J. (1996a). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17, 221-44.

Stocco, D. M. & Clark, B. J. (1996b). Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 51, 197-205.

Stocco, D. M. & Sodeman, T. C. (1991). The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem* 266, 19731-8.

Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-5.

Strauss, J. F., Liu, P., Christenson, L. K. & Watari, H. (2002). Sterols and intracellular vesicular trafficking: lessons from the study of NPC1. *Steroids* 67, 947-51.

Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 12, 599-606.

Strutt, H., Thomas, C., Nakano, Y., Stark, D., Neave, B., Taylor, A. M. & Ingham, P. W. (2001). Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol* 11, 608-13.

Sugawara, T., Holt, J. A., Kiriakidou, M. & Strauss, J. F., 3rd. (1996). Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 35, 9052-9.

Thomson, M. (1998). Molecular and cellular mechanisms used in the acute phase of stimulated steroidogenesis. *Horm Metab Res* 30, 16-28

Tremblay, J. J., Hamel, F. & Viger, R. S. (2002). Protein Kinase A-dependant cooperation between GATA and CCAAT/Enhancer-binding protein transcription factors regulates Steroidogenic Acute Regulatory Protein promoter activity. *Endocrinology* 143, 3935-45.

Tremblay, J. J. & Viger, R. S. (2001). GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142, 977-86.

Tsai, S. J., Wiltbank, M. C. & Bodensteiner, K. J. (1996). Distinct mechanisms regulate induction of messenger ribonucleic acid for prostaglandin (PG) G/H synthase-2, PGE (EP3) receptor, and PGF2 alpha receptor in bovine preovulatory follicles. *Endocrinology* 137, 3348-55.

Tuckey, R. C. (1992). Cholesterol side-chain cleavage by mitochondria from the human placenta. Studies using hydroxycholesterols as substrates. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42, 883-90.

Tuckey, R. C. & Atkinson, H. C. (1989). Pregnenolone synthesis from cholesterol and hydroxycholesterols by mitochondria from ovaries following the stimulation of immature rats with pregnant mare's

serum gonadotropin and human choriogonadotropin. *Eur J Biochem* 186, 255-9.

Urbani, L. & Simoni, R. D. (1990). Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Biol Chem* 265, 1919-23.

Vanier, M. T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Duthel, S., Harzer, K., Pentchev, P. G., Revol, A. & Louisot, P. (1991). Type C Niemann-Pick disease: biochemical aspects and phenotypic heterogeneity. *Dev Neurosci* 13, 307-14.

Vanier, M. T. & Suzuki, K. (1998). Recent advances in elucidating Niemann-Pick C disease. *Brain Pathol* 8, 163-74.

Veldhuis, J. D., Nestler, J. E., Strauss, J. F., 3rd & Gwynne, J. T. (1986). Insulin regulates low density lipoprotein metabolism by swine granulosa cells. *Endocrinology* 118, 2242-53.

Wang, X., He, C., Moore, S. C. & Ausio, J. (2001). Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber. *J Biol Chem* 276, 12764-8.

Wang, X., Moore, S. C., Laszckzak, M. & Ausio, J. (2000). Acetylation increases the alpha-helical content of the histone tails of the nucleosome. *J Biol Chem* 275, 35013-20.

Watanabe, N., Inoue, H. & Fujii-Kuriyama, Y. (1994). Regulatory mechanisms of cAMP-dependent and cell-specific expression of human steroidogenic cytochrome P450_{scc} (CYP11A1) gene. *Eur J Biochem* 222, 825-34.

Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Glick, J. M., Patel, S., Neufeld, E. B., Brady, R. O., Pentchev, P. G. & Strauss, J. F., 3rd. (1999a). Niemann-Pick C1 protein: obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 805-10.

Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Watari, M., Burd, C. G., Patel, S., Pentchev, P. G. & Strauss, J. F., 3rd. (2000).

Determinants of NPC1 expression and action: key promoter regions, posttranscriptional control, and the importance of a "cysteine-rich" loop. *Exp Cell Res* 259, 247-56.

Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Watari, M., Neufeld, E. B., Patel, S., Pentchev, P. G. & Strauss, J. F., 3rd. (1999b).

Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein. *J Biol Chem* 274, 21861-6.

Waterman, M. R. (1995). A rising StAR: an essential role in cholesterol transport. *Science* 267, 1780-1.

