

Université de Sherbrooke

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION
DE NOUVEAUX CO-RÉGULATEURS DES RÉCEPTEURS DES
HORMONES THYROÏDIENNES**

par

Marie-Belle Poirier

Programme de Physiologie

Service d'endocrinologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de

Philosophae doctor (Ph.D) en Physiologie (endocrinologie)

Sherbrooke, Québec

Juillet 2007



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-37992-9
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-37992-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	II
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IX
RÉSUMÉ.....	XIII

PARTIE I, INTRODUCTION

1 LES HORMONES THYROÏDIENNES	2
1.1 Le rôle des hormones thyroïdiennes.....	2
1.2 Le métabolisme des hormones thyroïdiennes.....	3
1.3 L'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien.....	6
1.3.1 La thyrolibérine.....	6
1.3.2 La thyroestimuline	9
2 LES RÉCEPTEURS DES HORMONES THYROÏDIENNES	11
2.1 La superfamille des récepteurs nucléaires	11
2.2 Les domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires	16
2.2.1 Le domaine A/B.....	16
2.2.2 Le domaine de liaison à l'ADN	17
2.2.3 La région charnière	22
2.2.4 Le domaine de liaison du ligand	22
2.3 Les isoformes des récepteurs des hormones thyroïdiennes	25

2.3.1 L'expression tissulaire des TRs	26
2.3.2 Les effets spécifiques des différentes isoformes des TRs	28
3 LES MÉCANISMES D'ACTION DES HORMONES THYROÏDIENNES	30
3.1 Les mécanismes d'action non-génomiques des HTs	30
3.1.1 Les voies de signalisation et les canaux ioniques	30
3.1.2 La mitochondrie	31
3.2 Les mécanismes d'action génomiques des HTs	32
3.2.1 Les éléments de réponse des récepteurs des hormones thyroïdiennes	32
3.2.2 Les éléments de réponse positifs des hormones thyroïdiennes	33
3.3.3 Les éléments de réponse négatifs des hormones thyroïdiennes	35
3.3.4 La dimérisation des TRs	38
3.4 Le rôle des histones	39
3.4.1 Les modifications post-traductionnelles des histones	41
3.5 Mécanismes de régulation génétique positive	43
3.5.1 Les co-activateurs classiques	45
3.5.2 Les co-activateurs généraux ou intégrateurs	48
3.5.3 Les complexes multi-protéiques médiateurs et l'arrimage de la machinerie transcriptionnelle.....	49
3.5.4 Complexes ATP-dépendants.....	49
3.5.5 Les co-répresseurs.....	50
3.6 Mécanismes de régulation négative.....	53
3.7 Autres facteurs impliqués	54

4 LA PROTÉINE GRP1.....	55
4.1 La structure et le profil d'expression de GRP1	55
4.2 Les effets et partenaires de GRP1.....	58
5 LA PROTÉINE RANBPM.....	59
5.1 La structure et le profil d'expression de RanBPM	61
5.2 Les partenaires d'interaction de RanBPM.....	62
5.2.1 Les récepteurs transmembranaires et leurs protéines d'échafaudage	63
5.2.2 Les facteurs de transcription et les co-régulateurs	66
5.2.3 Les autres protéines et enzymes partenaires	69

PARTIE II, OBJECTIFS DE RECHERCHE

6 OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	73
6.1 Résumés des travaux et problématiques.....	73
ARTICLE #1:	
GENERAL RECEPTOR FOR PHOSPHOINOSITIDES 1, A NOVEL REPRESSOR OF THYROID HORMONE RECEPTOR ACTION THAT PREVENTS DEOXYRIBONUCLEIC ACID BINDING.....	76
ARTICLE #2:	
IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RANBPM, A NOVEL COACTIVATOR OF THYROID HORMONE RECEPTORS.....	77
ARTICLE #3 :	
THE IMPLICATION OF RANBPM IN THE REGULATION OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY AXIS BY THYROID HORMONE	78

PARTIE III, LES RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

10 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES (1).....	80
10.1 Les <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>	80
10.1.1 GRP1 et RanBPM sont des partenaires des PPARs.....	83
11 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES (2).....	89
11.1 RanBPM interagit avec des co-régulateurs des récepteurs nucléaires.....	89
11.2 L'effet de RanBPM en combinaison avec des co-activateurs connus	91
11.2.1 Introduction.....	91
11.2.2 Matériels & Méthodes.....	91
11.2.3 Résultats	92

PARTIE IV, DISCUSSION

12 DISCUSSION.....	96
12.1 Caractérisation de l'interaction entre les nouveaux co-régulateurs identifiés et les TRs.....	96
12.1.1 L'importance du DBD dans l'interaction entre les nouveaux co-régulateurs et les NRs	97
12.1.2 L'effet des agonistes sur l'interaction entre les nouveaux co-régulateurs et les NRs	98
12.2 GRP1, un nouveau co-répresseur des TRs	100
12.2.1 GRP1, un compétiteur pour la liaison des TRs aux TREs	100
12.2.2 Conclusion et perspectives sur GRP1	101
12.3 RanBPM, un nouveau co-activateur des TRs.....	102
12.4 Les hypothèse sur le mécanisme d'action de RanBPM.....	103
12.4.1 RanBPM, co-activateur classique des NRs.....	103
12.4.2 Effet protecteur de RanBPM sur la dégradation des NRs.....	106

12.4.3 RanBPM et le transport nucléocytoplasmique des NRs 107

PARTIE V, CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

13 CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 110

14 REMERCIEMENTS 111

15 RÉFÉRENCES 112

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Dendogramme 1 : Les récepteurs nucléaires et leurs rôles.....	13
Schéma 1 : Les hypothèses concernant les mécanismes d'action de RanBPM comme co-activateur des TRs.....	104
Tableau 1 : Les sous-groupes des récepteurs nucléaires.....	15
Tableau 2 : Les récepteurs transmembranaires et leurs protéines d'échafaudage partenaires de RanBPM.....	64
Tableau 3 : Les facteurs de transcription et co-régulateurs partenaires de RanBPM.....	67
Tableau 4 : Les enzymes et autres protéines partenaires de RanBPM.....	70
Figure 1 : La glande thyroïde et les hormones thyroïdiennes.....	5
Figure 2 : L'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien.....	8
Figure 3 : Les domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires.....	18
Figure 4 : Le domaine de liaison à l'ADN des NRs.....	20
Figure 5 : Les changements de conformation du domaine de liaison du ligand des TRs.....	24
Figure 6 : Les isoformes des récepteurs des hormones thyroïdiennes.....	27
Figure 7 : Les différents éléments de réponse des TRs et exemples de gènes les contenant.....	34
Figure 8 : Représentation des nTREs dans les régions promotrices humaines de la thyrolibérine et des sous-unités de la thyrostimuline.....	37
Figure 9 : La structure chromatiniennne de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones.....	40
Figure 10 : Le mécanisme d'action génomique des TRs.....	44
Figure 11 : Les co-activateurs des récepteurs nucléaires et leurs domaines d'interaction.....	47
Figure 12 : Les co-répresseurs des récepteurs nucléaires et leurs domaines d'interaction.....	52
Figure 13 : Les domaines de GRP1.....	57
Figure 14 : Les domaines de RanBPM et RanBPM55.....	60
Figure 15 : Représentation des différents isoformes des PPARs et leurs fonctions.....	82

Figure 16 : GRP1 et RanBPM sont des partenaires de toutes les isoformes des PPARs.....	84
Figure 17 : Le domaine CC de GRP1 interagit très faiblement avec l'isoforme PPAR γ 1.....	85
Figure 18 : La région carboxy-terminale de RanBPM interagit fortement avec PPAR γ 2.....	86
Figure 19 : L'interaction entre GRP1 et RanBPM et PPAR γ 1 n'est pas influencée par la Rosiglitazone.....	88
Figure 20 : RanBPM interagit avec plusieurs co-régulateurs des NRs.....	90
Figure 21 : RanBPM produit un effet synergique à SRC-1 sur l'activité transcriptionnelle de TR β 1	93
Figure 22 : RanBPM produit un effet additif à CBP sur l'activité transcriptionnelle de TR β 1	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

<u>Abréviation</u>	<u>Définition</u>
Aa:	Acide aminé
AF-1:	<i>Activating function-1</i>
AF-2:	<i>Activating function-2</i>
α -MSH:	<i>α-melanocyte stimulating hormone</i>
AR:	Récepteur des androgènes
ARC :	<i>Activator-recruited cofactor</i>
ARF:	<i>ADP-ribosylation factor</i>
ARNm:	ARN messenger
ARNO:	<i>ARF nucleotide-binding-site opener 3</i>
AVP:	Arginine vasopressine
CARM1:	<i>CoA-associated arginine methyltransferase 1</i>
CBP:	<i>CREB binding protein</i>
CC:	<i>Coil-coiled domain</i>
CDK:	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
COUP-TF:	<i>Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor</i>
CRA:	CT11-RanBPM
CRE:	<i>cAMP-responsiveness element</i>
CREB:	<i>cAMP-response element binding protein</i>
CTLH:	<i>C-Terminal to <u>LisH</u></i>
DAD :	<i>Deacetylase activation domain</i>
DBD:	Domaine de liaison à l'ADN
Dec-1E :	Dectine-1 isoforme 1E
DR:	Répétition directe
DRIP:	<i>Vitamin D receptor interacting protein</i>
EMSA:	Gel de retardement ou <i>electromobily shift assay</i>
ER:	Récepteur des oestrogènes
ERK:	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS:	Sérum foetal bovin

GDP:	Guanosine-5'-diphosphate
GTP:	Guanosine 5'-O-thiotriphosphate
GR:	Récepteur des glucocorticoïdes
GRASP:	<i>GRP1-associated scaffold protein</i>
GRP1:	<i>General receptor for phosphoinositide-1</i>
GRSP1:	<i>GRP1 signaling partner 1</i>
GST:	Glutathione-S-transférase
H:	Histone
HAT:	Histone acétyl transférase
HCG:	Choriogonadotropine humaine
HDAC:	Histone déacétylase
HGF:	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIPK2:	<i>Homeo-domain-interacting protein kinase 2</i>
HMT:	Histone méthyl transférase
HHT:	Hypothalamo-hypophysaire thyroïdien
HRE:	Élément de réponse aux hormones
HT:	Hormone thyroïdienne
KO:	<i>Knock out</i>
LBD:	Domaine de liaison du ligand
LisH:	<i>Lis1-homologous</i>
LFA:	<i>Lymphocytes function-associated antigen-1</i>
Lys:	Lysine
MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK:	<i>MAPK/ERK kinase</i>
Mirk :	<i>Minibrain-related kinase</i>
N:	Site d'interaction des NRs
NCoR:	<i>Nuclear receptor corepressor</i>
NES:	<i>Nuclear exportation signal</i>
NGF:	<i>Nerve growth factor</i>
NLS:	<i>Nuclear localization signal</i>
NR:	Récepteur nucléaire ou <i>nuclear receptor</i>
nTRE:	Élément de réponse négatif aux hormones thyroïdiennes
Pal:	Séquence palindromique

PCAF:	<i>p300/CBP-associated factor</i>
pEGFP:	<i>p-enhanced green fluorescent protein</i>
PH:	<i>Pleckstrin homology domain</i>
PLC:	Phospholipase C
PlexA:	Plexine-A
PI3K:	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC:	Protéine kinase C
POMC:	Pro-opiomélanocortine
PPAR:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PR:	Récepteur de la progestérone
PSF:	<i>PTB-associated splicing factor</i>
pTRE:	Élément de réponse positif aux hormones thyroïdiennes
PVN:	Noyau paraventriculaire
RanBP:	<i>Ran binding protein</i>
RanBPM:	<i>Ran binding protein in microtubule</i>
RAR:	Récepteur de l'acide rétinoïque
RD :	<i>Repression domain</i>
Rosi:	Rosiglitazone
RPTK:	Récepteurs à protéine tyrosine kinase
RTH:	Résistance aux hormones thyroïdiennes
RT-PCR:	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
RXR:	Récepteur de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque
SANT:	<i>SWI3/ADA2/NCoR/TFIIIB-like domain</i>
SEMa3A :	Récepteur de la sémaphorine3A
SERCA:	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
SMRT:	<i>Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors</i>
Sos:	<i>Son of sevenless</i>
SPRY:	<i>Dictyostelium discoideum kiansé <u>splA</u> and mammalian Ca²⁺-release channels <u>ryanodine receptors</u></i>
SRC:	<i>Steroid receptor coactivator</i>
SRE :	<i>Serum response element</i>
T ₂ :	Diiodothyronine

T ₃ :	3,5',3'-triiodothyronine
T ₃ inverse (rT ₃):	3,3',5'-triiodothyronine
T ₄ :	3,3',5',3'-tétraiodothyronine ou thyroxine
TAF:	<i>TBP-associated factor</i>
TBP:	<i>TATA box binding protein</i>
TFIID:	<i>Transcription factor IID</i>
TR:	Récepteur des hormones thyroïdiennes
TrkA :	<i>Tropomyosin-related kinase</i>
TRAC-1:	<i>TR/RAR associated cofactor</i>
TRAP:	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein</i>
TRE:	Élément de réponse aux hormones thyroïdiennes
TRH:	Thyrolibérine ou <i>thyrotropin-releasing hormone</i>
TRHR:	<i>Thyrotropin-releasing hormone receptor</i>
TSH:	Thyrostimuline ou <i>thyroid-stimulating hormone</i>
TZD:	Thiazolidinédione
VDR:	Récepteur de la vitamine D

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE NOUVEAUX CO-RÉGULATEURS DES RÉCEPTEURS DES HORMONES THYROÏDIENNES

par

Marie-Belle Poirier

RÉSUMÉ

Les hormones thyroïdiennes (HTs) sont impliquées dans un large éventail d'événements physiologiques dont le développement neuronal, la croissance et le métabolisme énergétique. Les effets des HTs sont exercés par l'action de leurs récepteurs, les TRs, membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (NRs). Les TRs sont des facteurs de transcription qui régulent le niveau d'expression des gènes cibles des HTs. Dépendamment du type de l'élément de réponse (TRE) localisé dans la région promotrice des gènes ils stimulent ou inhibent l'expression des gènes codant pour des protéines. L'activité transcriptionnelle des TRs est contrôlée par plusieurs co-régulateurs et les HTs.

À la suite d'un criblage double-hybride chez la levure nous avons identifié plusieurs nouveaux partenaires des TRs dont; le *general receptor for phosphoinositides-1* (GRP1) et *Ran binding protein in microtubule* (RanBPM).

GRP1 interagit avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD) des TRs qui est responsable de la liaison des TRs. L'interaction entre GRP1 et les TRs n'est pas modifiée par les HTs. De plus, nous avons démontré que GRP1 était présent dans les complexes formés par les TRs au niveau des compartiments cytoplasmique et nucléaire. Des essais transcriptionnels, en utilisant le gène rapporteur de la luciférase, ont montré que la surexpression de GRP1 inhibe l'activité transcriptionnelle des TRs de 45 à 60% tant au niveau de TREs positifs (TRETk, LYSx2 et DR+4) que de TREs négatifs (les promoteurs humains de la thyroïdolibérine (TRH) et la thyroïdostimuline-alpha (TSH α)).

Dans le but de comprendre le mécanisme d'action de GRP1, nous avons étudié son effet sur la formation des complexes homodimères (TR/TR) et hétérodimères (TR/RXR) au niveau de TREs. Ces études ont démontré que GRP1 diminue de 25-35% et 45-50% la liaison à l'ADN des complexes TR/TR et TR/RXR respectivement et ce, sans influencer la composition des dimères. De plus, une dose croissante d'oligo double-brins de TRE inhibe l'interaction entre GRP1 et les TRs (diminution de 75% par rapport au contrôle). Par la suite, nous avons démontré que GRP1 n'influence pas la formation des dimères TR/TR ou TR/RXR. GRP1 agit donc comme un compétiteur de la liaison aux TREs par les TRs *via* son interaction avec le DBD. Ce mécanisme d'action n'a jamais été identifié pour d'autres co-régulateurs des NRs.

RanBPM est également un partenaire des TRs dont l'interaction n'est pas modifiée par le ligand. RanBPM possède une plus grande affinité pour les isoformes TR β . Le DBD constitue un point d'interaction important, mais qu'il existe également d'autres points d'interaction dans

le TRs. L'interaction entre RanBPM et les TRs est présente dans des cellules non-transfectées. Des essais transcriptionnels ont démontré que RanBPM stimule jusqu'à 180% la transcription des TRs au niveau des pTREs (TRETk, DR+4) et jusqu'à 300% sur les nTREs (TRH, TSH α).

Dans le but de découvrir par quel mécanisme RanBPM agit comme co-activateur, nous avons étudié la liaison de RanBPM avec des co-activateurs classiques. Ainsi, nous avons démontré que RanBPM interagit avec les steroid receptor coactivator-1 et -2 -3 (SRC-1-3) mais pas avec le *CREB-binding protein* murin (mCBP). Les essais transcriptionnels utilisant RanBPM de paire avec ces co-activateurs, démontrent que SRC-1 produit un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle des TRs et le mCBP produit un effet additif. Ce phénomène pourrait signifier que le mode d'action de RanBPM est relié à celui des co-activateurs de première vague, comme les SRCs. Par contre, le mode d'action de mCBP, qui fait partie de la deuxième vague de co-activateurs, ne serait pas associé à celui de RanBPM.

L'implication des protéines co-régulatrices est essentielle à la régulation transcriptionnelle effectuée par les TRs, et les progrès futurs dans ce domaine dépendent de leur découverte et de la détermination de leur(s) fonction(s). GRP1 et RanBPM interagissent au niveau du DBD, un phénomène rare parmi les partenaires d'interaction des TRs. De plus, cette région présente le plus haut niveau d'homologie dans la superfamille des NRs, faisant de GRP1 et RanBPM des joueurs potentiels importants du système endocrinien.

Mots clés: *récepteurs des hormones thyroïdiennes (TRs), RanBPM, GRP1, co-activateur, co-répresseur.*

PARTIE I

INTRODUCTION

1 Les hormones thyroïdiennes

1.1 Le rôle des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes (HTs) sont impliquées dans un large éventail d'événements physiologiques dont le développement neuronal, la croissance et le métabolisme énergétique (YEN, 2001, pour revue). Les HTs agissent sur l'ensemble des cellules de l'organisme et leurs effets varient d'un tissu à l'autre. Elles sont également essentielles à la thermorégulation, un mécanisme mettant en jeu le tissu adipeux brun chez les rongeurs (SILVA, 2005, pour revue).

Les HTs jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie par la régulation de l'expression de plusieurs gènes. On compte notamment, l'expression de plusieurs pompes à ions dont la Na^+/K^+ -ATPase (GICK et ISMAIL-BEIGI, 1990) ainsi que la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) (HARTONG et al., 1994). Au niveau cardiaque, les HTs modulent l'expression de la chaîne lourde alpha et bêta de la myosine (EVERETT et al., 1983, MANSEN et al., 2001). Elles jouent également un rôle dans la production et la sécrétion de l'hormone de croissance (GLASS et al., 1987, NORMAN et al., 1989, BRENT et al., 1989). Les HTs sont impliquées dans la régulation fine de l'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien et de leur propre métabolisme en modulant l'expression des 5'-désiodinases. Il existe également un phénomène d'autorégulation de l'expression de l'isoforme TR β 1 par les HTs (SUZUKI et al., 1994).

Les troubles endocriniens les plus courants au niveau de la glande thyroïde sont l'hypothyroïdie et l'hyperthyroïdie, qui reflètent la diminution ou l'augmentation des niveaux d'HTs. Classiquement, l'hypothyroïdie entraîne un ralentissement psychomoteur, la fatigue, l'intolérance au froid, le gain de poids, la bradycardie et la dépression. Une absence d'HTs au

cours du développement foetal et de la jeune enfance entraîne des conséquences graves comme des retards de croissance et une déficience mentale (BUYUKGEBIZ, 2003, pour revue). Une étude effectuée avec l'aide du Dr Langlois a démontré, que chez la population québécoise, on retrouve jusqu'à 10.9% de femmes et 2.9% d'hommes qui souffrent d'hypothyroïdie et qui sont présentement sous traitement avec des HTs de synthèse (GAGNON et al., 2006). À l'inverse, l'hyperthyroïdie entraîne des tremblements, l'anxiété, la diarrhée, la perte de poids, la fibrillation auriculaire et l'ostéoporose. Les troubles de la thyroïde comme le goitre, l'hypo- et l'hyperthyroïdie et le cancer de la thyroïde sont parmi les problèmes endocriniens les plus courants rencontrés dans la population adulte, gériatrique et pédiatrique. Ces troubles affectent quelques 200 millions de personnes à travers le monde. Les HTs représentent un des enjeux importants dans le domaine de la santé avec l'augmentation de la population vieillissante. En effet, bien que l'on sache que l'apparition des cas d'hypothyroïdie augmentent avec l'âge, on en ignore encore les raisons précises (CANARIS et al., 2000). La connaissance du fonctionnement des HTs est, en conséquence, essentielle.

1.2 Le métabolisme des hormones thyroïdiennes

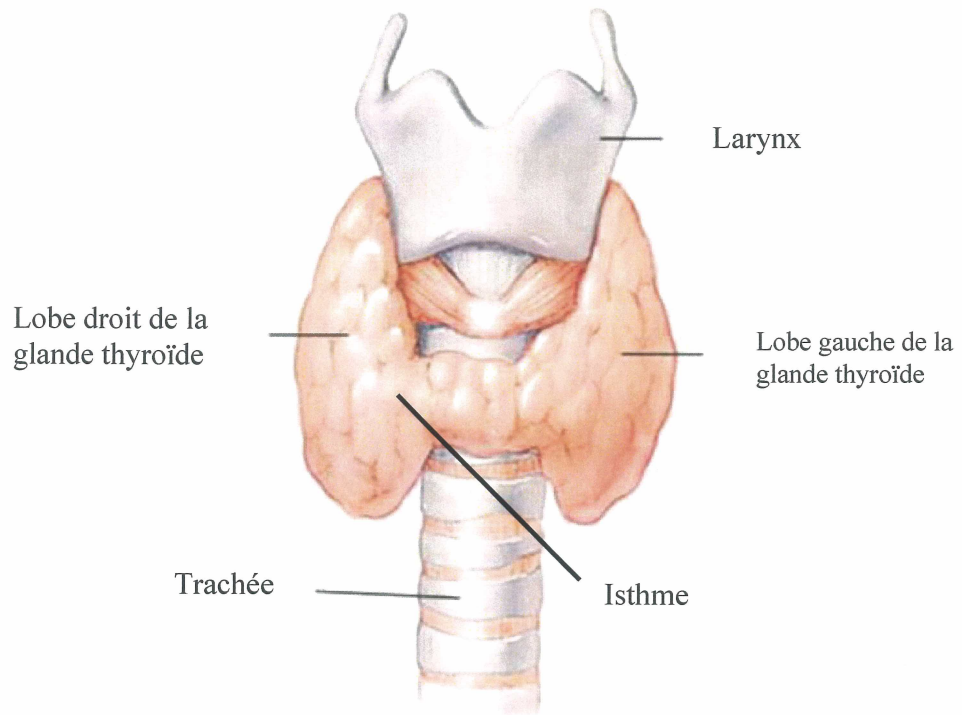
La glande thyroïde constitue l'organe endocrinien le plus volumineux (Figure 1A). Les HTs secrétées par la glande thyroïde, à partir d'iode inorganique, sont en grande majorité la thyroxine ou T_4 et en plus faible proportion la 3,5',3'-triiodothyronine ou T_3 (Figure 1B).

La T_4 agit comme une réserve de prohormone qui sera transformée en T_3 , le métabolite biologiquement actif, auquel on associe la grande majorité des effets des HTs. Cette conversion s'effectue par les 5'-déiodinases. Il existe plusieurs types de 5'-déiodinases. Elles diffèrent au niveau de leur expression tissulaire ainsi que dans leur affinité aux différents substrats iodés. Le processus de déiodination est responsable de la formation de 75% à 80% de la quantité totale de T_3 . Au niveau de l'organisme, les tissus les plus importants dans la conversion et la fourniture de

T₃ plasmatique sont le foie, le rein, les muscles (squelettiques ou cardiaques) et la thyroïde. On retrouve dans ces tissus la 5'-déiodinase de type I qui effectue la conversion de T₄ en T₃ de manière périphérique, c'est-à-dire que la réaction se déroule à l'extérieur de la cellule. La 5'-déiodinase de type II est exprimée au niveau du système nerveux central, de l'hypophyse et du gras brun (KOHRLER, 1999, pour revue). Ce type de 5'-déiodinase est responsable de la conversion intracellulaire de la T₄ en T₃. La 5'-déiodinase de type III est garante de l'inactivation des HTs par leur conversion en métabolites inactifs comme la 3,3',5'-triiodothyronine (T₃ inverse ou rT₃) et la diiodothyronine (T₂).

Étant donné leur caractère hydrophobe, les HTs sont transportées dans la circulation sanguine en association avec des transporteurs. Ainsi, près de 99% des HTs dans la circulation sont associées à des protéines de transport. Il en existe trois majoritaires, soit; la *thyroxine-binding globuline*, la *thyroxine-binding* préalbumine et l'albumine. La T₄ possède un plus haut niveau d'affinité que la T₃ pour les protéines de transport. Donc, bien qu'une faible proportion des HTs produites est sous la forme de la T₃, la fraction d'hormone libre est 10-fois plus importante que celle de la T₄ (0,04% pour la T₄ et 0,4% pour la T₃) (CHRISTENSEN, 1960).