Waterman, M. R. & Keeney, D. S. (1996). Signal transduction pathways combining peptide hormones and steroidogenesis. *Vitam Horm* 52, 129-48.

Wehrenberg, U., Wulff, C., Husen, B., Morohashi, K. & Rune, G. M. (1997). The expression of sf-1/Ad4BP is related to the process of luteinization in the marmoset (*Callithrix jacchus*) ovary. *Histochem Cell Biol* 107, 345-50.

Wooton-Kee, C. R. & Clark, B. J. (2000). Steroidogenic factor-1 influences protein-deoxyribonucleic acid interactions within the cyclic adenosine 3,5-monophosphate-responsive regions of the murine steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 141, 1345-55.

Wu, C. (1997). Chromatin remodeling and the control of gene expression. *J Biol Chem* 272, 28171-4.

Yamada, S., Fujiwara, H., Kataoka, N., Honda, T., Nakayama, T., Higuchi, T., Mori, T. & Maeda, M. (1998). Stage-specific uptake of

apolipoprotein-B in ovarian follicles and corpora lutea of the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 13, 944-52.

Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Menzel, P., Rivier, J. & Montminy, M. R. (1990). Characterization of a bipartite activator domain in transcription factor CREB. *Cell* 60, 611-7.

Yu, R. N., Ito, M. & Jameson, J. L. (1998). The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor- 1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter- transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol Endocrinol* 12, 1010-22.

Zhang, M., Dwyer, N. K., Love, D. C., Cooney, A., Comly, M., Neufeld, E., Pentchev, P. G., Blanchette-Mackie, E. J. & Hanover, J. A. (2001a). Cessation of rapid late endosomal tubulovesicular trafficking in Niemann-Pick type C1 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4466-71.

Zhang, M., Dwyer, N. K., Neufeld, E. B., Love, D. C., Cooney, A., Comly, M., Patel, S., Watari, H., Strauss, J. F., 3rd, Pentchev, P. G., Hanover, J. A. & Blanchette-Mackie, E. J. (2001b). Sterol-modulated glycolipid sorting occurs in niemann-pick C1 late endosomes. *J Biol Chem* 276, 3417-25.

Zhang, M., Liu, P., Dwyer, N. K., Christenson, L. K., Fujimoto, T., Martinez, F., Comly, M., Hanover, J. A., Blanchette-Mackie, E. J. & Strauss, J. F., 3rd. (2002). MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *J Biol Chem* 277, 33300-10.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹


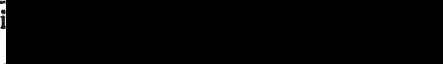
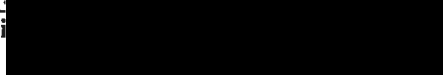
IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Nicolas Gévry		Code permanent GEVN23077607
Sigle du programme PhD	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Flavia L. Lopes, Sandra Ledoux and Bruce D. Murphy	
Titre Mutation of the Niemann-Pick C-1 gene disrupts pituitary and ovarian function.	
Revue soumis	Date de publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Flavia L. Lopes	Signature 	Date 20-03-03
Coauteur Sandra Ledoux	Signature 	Date 20-03-03
Coauteur Bruce D. Murphy	Signature 	Date 20-03-03
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Nicolas Gévry		Code permanent GEVN23077607
Sigle du programme PhD	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Gevry NY, Murphy BD.	
Titre The role and regulation of the Niemann-Pick C1 gene in adrenal steroidogenesis.	
Revue Endocrine Research	Date de publication 2002 Nov

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Bruce D. Murphy	[Signature]	Date 3/18/2003
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹


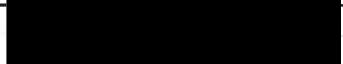


IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Nicolas Gévry		Code permanent GEVN23077607
Sigle du programme PhD	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Gevry N, Lacroix D, Song JH, Pescador N, Dobias M, Murphy BD	
Titre Porcine Niemann Pick-C1 protein is expressed in steroidogenic tissues and modulated by cAMP.	
Revue Endocrinology	Date de publication 01/02/2002

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).		
Coauteur Dan Lacroix	Signature	Date
Coauteur Jian-Hua Song	Signature 	Date 2-14-03
Coauteur Nazario Pescador	Signature 	Date 12-03-03
Coauteur Mira Dobias	Signature 	Date
Coauteur Bruce D. Murphy	Signature 	Date 5/18/2003
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