A



B

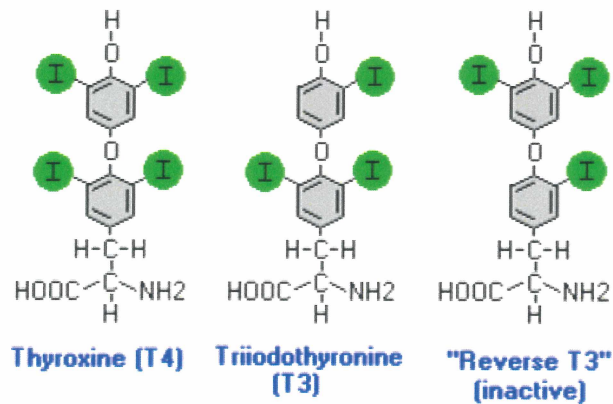


Figure 1. La glande thyroïde et les hormones thyroïdiennes. (A) La glande thyroïde est localisée dans la partie inférieure du cou. Image modifiée à partir de <http://www.yourdictionary.com/images/ahd/jpg/A4thyroi.jpg>. (B) La structure chimique de la T₄, la T₃ et la rT₃. L'image provient de <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/thyroid/chem.html>.

1.3 L'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien

La régulation fine et appropriée de la sécrétion des HTs s'effectue par un système de rétrocontrôle : l'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien (HHT) (Figure 2A). Les facteurs clés de l'axe HHT sont la thyrolibérine et la thyrostimuline. Ce système de rétrocontrôle est du même ordre que ceux impliqués dans la régulation des autres hormones du système endocrinien (androgènes, estrogène, glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, progestérone).

1.3.1 La thyrolibérine

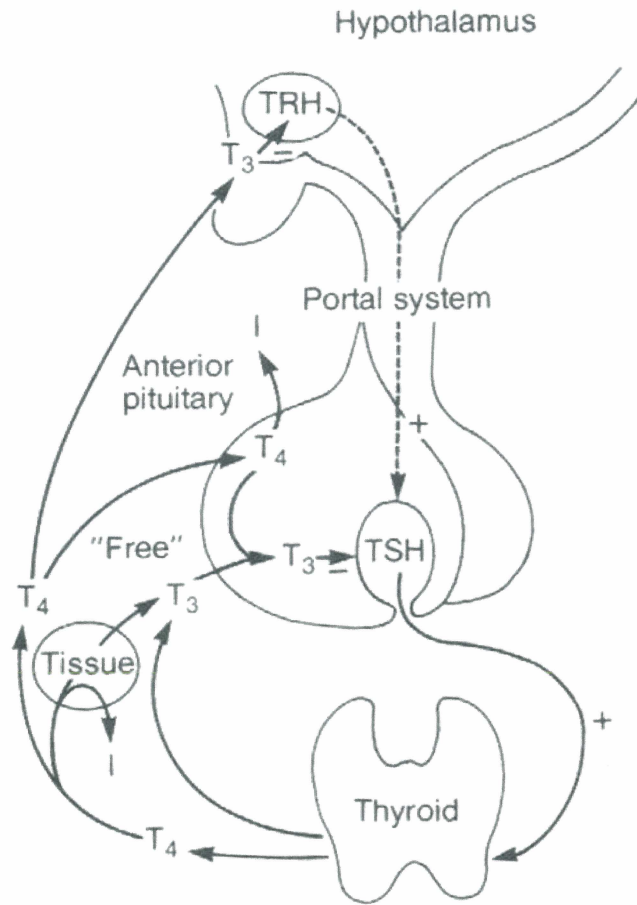
Le facteur thyrolibérine ou le *thyrotropin-releasing hormone* (TRH) est sécrété par les neurones du noyau paraventriculaire (PVN) et supraoptique de l'hypothalamus (Figure 2A) (SEGERSON et al., 1987). La thyrolibérine est un tri-peptide (Figure 2B) (BURGUS et al., 1970), et le plus puissant régulateur de la sécrétion de la thyrostimuline ou le *thyroid-stimulating hormone* (TSH) par l'hypophyse antérieure (JACKSON, 1982).

La sécrétion ainsi que la synthèse de la thyrolibérine sont stimulées par la présence d'une concentration faible en HTs dans la circulation sanguine périphérique. La thyrolibérine est ensuite acheminée à l'adénohypophyse par un système porte (JACKSON, 1982). À ce niveau, elle se lie à son récepteur transmembranaire, le *thyrotropin-releasing hormone receptor* (TRHR1) au niveau des cellules thyrotropes (DUTHIE et al., 1993). Il existe plus d'un type de TRHR, le type 1 est exprimé au niveau de l'hypophyse antérieure, de l'hypothalamus et du côté ventral de la moelle épinière. Le récepteur de la thyrolibérine active la voie de l'adénylyl cyclase (DUTHIE et al., 1993), ce qui se traduit en une stimulation de la synthèse ainsi qu'en la sécrétion de la thyrostimuline. Un gène codant pour un second type de récepteur pour la thyrolibérine (TRHR2) a été identifié chez le rat (ITADANI et al., 1998). Son expression est localisée au niveau du côté dorsal de la moelle épinière et du faisceau spinothalamique. On croit

que le TRHR2 est impliqué dans les voies de l'anti-nociception où la thyrolibérine pourrait jouer un rôle (CAO et al., 1998).

Le niveau d'HTs circulant est le plus puissant régulateur de la sécrétion de la thyrolibérine, mais celle-ci est aussi influencée par plusieurs neurotransmetteurs et neuropeptides. On compte parmi eux les voies catécholaminergique en provenance du cerveau moyen qui projettent à l'hypothalamus et stimulent la sécrétion de la thyrolibérine (VALE et al., 1975, MORLEY, 1981, pour revues).

A



B

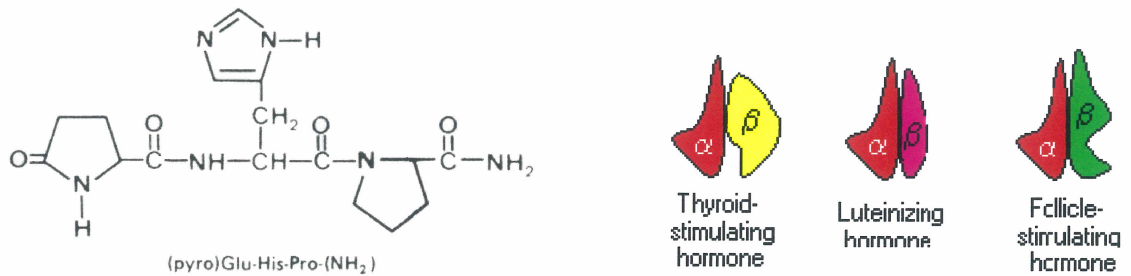


Figure 2. L'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien. (A) La synthèse et la relâche des HTs sont contrôlées par les facteurs TRH (thyrolibérine) et TSH (thyroestimuline). Ces facteurs sont eux-mêmes contrôlés par les HTs par un mécanisme de rétro-inhibition. L'image provient de (GREENSPAN et GARDNER, 2004) (B) La structure de la thyrolibérine (à gauche) et des sous-unités de la thyroestimuline (à droite). La sous-unité alpha de la thyroestimuline est commune au facteur lutéal et à l'hormone folliculostimulante. L'image provient de <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/hypopit/tsh.html>.

Outre ses rôles dans l'axe HHT, la thyrolibérine est également impliquée dans la régulation de l'apport nutritionnel chez les mammifères. Chez les rongeurs, un état de jeûne apporte une diminution de la sécrétion des HTs (BLAKE et al., 1991). Ce mécanisme d'adaptation permet de réduire le métabolisme général et ainsi d'économiser l'énergie afin de survivre à des conditions plus difficiles. Des souris *KO* pour le gène de la thyrolibérine souffrent non seulement d'hypothyroïdie, mais également d'hyperglycémie engendrée par une réponse réduite à l'insuline (YAMADA et al., 1997). Jusqu'à maintenant, la leptine et la *α-melanocyte stimulating hormone* (α -MSH) ont été identifiées comme responsables de la régulation de la thyrolibérine en fonction de l'état nutritionnel (AHIMA et al., 1996, LEGRADI et al., 1997, FEKETE et al., 2000). La leptine peut stimuler directement la sécrétion de la thyrolibérine au niveau du PVN (THORNTON et al., 1997, GUO et al., 2004). Il existe également un mécanisme indirect par lequel la leptine stimule l'expression de la α -MSH, un dérivé du gène de la pro-opiomélanocortine (POMC) au niveau du noyau arqué (KIM et al., 2000). La α -MSH, innerve ensuite les neurones du PVN et stimule la sécrétion de la thyrolibérine (MIZUNO et al., 1998, HARRIS et al., 2001).

1.3.2 La thyroestimuline

La sécrétion de la thyroestimuline suit le rythme circadien et on observe des variations dans sa sécrétion en présence de stress ou suite à une exposition au froid. Ces effets sont causés par des projections neuronales au niveau de la région médiale basale de l'hypothalamus (FUKUDA et GREER, 1975). Toutefois, il n'en demeure pas moins que la thyrolibérine et le taux d'HTs circulant sont les régulateurs majeurs de la thyroestimuline. De plus, la thyrolibérine joue un rôle essentiel au niveau des modifications post-traductionnelles de la thyroestimuline. La

glycosylation de la thyroestimuline par la thyrolibérine est primordiale afin qu'elle acquière son activité biologique (MAGNER, 1990).

La thyroestimuline est synthétisée par les cellules thyrotrophes de l'adénohypophyse (Figure 2A) (SHUPNIK et al., 1989). C'est un polypeptide constitué de deux sous-unités : alpha et bêta. Elles sont associées de manière non-covalente par des ponts di-sulfures. La sous-unité alpha de la thyroestimuline est commune au facteur lutéal, à l'hormone folliculostimulante et à la choriogonadotropine (Figure 2B). Une fois sécrétée au niveau de l'adénohypophyse, la thyroestimuline rejoint la circulation périphérique pour atteindre la glande thyroïde où elle s'associe avec son récepteur transmembranaire (NAGAYAMA et al., 1989). La liaison de la thyroestimuline à son récepteur provoque l'activation de la voie de l'adénynyl cyclase et celle des phospholipases et de la protéine kinase C (PKC) (ALLGEIER et al., 1994). Ces signaux se traduisent par la stimulation de la sécrétion des HTs ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans leur synthèse et leur transport. La thyroestimuline influence également la fonction thyroïdienne en général. Elle favorise la croissance et fait partie de l'ensemble des signaux et des facteurs impliqués dans les communications entre les cellules folliculaires, et les cellules vasculaires de la glande thyroïde.

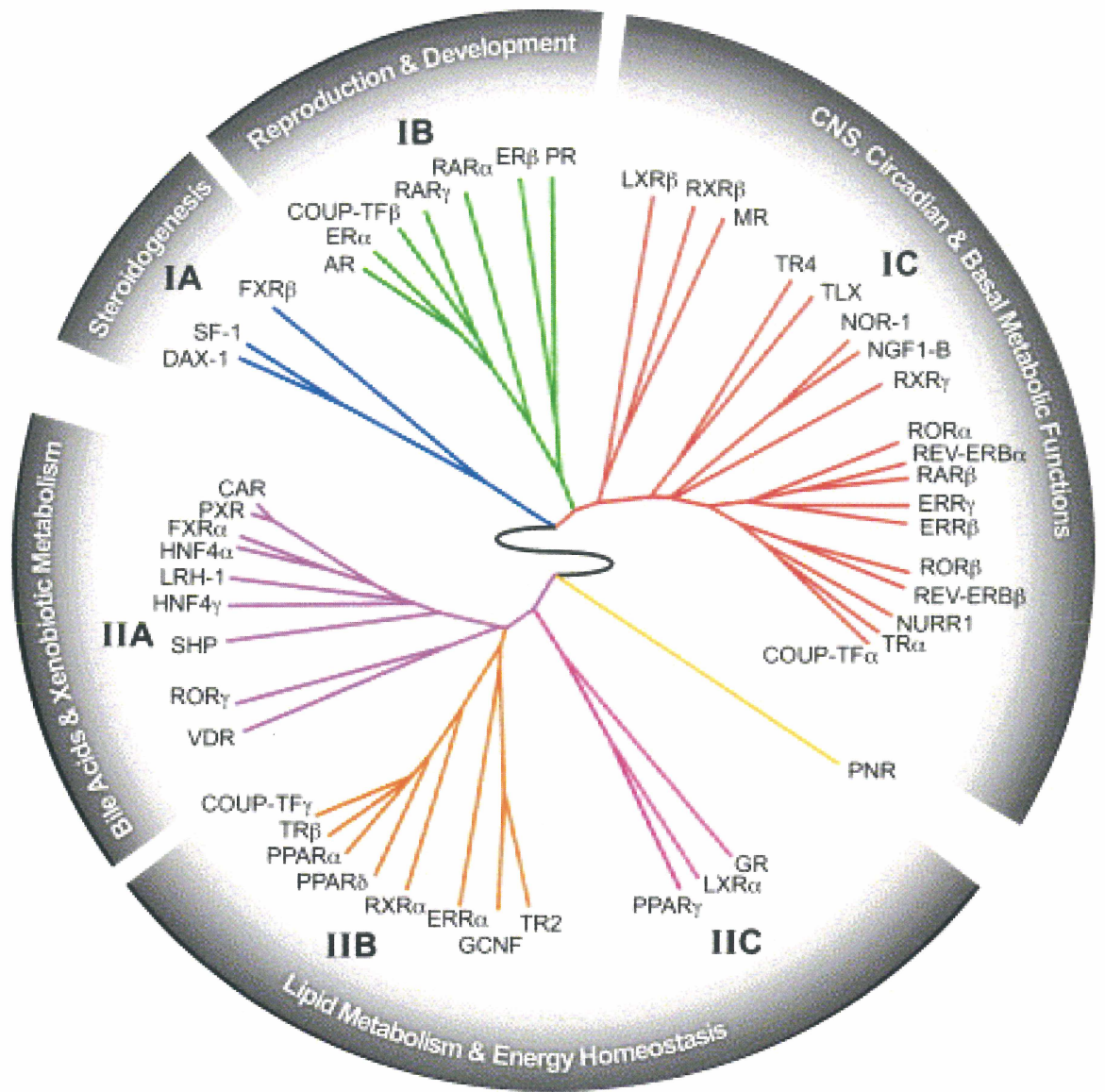
Parmi les inhibiteurs puissants de la sécrétion de la thyroestimuline on retrouve la dopamine et la somatostatine (WEEKE et al., 1975, COOPER et al., 1983, pour revue). Les antagonistes de la dopamine stimulent la sécrétion de la thyroestimuline (SCANLON et WEIGHTMAN, 1970). Il existe d'autres facteurs qui influencent la sécrétion de la thyroestimuline, tel le facteur hypophysaire de l'arginine vasopressine (AVP) qui est un stimulateur puissant.

2 Les récepteurs des hormones thyroïdiennes

2.1 La superfamille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (NRs) (Dendogramme 1) sont des facteurs de transcription dont l'activité est sensible aux ligands. Leur découverte date d'il y a près de 40 ans avec le récepteur de l'oestrogène (ERs) en 1967 (TOFT et al, 1967). Le clonage ainsi que les recherches sur les TRs ont débuté en 1986 (WEINBERGER et al., 1986). Il existe des différences importantes dans la nature des ligands possibles des NRs allant des stéroïdes aux vitamines ainsi qu'à une foule de composés lipidiques et à de petites molécules hydrophobes comme les HTs. On dénombre maintenant près de 65 gènes codant pour des NRs chez les vertébrés dont 48 chez l'homme (COMMITTEE, 1999, LAUDET et GRONEMEYER, 2001). Les recherches se poursuivent afin de déterminer l'ensemble des fonctions physiologiques auxquelles participent les NRs ainsi que pour préciser les rôles joués par les récepteurs orphelins, qui possèdent une organisation structurelle semblable aux NRs mais pour lesquels le ligand n'a pas encore été identifié (O'MALLEY, 1990, ENMARK et GUSTAFSSON, 1996). Au niveau cellulaire, les NRs jouent des rôles importants dans la croissance, la prolifération, l'apoptose, ainsi que dans le maintien de l'état cellulaire différencié (Dendogramme 1) (MANGELSDORF et al., 1995, THUMMEL, 1995). Des études ont permis d'établir une relation entre l'expression des différents NRs et leurs fonctions avec trois grands axes physiologiques soit : la reproduction, le développement et le métabolisme (BOOKOUT et al., 2006). Dans le Dendogramme 1, les fonctions des isoformes TR β sont associées à l'homéostasie énergétique et au métabolisme des lipides, reflétant leurs rôles notamment au niveau hépatique (BOOKOUT et al., 2006). Alors que

l'on regroupe les isoformes TR α parmi les NRs qui sont impliqués dans les fonctions du métabolisme basal (discuter plus en détail à la section 2.3).



Dendrogramme 1: Les récepteurs nucléaires et leurs rôles. La représentation de l'arbre phylogénique des membres de la superfamille des NRs regroupés par rapport à leurs fonctions dans l'organisme. L'image provient de (BOOKOUT et al., 2006).

Le nombre important de découvertes dans le domaine de recherche sur les NRs, a forcé la révision de l'ancienne classification en trois types : le type I contenait les récepteurs stéroïdiens, le type II, les récepteurs non-stéroïdiens et le type III, les récepteurs orphelins. La nouvelle classification rassemble les NRs toutes origines confondues par rapport à leur homologie au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN (d'au moins 80 à 90%) et du domaine de liaison du ligand (un minimum de 40 à 60%) (EVANS, 1988). Ces domaines sont les plus conservés dans l'arbre phylogénique des NRs (LAUDET et al., 1992). La superfamille des récepteurs nucléaires se divise ainsi en 6 sous-groupes. Parmi eux, les trois premiers concernent les récepteurs nucléaires les plus en lien avec mon projet de doctorat (Tableau 1).

Le sous-groupe 1 est celui qui contient le plus grand nombre de NRs. Il contient entre autres les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TRs), les *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) et le récepteur de la vitamine D (VDR). Ils possèdent tous la caractéristique de former des hétérodimères avec le récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque (RXR) au niveau de leurs éléments de réponse (voir la section 3.3.4) (MCKENNA et al., 1999). Le sous-groupe 2 contient le RXR. Le sous-groupe 3 comprend les récepteurs stéroïdiens comme le récepteur des androgènes (AR), les ERs, le récepteur des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes, et de la progestérone (PR). Les autres sous-groupes de NRs contiennent des récepteurs dont la fonction est peu connue. Le sous-groupe 0 comprend les récepteurs orphelins.

SOUS-GROUPE	RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE	CARACTÉRISTIQUE
I	PPAR, RAR, TR, VDR	Forment des hétérodimères avec le RXR
II	RXR	Partenaire d'hétérodimérisation
III	AR, ER, GR, MR, PR	Récepteurs stéroïdiens
0	Récepteurs orphelins	Protéine possédant les mêmes domaines structuraux des NRs dont on ignore le ligand

Tableau 1: Les sous-groupes des récepteurs nucléaires. Représentation des sous-groupes de certains membres de la superfamille des NRs selon la nouvelle classification. Tableau construit à partir de la classification établie dans (COMMITTEE, 1999).

2.2 Les domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires ont en commun l'organisation structurale de leurs domaines. On retrouve 4 domaines distincts : le domaine A/B, le domaine de liaison à l'ADN, la région charnière et le domaine de liaison du ligand (Figure 3).

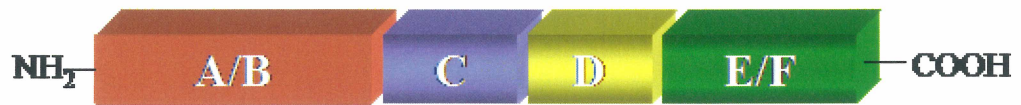
2.2.1 Le domaine A/B

Le domaine A/B, situé en amino-terminal est le moins homologue parmi les membres de la superfamille des NRs. Il est associé aux modulations fines de l'activité transcriptionnelle spécifique à certains NRs et à leurs isoformes. On y retrouve un site d'interaction avec les protéines co-régulatrices, le domaine AF-1 (*activating function-1*) (Figure 3). La présence du domaine AF-1 est essentielle afin d'obtenir l'activité transcriptionnelle maximale. Son activité est régulée de manière indépendante de la présence du ligand.

Le domaine AF-1 de certains NRs possède une activité transcriptionnelle intrinsèque lorsqu'il est fusionné à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue comme le GAL4 (METZGER et al., 1995). Le domaine AF-1 de l'isoforme TR β 1 ne possède pas d'activité transcriptionnelle intrinsèque lorsqu'il est fusionné au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (HADZIC et al.); tandis que la région AF-1 de l'isoforme TR β 2 est active transcriptionnellement lorsqu'elle est fusionnée au DBD de GAL4 (SJOBERG et VENNSTROM, 1995). Des études sur l'AF-1 de TR β 2 du rat ont déterminé que certains co-régulateurs s'associent à cette région dont SRC-1 et NCoR (TIAN et al., 2006). On croit que l'AF-1 permet aux isoformes TR β et surtout à TR β 2 de stimuler l'activité transcriptionnelle en absence d'HTs de manière plus importante comparativement aux autres isoformes (LANGLOIS et al., 1997). Par contre, plusieurs des mécanismes sous-jacents du domaine AF-1 demeurent encore inconnus.

2.2.2 Le domaine de liaison à l'ADN

La première évidence, dans un système cellulaire, que les membres de la superfamille des NRs se lient à l'ADN au niveau de séquences spécifiques en présence de leur ligand a été montrée pour le GR en 1986 (BECKER et al., 1986). Le domaine C communément appelé le domaine de liaison à l'ADN (*DNA-binding domain*: DBD) est responsable de la reconnaissance des éléments de réponse (*hormone response elements*: HREs) situés en général dans la région promotrice des gènes cibles. La liaison à l'ADN se produit par un motif à double doigts de zinc dont chacun est formé par quatre résidus de cystéine complexés à un atome de zinc (Figure 4) (FREEDMAN et al., 1988, LUISI et al., 1991). Bien que l'ensemble des NRs reconnaisse des HREs qui possèdent des séquences ainsi que des arrangements différents (palindromes, répétitions inverses ou directes), le DBD est très homologue parmi les membres de la superfamille des NRs (EVANS, 1988, MANGELSDORF et al., 1995). La liaison de l'ADN s'effectue *via* une région nommée la boîte P (Figure 4A) (SHIBUSAWA et al., 2003a). La boîte P se retrouve au niveau du premier doigt de zinc des NRs. Elle est responsable de la liaison des NRs au sillon majeur de l'ADN (Figure 4B & 4C) (UMESONO et EVANS, 1989, HIRST et al., 1992). La boîte D, au niveau du second doigt de zinc, stabilise la liaison à l'ADN en s'associant au sillon mineur (Figure 4A).



- **Domaine *activation function* (AF-1)**
- **Sites de liaison de co-régulateurs**



- **Domaine de liaison à l'ADN**
- **Dimérisation**
- **NLS et NES**
- **Sites de liaison de co-régulateurs**



- **Région charnière**
- **NLS**
- **Dimérisation**



- **Domaine de liaison du ligand**
- **Domaine *activation function* (AF-2)**
- **Dimérisation**
- **Sites majeurs d'interaction des co-régulateurs**

Figure 3: Les domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires. Les NRs sont composés de quatre domaines fonctionnels: l'amino-terminal (A/B), le domaine de liaison à l'ADN (C), la région charnière (D) et le domaine de liaison du ligand (E/F). On associe à chaque domaine des NRs plusieurs fonctions et sites d'interactions.

Le DBD et le domaine de liaison du ligand (LBD) forment la surface responsable de la formation de l'hétérodimère avec le RXR (ZECHEL et al., 1994, NISHIKAWA et al., 1995). Le DBD joue également un rôle important dans la localisation cellulaire des NRs. Il contient un signal de localisation nucléaire (NLS) (KALDERON et al., 1984) ainsi qu'un signal d'exportation nucléaire (NES) (BLACK et al., 2001). En absence du ligand, les TRs se retrouvent majoritairement au noyau (ZHU et al., 1998, BAUMANN et al., 2001, MARUVADA et al., 2003). Par contre, ceci ne sous-entend pas que les TRs sont des protéines statiques. Ils effectuent plutôt des mouvements constants entre les compartiments cytoplasmiques et nucléaires dont la résultante est une localisation nucléaire plus importante. Le NES au niveau du second doigt de zinc est responsable de ces mouvements. En présence du ligand on observe un transport actif nucléaire des TRs et la quasi-totalité des TRs se localisent au noyau en 30 minutes (ZHU et al., 1998, MARUVADA et al., 2003). La dynamique du transport nucléaire des TRs est aussi dépendante du type cellulaire étudié. Dans la lignée cellulaire HeLa provenant d'un carcinome humain du col utérin, l'addition de la T_3 cause peu de changement dans la localisation nucléaire d'une protéine de fusion de TR β -*green fluorescent protein* (GFP) (BAUMANN et al., 2001). Dans cette lignée cellulaire, la T_3 crée plutôt un réarrangement du patron de fluorescence au noyau en la faisant passer de diffuse à ponctuelle. Par opposition, dans les cellules CV-1 on observe un transport net des chimères TR-GFP vers le noyau, et ce en moins de 30 minutes suite à l'addition du ligand (ZHU et al., 1998).