ACCORD ET PERMISSION DES CO AUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Nicolas Gévry		Code permanent GEVN23077607
Sigle du programme PhD	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Gevry N. Lacroix D, Song JH, Pescador N, Dobias M, Murphy BD	
Titre Porcine Niemann Pick-C1 protein is expressed in steroidogenic tissues and modulated by cAMP.	
Revue Endocrinology	Date de publication 01/02/2002

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Dan Lacroix	Signature	Date 13-05-03
Coauteur Jian-Hua Song	Signature	Date
Coauteur Nazario Pescador	Signature	Date 12-05-03
Coauteur Mira Dobias	Signature	Date 12-05-03
Coauteur Bruce D. Murphy	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

Date: Tue, 11 Mar 2003 10:40:48 -0500

De: "Frazier, Evelyn" <[REDACTED]>

À: Nicolas Gévry [REDACTED]

Sujet: RE: permission for an article in a thesis

Dear Dr. Gevry,

Thank you for your permission request to use material from your work in your thesis. Permission is granted, provided complete credit is given to the original source and copyright owner, The Endocrine Society. Credit line must contain: initials and last name(s) of author (s); title of article; name of the journal; volume#; issue #; inclusive pages; year of publication; copyright owner, The Endocrine Society.

Best regards,

Evelyn M. Frazier
Journals Coordinator
email [REDACTED]
phone: 301-941-0239
fax: 301-951-2617

Effective March 21, 2003
THE ENDOCRINE SOCIETY OFFICES WILL BE LOCATED AT
8401 Connecticut Avenue
Suite 900
Chevy Chase, MD 20815-5817
The telephone and fax numbers will remain the same.

-----Original Message-----

From: Nicolas Gévry [REDACTED]
Sent: Tuesday, March 11, 2003 10:28 AM
To: Frazier, Evelyn
Subject: permission for an article in a thesis

<< File: PERMéditeurmolendo.doc >> Hi,

I need a permission from the editor to reproduce my article "Regulation of Niemann-Pick C1 Gene Expression by the 3'5' Cyclic Adenosine Monophosphate Pathway in Steroidogenic Cells; Gevry NY, Lalli E, Sassone-Corsi P, Murphy BD." in my doctoral thesis. I put the sheet form in attachment.

Thank you
Sincerely
Nicolas

Nicolas Gévry
Université de Montréal
CRRR, Faculté Médecine Vétérinaire
3200, Sicotte
St-Hyacinthe, Québec, Canada
J2S 7C6
Tel.: (450) 773-8521 #8312
Fax.: (450) 778-8103

Date: Tue, 11 Mar 2003 14:31:28 -0500

De: "Frazier, Evelyn" [REDACTED]

À: Nicolas Gévry [REDACTED]

Sujet: RE: an other permission

Dear Dr. Gevry,

Sorry I was I was looking for the second article under Molecular Endocrinology. Permission is granted, provided complete credit is given to the original source and copyright owner, The Endocrine Society. Credit line must contain: initials and last name(s) of author (s); title of article; name of the journal; volume#; issue #; inclusive pages; year of publication; copyright owner, The Endocrine Society.

Best regards,

Evelyn M. Frazier
Journals Coordinator
email: [REDACTED]
phone: 301-941-0239
fax: 301-951-2617

Effective March 21, 2003
THE ENDOCRINE SOCIETY OFFICES WILL BE LOCATED AT
8401 Connecticut Avenue
Suite 900
Chevy Chase, MD 20815-5817
The telephone and fax numbers will remain the same.

-----Original Message-----

From: Nicolas Gévry [REDACTED]
Sent: Tuesday, March 11, 2003 2:26 PM
To: Frazier, Evelyn
Subject: RE: an other permission

thank

This article is already published; Endocrinology. 2002 Feb;143(2):708-16.

nicolas

> Dear Dr. Gevry,
> Thank you for your permission request to use the following material in your
> thesis.
>
> : Porcine Niemann Pick-C1 protein is expressed in steroidogenic tissues
> and modulated by cAMP; Gevry N, Lacroix D, Song JH, Pescador N, Dobias M,
> Murphy B.D.
>
> Has this article been released for publication? If not the material would be
> embargoed until
> the article was released for publication. Once it was released, permission
> would be granted.
>
> Evelyn M. Frazier
> Journals Coordinator
> email: [REDACTED]
> phone: 301-941-0239
> fax: 301-951-2617
>