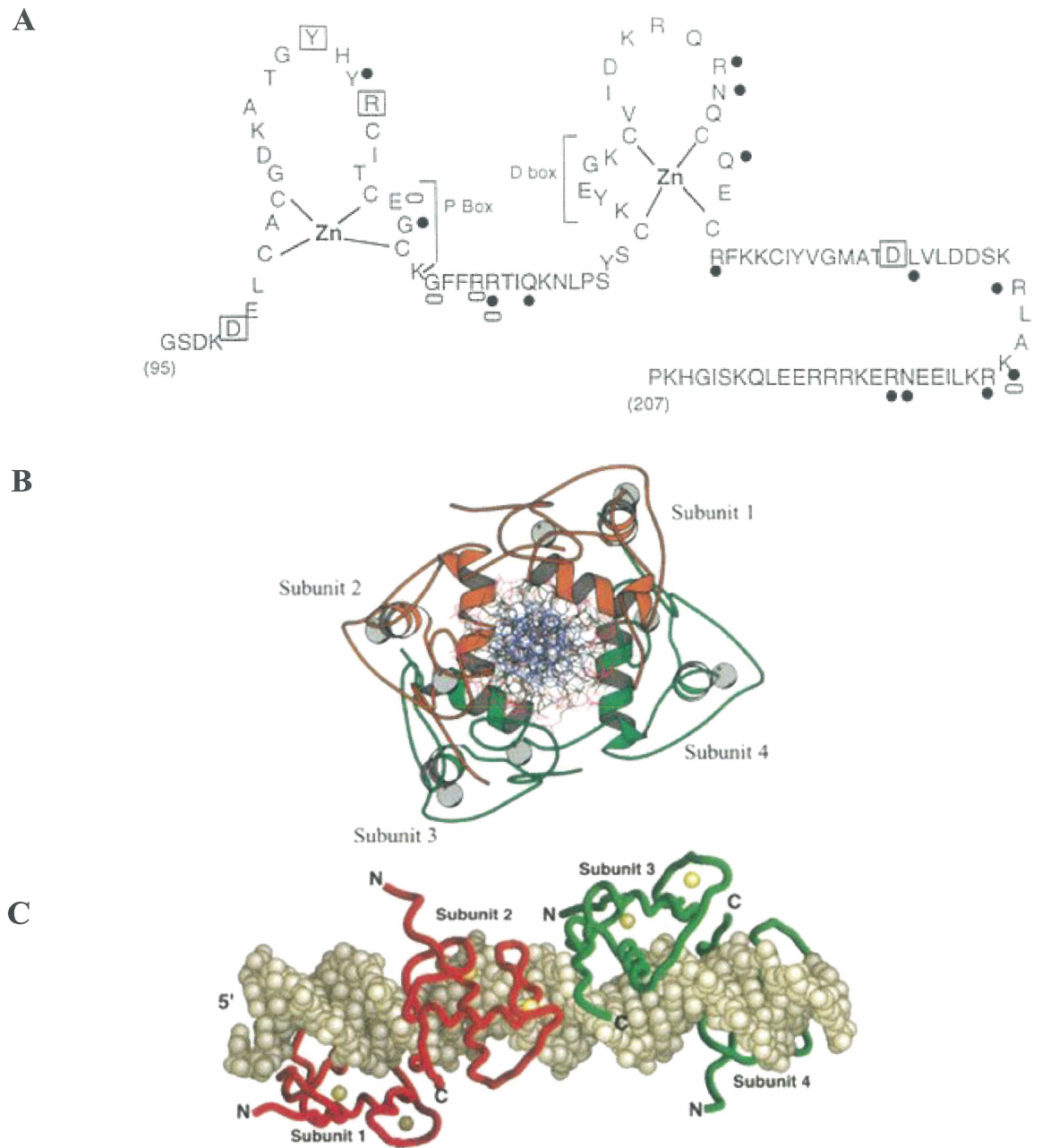


Figure 4. Le domaine de liaison à l'ADN des NRs. (A) Le domaine de liaison à l'ADN des TRs contient une boîte P qui est responsable de la reconnaissance des TREs et la boîte D stabilise la liaison à l'ADN. L'image est modifiée à partir de (YEN, 2001). **(B)** Vue de haut de la structure des DBDs de RXRs (vert et rouge) sous forme d'homodimère lié à l'ADN au niveau d'un DR+1. **(C)** Vue de côté de l'arrangement des DBDs des RXRs (vert et rouge) sous forme

d'homodimères lié à l'ADN au niveau d'un DR+1. En B & C, les ions de zinc sont représentés par des sphères grises. L'image est tirée de (ZHAO et al., 2000).

À ce jour, aucune mutation ponctuelle au niveau du DBD des TRs a été identifiée chez l'homme. Des TRs mutants au niveau de leur boîte P ont été générés : ils sont incapables de reconnaître les TREs mais ils ont conservé leur habilité à s'associer avec les co-régulateurs (SHIBUSAWA et al., 2003b). À l'aide de ces mutants, il fut démontré que la liaison des TRs à l'ADN *via* leur boîte P était essentielle à la régulation négative et positive (BODENNER et al., 1991, NAAR et al., 1991, HOLLENBERG et al., 1995a, SASAKI et al., 1999, SHIBUSAWA et al., 2003b). De plus, les souris transgéniques homozygotes exprimant une mutation de la boîte P des isoformes TR β ont des niveaux d'HTs élevés et sont incapables d'inhiber la sécrétion de la thyroïdostimuline en présence d'HTs (SHIBUSAWA et al., 2003a).

On associe maintenant un rôle au DBD dans l'interaction de plusieurs co-régulateurs. On compte parmi eux PCAF, qui est principalement recruté par le LBD mais qui possède également des sites de liaison au DBD. La liaison de PCAF aux DBD des NRs est essentielle afin qu'ils produisent leur activité maximale (BLANCO et al., 1998). Parmi les autres protéines partenaires du DBD récemment identifiées on compte SNUF, une protéine qui agit comme un co-activateur du AR (MOILANEN et al., 1998, POUKKA et al., 2000a). SNUF est une petite protéine nucléaire, qui facilite le transport du AR au noyau et stimule ainsi son activité transcriptionnelle (POUKKA et al., 2000b). De plus, plusieurs autres co-régulateurs du AR possèdent une séquence homologue à SNUF et sont des partenaires potentiels du DBD comme; ANPK, ARIP3 et ARIP4 (JANNE et al., 2000, pour revue). Parmi d'autres exemples on retrouve, GT198, qui agit comme co-activateur de plusieurs NRs dont les TRs (KO et al., 2002) et PSF, qui apporte un effet d'inhibition sur l'activité transcriptionnelle des TRs et du RXR en recrutant une histone déacétylase (HDAC) (MATHUR et al., 2001). Une autre protéine, la *HIV Type 1 Tat binding protein-1* est un co-activateur, partenaire d'interaction du DBD dont l'effet est spécifique aux

TRs (ISHIZUKA et al., 2001) et la gelsoline, une protéine impliquée dans la régulation de la polymérisation de l'actine, stimule l'activité transcriptionnelle des TRs (KIM et al., 2006). Finalement, le *PPARgamma-DBD-interacting protein 1* agit comme co-activateur des PPARs, des TRs, du RXR, des ERs et des ARs (TOMARU et al., 2006). Dans notre laboratoire, nous avons aussi identifié deux co-régulateurs, GRP1 et RanBPM, qui sont des partenaires d'interaction du DBD des TRs et feront l'objet de cette thèse.

2.2.3 La région charnière

Le domaine D est la région charnière (ou *hinge domain*) (Figure 3). Ce domaine possède peu d'homologie dans la superfamille des NRs. Au départ on lui accordait comme unique fonction de permettre la bonne orientation du domaine de liaison du ligand par rapport au DBD. En effet, la région charnière permet les changements de conformation du LBD des TRs ainsi que l'exposition de la surface d'interaction des co-activateurs (NASCIMENTO et al., 2006) et des co-répresseurs (NAGAYA et al., 1998). Maintenant plusieurs autres fonctions y sont associées dont l'importation nucléaire de certains NRs. La région charnière des TRs contient notamment leur NLS principal (LACASSE et al., 1993, BLACK et al., 2001). Des changements dans l'orientation de la région charnière permettent également de stabiliser la formation des homo- et hétérodimères liés aux différents types de TREs (NASCIMENTO et al., 2006).

2.2.4 Le domaine de liaison du ligand

Le domaine carboxy-terminal est responsable de la liaison du ligand (*ligand-binding domain* : LBD) (Figure 3). Malgré la diversité des ligands reconnus par la superfamille des NRs, ce domaine possède un haut niveau d'homologie. La poche hydrophobe où se fixe le ligand est formée de plusieurs hélices- α et de feuillets- β . L'hélice- α 12, qui forme en partie la région AF-2, joue un rôle prédominant dans le recrutement de co-régulateurs. Des analyses de

cristallographie par rayons X du LBD en absence et en présence d'un agoniste ont permis de déterminer que l'hélice- α 12 adopte deux conformations et agit comme un clapet situé au-dessus de la poche responsable de la liaison à la T_3 (NUNES et al., 2004). En absence du ligand, elle adopte une conformation ouverte (Figure 5). Ceci génère la surface d'interaction reconnue par les co-répresseurs de l'activité transcriptionnelle des NRs (MARIMUTHU et al., 2002). Lorsque la T_3 est dans la poche hydrophobe, l'hélice- α 12 se replie et adopte une conformation de clapet fermé, qui constitue la surface reconnue par les co-activateurs (Figure 5) (FENG et al., 1998). Bien que pour l'instant il n'existe pas de véritable antagoniste des HTs, quelques antagonistes partiels ont été décrits (SCHAPIRA et al., 2003). Le NH_3 , un antagoniste spécifique de $TR\alpha_1$, agit de manière à empêcher la formation de la surface reconnue par les co-régulateurs (NGUYEN et al., 2002, NGUYEN et al., 2005). Une fois associé à $TR\alpha_1$, une portion du NH_3 demeure à l'extérieur de la poche hydrophobe et empêche le repliement normal de l'hélice- α 12.

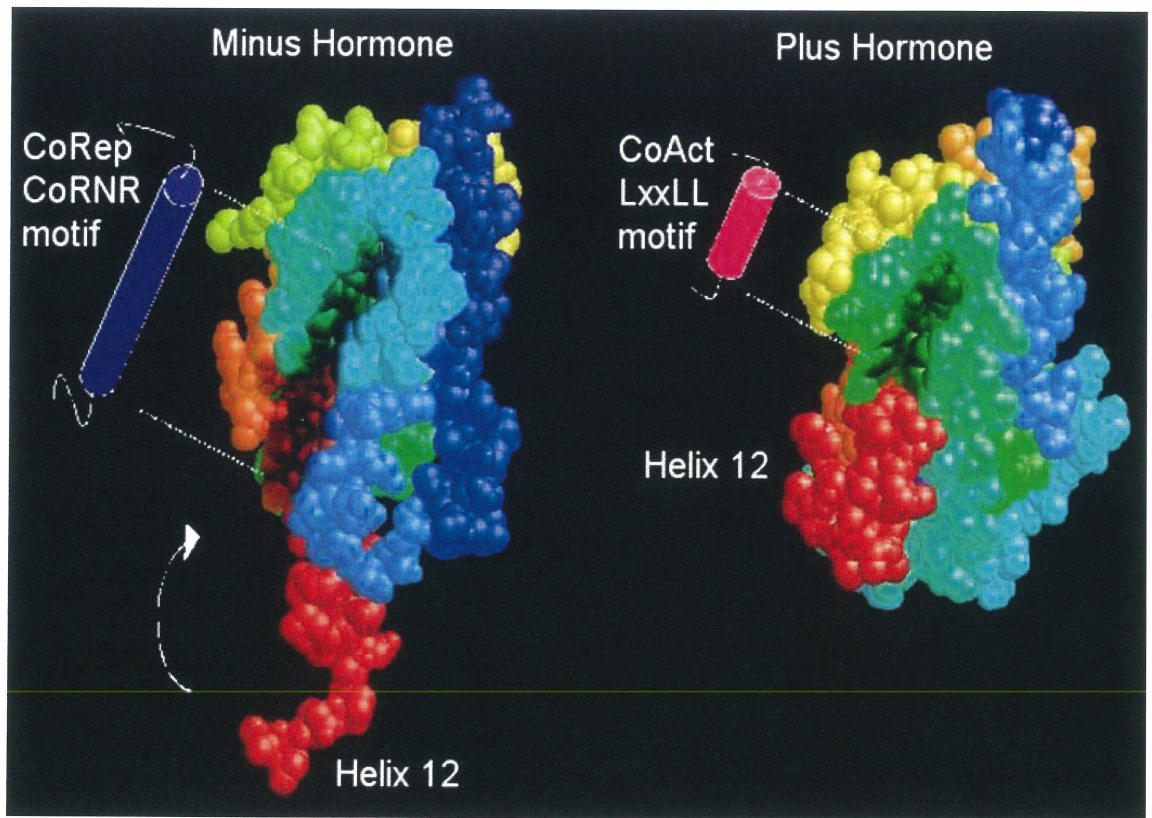


Figure 5. Les changements de conformation du domaine de liaison du ligand des TRs. En absence d'HTs, l'hélice- α 12 adopte la conformation de clapet ouvert. Ceci génère la surface d'interaction reconnue par la boîte CoRNR des co-répresseurs. En présence d'HTs, l'hélice- α 12 change de conformation pour former le clapet fermé et crée ainsi la surface d'interaction reconnue par les co-activateurs via leur boîte CoANR ayant un motif LxxLL. L'image est tirée à partir de: <http://www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs916/lect3/lect3.htm>.

2.3 Les isoformes des récepteurs des hormones thyroïdiennes

Il existe deux gènes codant pour les TRs, *THRA* et *THRB*. Ils génèrent différentes isoformes sensibles à la T₃, soit; TR α 1, TR β 1 et TR β 2 (Figure 6) (WEINBERGER et al., 1986, CHENG, 2000, pour revue). L'ensemble des isoformes des TRs possède un haut niveau d'homologie, soit près de 85%, excepté au niveau de la région amino-terminale.

Les différentes isoformes TR β sont générées par l'utilisation de promoteurs différents. Elles possèdent chacune une extrémité amino-terminale unique. Les isoformes TR α sont produites par épissage alternatif au niveau de leur exon 3'. Elles diffèrent donc au niveau de leur région carboxy-terminale. La portion carboxy-terminale du LBD de TR α 2 est unique, on y retrouve une séquence additionnelle de 122 acides aminés et l'absence d'une partie du LBD. L'isoforme TR α 2 agit comme un récepteur variant, sa longue séquence en carboxy-terminale la rend incapable de lier la T₃ et d'effectuer la transactivation de gènes. De plus, les rôles physiologiques de cette isoforme sont pour l'instant inconnus. En essais transcriptionnels, sa surexpression inhibe l'activité des autres isoformes (KOENIG et al., 1989, LAZAR et al., 1989). Des études par gel de retardement (EMSA) ont montré qu'elle possède une faible capacité à reconnaître les TREs (YANG et al., 1996) et à interagir avec les co-régulateurs comparativement aux autres isoformes des TRs (TAGAMI et al., 1998). Des souris *KO* sélectif de l'isoforme TR α 2 ont été générées (SALTO et al., 2001). L'ablation de TR α 2 provoque une expression plus importante de l'isoforme TR α 1. Ce phénomène de compensation fait en sorte qu'il est difficile de discriminer les effets dus à l'absence de TR α 2 d'entre ceux causés par l'augmentation de l'expression de TR α 1. Le phénotype des souris *KO* de TR α 2 est complexe, certains tissus sont en état d'hyperthyroïdie (augmentation du débit cardiaque, augmentation de la température corporelle) et d'autres d'hypothyroïdie (gain de poids important, croissance lente et tardive). La

perte de l'expression de TR α 2 semble avoir des conséquences moins importantes que l'augmentation de l'expression de TR α 1.

2.3.1 L'expression tissulaire des TRs

Les TRs sont largement distribués dans l'ensemble des tissus. Par contre, le niveau d'expression des isoformes TR α varie d'un tissu à l'autre (CHIN, 1991). TR α 1 joue un rôle très important dans le développement de plusieurs tissus dans les premières semaines post-natales dont notamment : la maturation intestinale (PLATEROTI et al., 2001), le développement du cervelet (MORTE et al., 2002) et la croissance osseuse (BASSETT et WILLIAMS, 2003). Les isoformes TR α sont fortement exprimées au niveau des cardiomyocytes et on leur attribue les effets néfastes de l'hyperthyroïdie comme la tachycardie (GULLBERG et al., 2002).

L'expression des isoformes TR β est dépendante du tissu et change au cours du développement (CHENG, 2000, YEN, 2001, pour revues). TR β 1 est l'isoforme responsable de la régulation des fonctions hépatiques qui sont sensibles aux HTs. Les isoformes TR β sont exprimées de manière importante au niveau de l'axe HHT et elles sont responsables de la rétroinhibition par les HTs (HODIN et al., 1989, BRADLEY et al., 1992, COOK et al., 1992, LECHAN et al., 1994, ALKEMADE et al., 2005). L'isoforme TR α 1 y est également exprimée, mais à des niveaux beaucoup plus bas. Les isoformes TR β sont également très importantes pour le bon fonctionnement de la rétine et du développement de l'oreille interne (GAUTHIER et al., 1999).

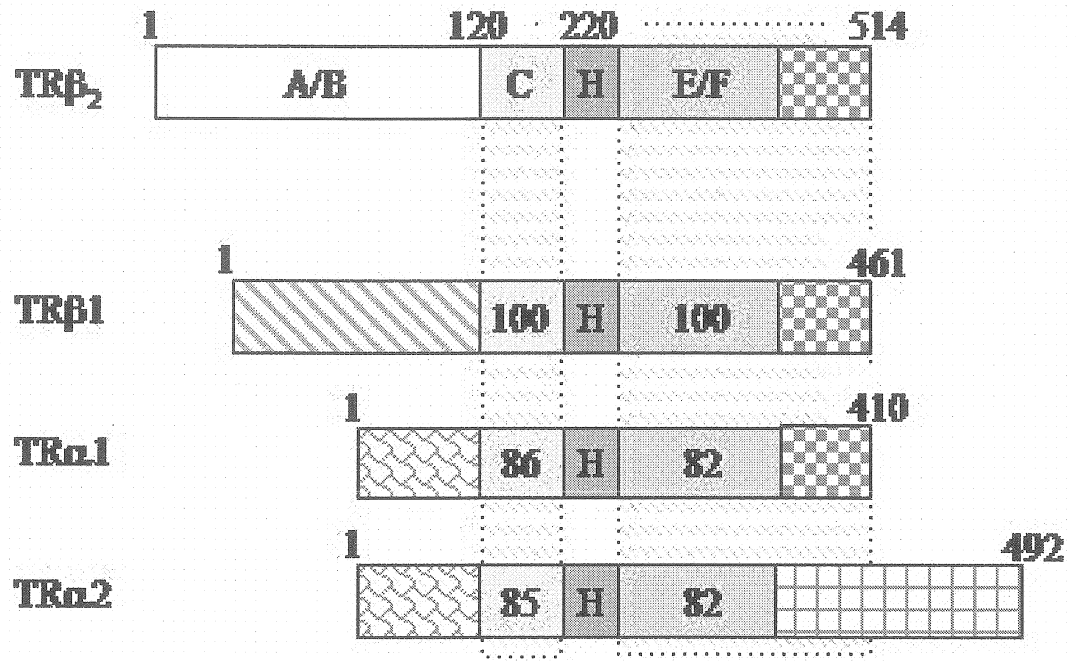


Figure 6. Les isoformes des récepteurs des hormones thyroïdiennes. À chaque extrémité on retrouve le nombre d'acides aminés pour chacune des isoformes. Le pourcentage d'homologie par rapport à l'isoforme TRβ₂ est indiqué dans chaque domaine, excepté au niveau de la région amino-terminale spécifique à TRβ₂. L'image est produite à partir de (GREENSPAN et GARDNER, 2004).

2.3.2 Les effets spécifiques des différentes isoformes des TRs

Comme l'exemple des souris *KO* du gène $TR\alpha 2$ l'a démontré, l'expression spécifique de certaines isoformes des TRs apporte des effets différents dépendamment du tissu de l'organisme. Par exemple, il a été démontré que un agoniste des HTs possédant une plus grande affinité pour les isoformes $TR\beta$, le GC-1, provoque la réduction du cholestérol sanguin chez les souris (JOHANSSON et al., 2005). D'autres études ont démontré qu'il arrive à promouvoir la croissance des cellules hépatiques et pancréatiques chez le rat (COLUMBANO et al., 2006) ainsi que la dépense énergétique (VILLICEV et al., 2007). Par contre, ces effets bénéfiques sur le bilan lipidique et le métabolisme basal sont accompagnés de plusieurs effets secondaires néfastes au niveau cardiaque, comme la tachycardie. Des études ont démontré que les effets profitables sur le cholestérol sanguin sont effectués par les isoformes $TR\beta$ exprimées au niveau hépatique, alors que les effets cardiaques néfastes sont surtout produits par la liaison de l'agoniste à $TR\alpha 1$.

Les éléments de réponse négatifs (nTRES), les plus étudiés sont ceux de la thyrolibérine et de la thyrostimuline de l'axe HHT. Dans la région de l'axe HHT, l'expression des isoformes $TR\beta$ est très importante et on considère ces isoformes comme les médiateurs principaux de la régulation négative par les HTs. Des études ont démontré que l'introduction d'un vecteur codant pour l'isoforme $TR\alpha 1$ dans l'hypothalamus de souris nouveaux-nés empêche l'inhibition de la transcription en présence d'HTs sur le promoteur de la thyrolibérine (DUPRE et al., 2004). Ainsi, $TR\beta$, mais non $TR\alpha$, joue un rôle spécifique dans la régulation physiologique du gène TRH. Une autre étude à l'aide de chimères TR correspondant à l'échange du domaine A/B, des isoformes $TR\alpha 1$ et $TR\beta 1$ de rat montre l'importance de la région amino-terminale dans la répression transcriptionnelle du gène de la thyrolibérine par la T_3 . En effet, les chimères $TR\beta 1$ avec une région amino-terminale de $TR\alpha 1$ sont incapables d'inhiber la transcription de ce

promoteur. Tandis que les chimères TR α 1 contenant la région amino-terminale de TR β 1 provoquent l'inhibition de la thyrolibérine. L'isoforme TR β 2 joue également un rôle important dans la régulation des nTRES. L'expression de TR β 2 est spécifique aux régions de l'axe HHT (HODIN et al., 1989). De plus, des sites d'interactions avec différents co-régulateurs ont été identifiés au niveau de sa région A/B (LANGLOIS et al., 1997, OBERSTE-BERGHAUS et al., 2000).

Plusieurs mutations dans le gène *THRB* ont été identifiées chez l'homme, mais encore aucune pour *THRA*. La quasi-totalité des mutations découvertes jusqu'à présent du gène *THRB* se retrouvent dans le LBD des récepteurs. Plus précisément au niveau des sites de liaison des co-régulateurs. Chez les personnes hétérozygotes, les TR β mutantes ont un effet dominant négatif sur les récepteurs normaux. La pathologie polymorphique génétique qui en découle est la résistance aux HTs (RTH) (WEISS et REFETOFF, 2000, pour revue) qui est caractérisée par des niveaux élevés d'HTs en absence de suppression de la thyroestimuline. La RTH crée dans certains organes des effets comparables à l'hyperthyroïdie, notamment au niveau cardiaque où les TR α sont exprimées plus fortement. Par contre, au niveau hépatique, on retrouve des conditions semblables à celles retrouvées en hypothyroïdie car se sont les isoformes TR β qui y sont fortement exprimées.

3 Les mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes

3.1 Les actions non-génomiques des HTs

Les actions non-génomiques des HTs possèdent plusieurs caractéristiques : elles sont rapides, génèrent souvent l'activation de canaux ioniques ou l'activation de voie de signalisation au niveau du cytoplasme et ne sont pas sensibles aux agents qui inhibent la synthèse de protéines *de novo* (BASSETT et al., 2003). De plus, leurs effets sont spécifiques à la substance iodée, c'est-à-dire que les effets de la T₄ diffèrent de ceux de la T₃ ou la T₂.

Longtemps, un site de liaison aux HTs autres que les TRs et qui possède un effet à des doses physiologiques est demeuré inconnu. Récemment, un véritable site de liaison aux HTs a été identifié au niveau membranaire (BERGH et al., 2005). Par contre, on considère toujours les mécanismes d'action non-génomiques comme étant des voies alternatives des HTs. Des mesures physiologiques et des analyses de corrélations seront requises afin d'attribuer toute son importance à ces phénomènes. Par contre, les actions non-génomiques octroyées à d'autres membres de la superfamille des NRs ont été documentées. Par exemple, des effets non-génomiques des oestrogènes sont attribués à la présence de ERs à la membrane cytoplasmique (BJORNSTROM et SJOBERG, 2005, pour revue), ce qui n'a pas été exclu pour les TRs.

3.1.1 Les voies de signalisation et les canaux ioniques

Depuis longtemps, plusieurs équipes ont étudié la liaison des HTs et surtout de la T₄ à la membrane cytoplasmique (BASSETT et al., 2003, pour revue). La T₄ et la T₄-agarose provoquent certains effets *via* leur liaison à un récepteur inconnu couplé aux protéines G (LIN et al., 1999). La T₄ module aussi l'activité des pompes à ions ainsi que le transport du Na⁺, K⁺,

Ca²⁺ et celui du glucose (INCERPI et al., 2003, D'AREZZO et al., 2004, INCERPI et al., 2005). La T₄ provoque également l'activation du *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) en plus d'être impliquée dans la régulation du métabolisme des phospholipides par l'activation des PKC et PKD (DAVIS et al., 1989, KAVOK et al., 2001). Des événements dépendants de l'activation des MAPKs ont lieu également au niveau du noyau et stimulent la transcription de gènes cibles (DAVIS et al., 2000, SHIH et al., 2001, LIN et al., 2003, TANG et al., 2004). De plus, l'activation de la voie des MAPKs modifie les TRs au niveau post-traductionnel. Certaines modifications comme la phosphorylation au niveau de résidus sérines du DBD favorisent leur transport au noyau (DAVIS et al., 2000). La phosphorylation des TRs contribue également à leur association avec des co-activateurs et inhibe la dégradation des TRs par le protéasome (JONES et al., 1994, LEITMAN et al., 1996, TING et al., 1997). Une équipe avance que le récepteur membranaire des HTs est l'intégrine $\alpha V\beta 3$, localisée sur la face externe de la membrane plasmique. La liaison des HTs à l'intégrine $\alpha V\beta 3$ cause l'activation de la voie des MAPKs (BERGH et al., 2005).

Il existerait également des effets non-génomiques des HTs qui causent des effets sur l'organisme en général. Par exemple, la T₃ augmente le débit cardiaque et réduit la résistance vasculaire systémique chez les adultes en trois minutes (SCHMIDT et al., 2002). Un dérivé des HTs, la 3-iodothyronamine peut induire la bradycardie et l'hypothermie en quelques minutes (SCANLAN et al., 2004). Les raisons expliquant ces phénomènes sont inconnues pour l'instant.

3.1.2 La mitochondrie

La mitochondrie est un organelle qui joue un rôle dans le métabolisme et dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (CASAS et al., 2003). La mitochondrie possède son propre génome ainsi que des mécanismes spécifiques pour sa répllication, sa transcription et la synthèse de ses protéines. Toutefois, la majorité des protéines

mitochondriales proviennent du génome de la cellule. Les HTs influencent indirectement l'activité mitochondriale par la régulation de l'expression de facteurs de transcription mitochondriaux provenant du génome cellulaire (GARSTKA et al., 1994, PILLAR et SEITZ, 1997). De plus, les HTs s'accumulent dans ces organelles et elles sont les effecteurs majeurs de leur prolifération, de leur différenciation, et de leur maturation. On croit notamment que les effets des HTs au niveau des mitochondries seraient plutôt médiés par des variants tronqués des TRs qui y sont exprimés (STERLING et BRENNER, 1995, WRUTNIAK et al., 1995).

3.2 Les mécanismes d'action génomiques des HTs

Les NRs constituent un des modèles les plus intéressants pour l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes. Ils sont les effecteurs des signaux hormonaux ou métaboliques qu'ils transmettent directement au génome en augmentant ou diminuant l'expression des gènes cibles. La liaison du ligand produit des changements majeurs au niveau de la conformation des TRs et engendre une foule de processus dont leur transport actif au noyau ainsi que leurs interactions spécifiques avec des protéines co-régulatrices qui modulent leur activité transcriptionnelle (BEATO et al., 1995, MCKENNA et al., 1999). Ce processus met en jeu plusieurs systèmes dont les éléments de réponse des TRs, localisés au niveau des gènes cibles, ainsi que les protéines associées à l'ADN : les histones et les enzymes responsables de leurs modifications post-traductionnelles, la machinerie transcriptionnelle de base ainsi que le partenaire d'hétérodimérisation, le RXR.

3.2.1 Les éléments de réponse des récepteurs des hormones thyroïdiennes

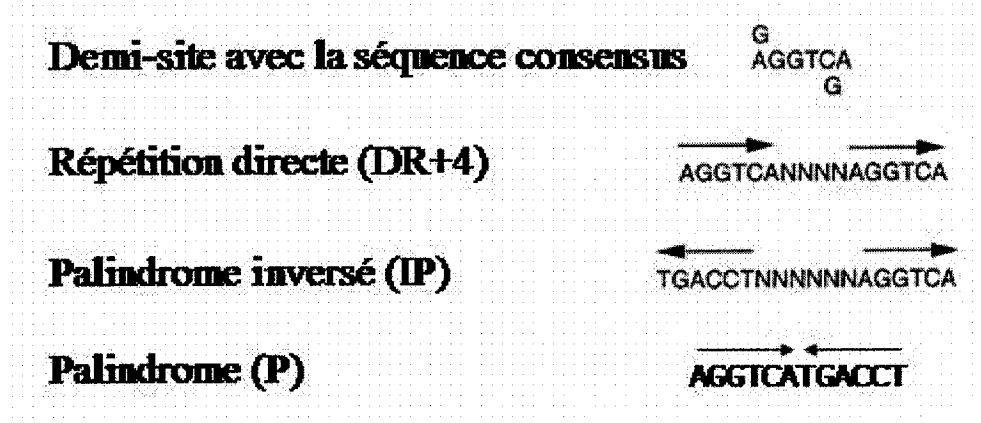
L'habileté des TRs à réguler les niveaux d'expression des gènes est dépendante de la présence d'un élément de réponse des TRs (TRE). Celui-ci fournit un site de reconnaissance

pour la liaison des TRs à l'ADN. La majorité des séquences régulatrices décrites pour les TRs est habituellement localisée dans la région 5' des promoteurs. Les TREs correspondent généralement à deux copies de petites séquences d'ADN. Chacune des séquences constitue un demi-site avec lequel les doigts de zinc du DBD des TRs s'associent. Plusieurs arrangements des demi-sites consensus reconnus par les TRs ont été décrits.

3.2.2 Les éléments de réponse positifs des hormones thyroïdiennes

L'hexamère (G/A)GGT(C/A)A représente la séquence consensus minimale reconnue par les TRs (Figure 7A) (Brent GA et al., 1989). Bien que cette séquence soit suffisante pour effectuer une liaison avec le TR sous forme de monomère, elle ne suffit pas à produire une régulation sensible à la T₃. Le site de liaison optimal des TRs est un octaèdre (TAAGGTCA) de la séquence minimale consensus (KATZ et KOENIG, 1993). L'analyse des nombreux TREs identifiés démontre qu'il existe une grande diversité dans l'arrangement de la séquence consensus (WILLIAMS et BRENT, 1995). On dénombre trois grands types d'arrangement des éléments de réponse positif des HTs (pTREs): le palindrome (pal) (GLASS et al., 1987), la répétition directe de la séquence consensus séparée par quatre nucléotides (DR+4) (Figure 7A) (UMESONO et al., 1991) et le palindrome inverse (SUZUKI et al., 1994, SIMONIDES et al., 1996). (Figure 7A/B). Les nucléotides contenus entre les demi-sites sont non seulement requis afin de permettre la liaison des TRs mais ils possèdent aussi un rôle déterminant dans l'ampleur de la réponse transcriptionnelle à la T₃ (HARBERS et al., 1996).

A



B

Type de TRE	Exemples de gènes
DR+4	Hormone de croissance du rat (KOENIG et al., 1987, GLASS et al., 1987, BRENT et al., 1989). Enzyme malique du rat (PETTY et al., 1990, DESVERGNE et al., 1991). Chaîne lourde alpha de la myosine (IZUMO et MAHDAVI, 1988).
Palindrome inversé	Isoforme TRβ (SUZUKI et al., 1994). SERCA (SIMONIDES et al., 1996).
Palindrome	Rénine (KOBORI et al., 2001), Hormone de croissance du rat (CARR et al., 1994)

Figure 7. Les différents éléments de réponse des TRs et exemples de gènes les contenant. (A) La séquence consensus des TREs et les différents arrangements possibles. (B) Exemples de gènes régulés par les TRs et les différents TREs qu'ils contiennent.

3.3.3 Les éléments de réponse négatifs des hormones thyroïdiennes

Plusieurs TREs négatifs (nTREs) ont été identifiés et caractérisés, dont ceux de la thyrolibérine, de la sous-unité bêta de la thyrostimuline (Figure 8) et de l'hormone de croissance (WONDISFORD et al., 1989, CARR et WONG, 1994, HOLLENBERG et al., 1995a, BREEN et al., 1997). La séquence reconnue par les TRs peut changer, mais on retrouve habituellement la séquence consensus. Pour les pTREs, la présence de deux demi-sites est très caractéristique, par contre, plusieurs nTREs décrits ne contiennent qu'un demi-site, le TR agirait donc sous forme de monomère (Figure 8) (BRENT et al., 1991, CARR et al., 1992). De plus, au niveau du même nTRE on peut trouver des sites de liaison des TRs sous forme de monomères et d'hétérodimères (Figure 8B). Des études menées dans notre laboratoire ont d'ailleurs permis de démontrer l'importance de la présence du RXR afin de permettre la régulation normale de la thyrolibérine (LAFLAMME et al., 2002).

Au niveau du promoteur de la thyrolibérine, une analyse par mutagenèse dirigée a permis d'identifier la séquence minimale requise afin de permettre une réponse transcriptionnelle à la T_3 . Dans cette région, des sites numérotés 4, 5, et 6 sont des sites potentiels de liaison des TRs capables de participer à une répression transcriptionnelle en présence de T_3 (Figure 8A) (HOLLENBERG et al., 1995a). Le pouvoir d'inhibition de chacun des sites n'est pas équivalent. Chez l'humain, le site 4 est capable à lui seul d'inhiber la transcription en présence de T_3 . Les autres sites n'ont aucun effet si on les utilise seuls (GUISOUMA et al., 2002).

Bien qu'il soit clairement établi que la régulation de la sous-unité alpha de la thyrostimuline soit régulée par les TRs (YOKOMORI et al., 1998, COLLINGWOOD et al., 2001), la détermination fine du/des TRE(s) présent(s) n'est pas encore complétée. Un palindrome inversé a été localisé, mais il n'arrive pas à lui seul à réguler l'expression en fonction de la T_3 (Figure 8B) (MADISON et al., 1993, TAGAMI et al., 1999). Dans le cas de la sous-

unité bêta de la thyroïdostimuline, des sites correspondants aux nTREs ont été décrits (Figure 8C) (BODENNER et al., 1991). Cependant, les études de l'activité transcriptionnelle des TRs au niveau de ce promoteur couplé à un gène rapporteur sont difficiles. L'expression normale de la cette sous-unité spécifique à l'axe HHT requiert la présence de plusieurs facteurs de transcription dont Pit-1 et GATA-2 (NAKANO et al., 2004). L'expression de ces facteurs de transcription étant tissu-spécifique, les lignées cellulaires disponibles afin d'effectuer des études sont limitées et elles présentent souvent une faible efficacité de transfection (NAGAYAMA et al., 1996, GORDON et al., 1997).

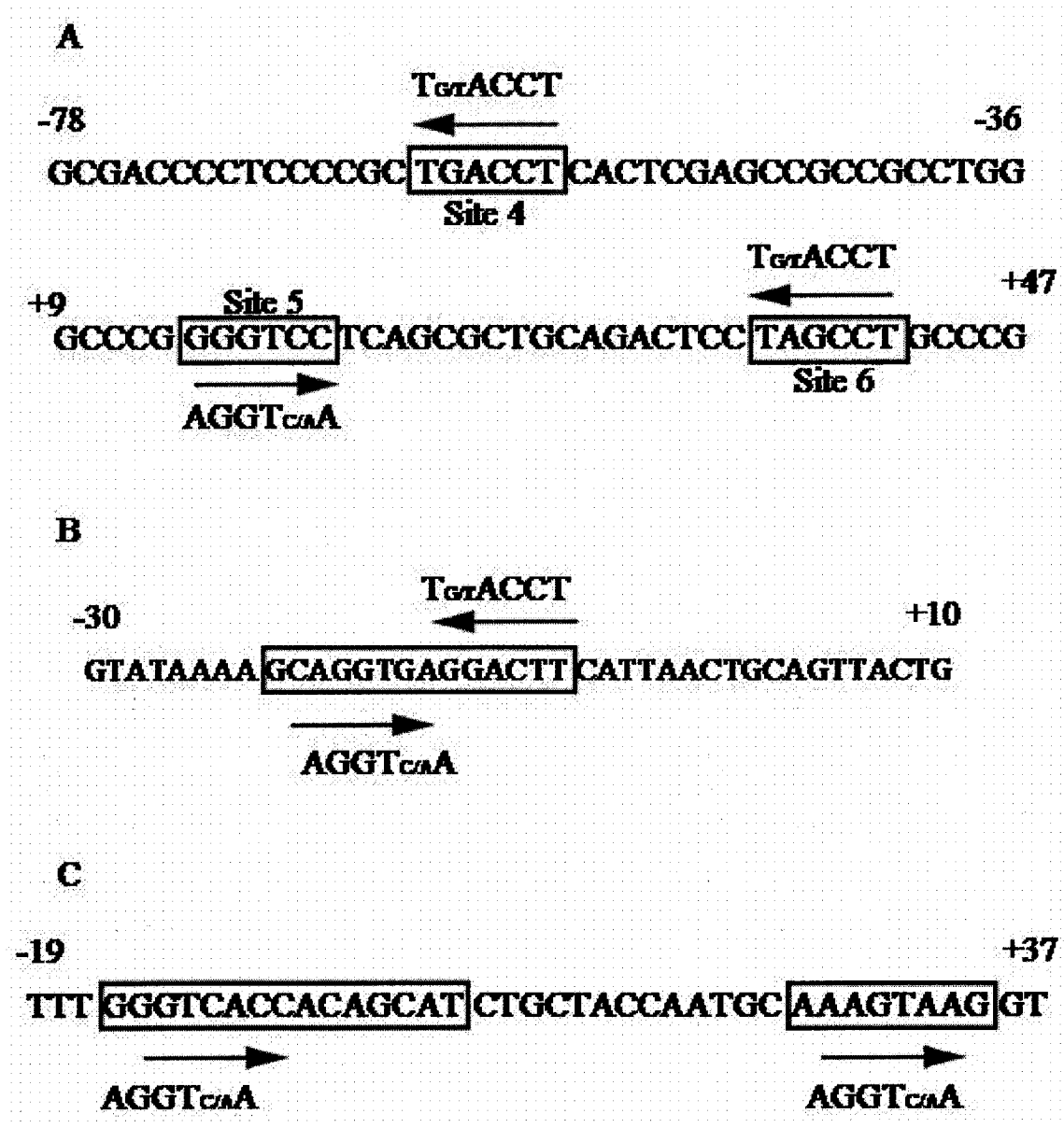


Figure 8. Représentation des nTRES dans les régions promotrices humaines de la thyrolibérine et des sous-unités de la thyrostimuline. (A) Dans la région 5' du promoteur de la thyrolibérine trois sites de liaison des TRs sous forme de monomère ont été identifiés : le site 4 se localise dans la région -63 à -58, le site 5 de +14 à +19 et le site 6 de +37 à +42. (B) Au niveau du promoteur de la sous-unité alpha de la thyrostimuline un palindrome inversé a été localisé dans la région -22 à -9. (C) Dans le promoteur humain de la sous-unité bêta de la thyrostimuline deux sites de liaison des TRs ont été identifiés, le premier dans la région -16 à -2 et le second allant de +28 à +35. Les séquences et les arrangements décrits des nTRES proviennent de (HOLLENBERG et al., 1995a, OPPENHEIMER et al., 1996).

3.3.4 La dimérisation des TRs

La présence de deux demi-sites de liaison des TRs dans les TREs a d'abord fait croire qu'ils s'associaient en homodimères, comme la plupart des récepteurs stéroïdiens. Des études, avec les éléments de réponse palindromiques et le promoteur de l'hormone de croissance du rat, ont démontré que l'association des TRs était majoritairement sous forme d'hétérodimère avec le RXR (WAHLSTROM et al., 1992). Ce type d'association était même plus stable que l'homodimère. La dimérisation des TRs implique surtout deux domaines, soit une région près de la poche hydrophobe, responsable de la liaison du ligand, et la boîte D localisée au niveau du second doigt de zinc du DBD (FORMAN et al., 1989, UMESONO et EVANS, 1989, LUISI et al., 1991). La liaison des TRs sous forme d'hétérodimères avec le RXR est la conformation sous laquelle les TRs sont les plus aptes à activer la transcription des gènes cibles (ZHANG et al., 1992, YEN et al., 1992, KLIEWER et al., 1992a, MIYAMOTO et al., 1993, LAFLAMME et al., 2002). De plus, l'ajout de la T₃ favorise la formation des hétérodimères par rapport aux homodimères sur plusieurs TREs (KAKIZAWA et al., 1997, COLLINGWOOD et al., 1997) et l'orientation de l'hétérodimère TR/RXR est importante. L'hétérodimère est plus stable lorsque le TR est positionné au niveau 3' du demi-site et le RXR en 5' (HARTONG et al., 1994, YEN et al., 1994). Auparavant on accordait aucun effet à l'addition conjointe de la T₃ et l'acide 9-*cis* rétinoïque sur l'activité transcriptionnelle des hétérodimères TR-RXR (ROSEN et al., 1992). Par contre, des études indiquent que, dans certains cas, le ligand du RXR arrive à potentialiser l'activité de l'hétérodimère (LI et al., 2002, CASTILLO et al., 2004, LI et al., 2004).

3.4 Le rôle des histones

La fonction initialement associée aux histones concerne la compaction de l'ADN. L'ensemble du génome, d'une longueur de 2 mètres, peut ainsi être contenu à l'intérieur du noyau de la cellule, sous forme de chromatine. La seconde fonction constitue le marquage de la chromatine par différentes modifications post-traductionnelles. Il existe deux types de chromatine, soit : l'euchromatine, la forme contenant l'ADN actif au niveau transcriptionnel, et l'hétérochromatine, la forme contenant l'ADN silencieux.

Les nucléosomes constituent les unités fondamentales de conditionnement de l'ADN en chromatine (Figure 9A). Chaque nucléosome est un octaèdre formé par l'assemblage de deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4. Les histones sont des protéines basiques hautement conservées dans l'évolution. Leurs interactions avec l'ADN qui possède une charge négative nette, permettent son repliement et sa condensation. Au niveau de chaque nucléosome, on retrouve une séquence d'ADN d'environ 147 paires de base. L'histone H1 est responsable de la fermeture de la boucle d'ADN à l'entrée et à la sortie du nucléosome (Figure 9A). Les histones sont hautement associées à l'ADN, elles participent à plusieurs phénomènes dont la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Le génome humain contenant environ 3 milliards de paires de bases, fait en sorte qu'il existerait des dizaines de millions de nucléosomes dont la composition primaire serait identique. Mais des millions de nucléosomes identiques ne feraient que produire un capharnaüm pouvant mettre en opposition avec les fonctions essentielles du génome. La solution est ce que l'on appelle le code d'histone, soit des modifications post-traductionnelles spécifiques des histones qui permettent l'identification de régions actives ou silencieuses au niveau transcriptionnel (Figure 9B).

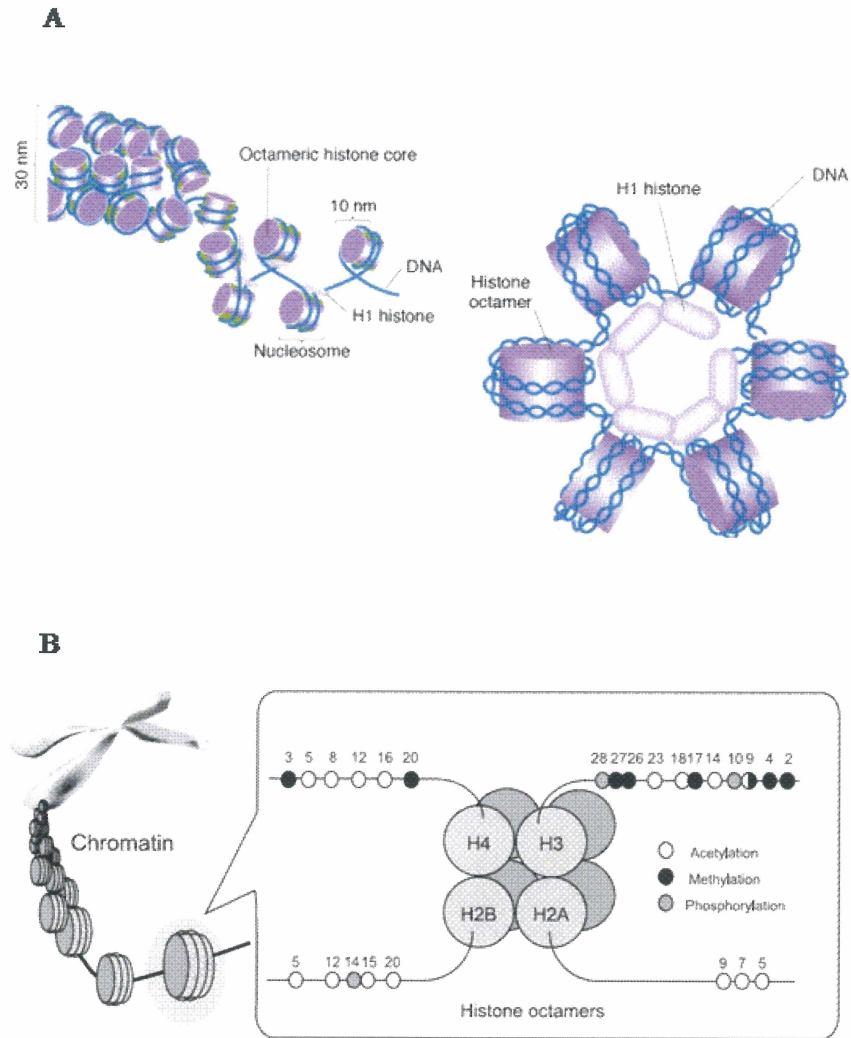


Figure 9. La structure chromatinienne de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. (A) L'unité structurale de la fibre chromatinienne, le nucléosome est formé à partir d'un octaèdre d'histones (H2A, H2B, H3 et H4). L'image provient de: http://www.researchintelligentdesign.org/wiki/DNA_compaction. **(B)** Représentation des modifications post-traductionnelles des histones au niveau de leur queue amino-terminale. L'image provient de http://www.cumc.columbia.edu/news/in-vivo/Vol2_Iss01_jan15_03/index.html.

3.4.1 Les modifications post-traductionnelles des histones

Le compactage de l'ADN en nucléosomes apporte d'abord un effet inhibiteur sur la transcription. L'adoption d'une nouvelle conformation des histones est importante pour permettre l'initiation de la transcription ainsi que pour son maintien. Les modifications post-traductionnelles des histones ont pour effet de favoriser ou d'inhiber leurs contacts serrés avec l'ADN. Ce phénomène rend possible l'accès de la machinerie transcriptionnelle de base au promoteur. Les modifications post-traductionnelles des histones servent également de plateforme d'interaction très sélective pour les protéines impliquées dans la transcription. Plusieurs co-activateurs, ainsi que des protéines appartenant à la machinerie transcriptionnelle, possèdent une très forte affinité pour certaines histones modifiées. La stabilisation du complexe initiateur de la transcription au niveau des séquences cibles est également favorisée (LUGER et al., 1997, REA et al., 2000).

Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent être simples ou multiples ou fonctionner en lien avec les histones avoisinantes (BRIGGS et al., 2002). On compte parmi les modifications post-traductionnelles des histones : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (Figure 9B) (JENUWEIN et ALLIS CD, 2001, pour revue, FISCHLE et al., 2003). L'inhibition de la transcription se caractérise par l'hypoacétylation et la méthylation de résidus lysines (Lys). Ces phénomènes sont catalysés par les histones déacétylases (HDACs) et les méthyltransférases (HMTs). Les résidus Lys des histones qui sont sensibles aux HDACs sont localisés dans la queue amino-terminale où les contacts entre l'ADN et le nucléosome sont importants (Figure 9B). Les résidus Lys sont normalement chargés positivement et s'associent fortement avec l'ADN chargée négativement.

Le retrait des groupes acétyls par les HDACs inhibe l'activité transcriptionnelle car il favorise des contacts plus serrés entre l'ADN et les histones en augmentant leur charge positive.

L'activation de la transcription se caractérise par un état hyperacétylé des histones. L'acétylation des résidus Lys des histones H3 et H4 par les histones acétyltransferases (HATs) relâche la structure chromatinienne et est une des caractéristiques majeures de l'activation de la transcription. Les résidus Lys peuvent être mono- bi- ou tri- acétylés. La méthylation des histones a longtemps été exclusivement associée aux modifications épigénétiques, dont le rôle est de marquer l'ADN silencieux ou l'hétérochromatine. Le terme épigénétique définit les modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes, ne s'accompagnant pas de changements des séquences nucléotidiques. Notamment, la méthylation de l'histone H3 par les HMTs sur le résidu Lys 9 est caractéristique de l'hétérochromatine (NOMA et al., 2001). Par contre, la méthylation n'est pas toujours synonyme de répression et elle est désormais considérée comme étant impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des promoteurs, par exemple, la méthylation du résidu Lys 4 de H3 induit la transcription (Figure 9B) (SANTOS-ROSA et al., 2002).

D'autres modifications post-traductionnelles simples ou multiples des histones sont également connues. Par exemple, la phosphorylation de l'histone H3 au cours de la stimulation mitotique augmente l'acétylation de H3. Ce type de modification est courant au niveau de région où la transcription est très importante. L'acétylation de la H3 inhibe la méthylation du résidu Lys 9 qui code pour le silence transcriptionnel.

3.5 Mécanismes de régulation génétique positive

Le mécanisme de régulation positive de la transcription par les HTs est le phénomène le mieux décrit dans la littérature. En absence du ligand, les TRs ainsi que les NRs dits non stéroïdiens comme le RXR, RAR, VDR, et les PPARs sont associés à leurs pHREs (DALMAN et al., 1990). Ils adoptent une conformation qui favorise les interactions avec des co-répresseurs (Figure 10) (HORLEIN et al., 1995, CHEN et EVANS, 1995, MCKENNA et al., 1999). Les protéines co-répresseurs et leurs partenaires possèdent une activité HDAC et maintiennent la chromatine dans les environs du promoteur dans un état hypoacétylé (Figure 10). L'activité transcriptionnelle au niveau des promoteurs contenant des pTREs est ainsi inhibée en dessous du niveau de base. L'inhibition transcriptionnelle des gènes régulés positivement en absence du ligand constitue un phénomène important et son absence peut mener les cellules vers des états prolifératifs anormaux (LOU et al., 2004, HARKONEN et MAKELA, 2004, CULIG et al., 2004).

En présence de T_3 , les TRs changent de conformation chassant les co-répresseurs et favorisant le recrutement actif des co-activateurs (Figure 5 & 10) (WAGNER et al., 1995, XU et LI, 2003). Les co-activateurs classiques favorisent un état hyperacétylé des histones et donc l'ouverture de la structure chromatinienne. Par la suite, un échafaudage de complexes protéiques permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base (voir la section 3.5.2-5). La transcription est ainsi stimulée au-delà des niveaux de base et de manière soutenue. Les interactions avec les pTREs ainsi que les co-activateurs sont aussi favorisés par la plus grande abondance de TRs au noyau suite à l'ajout du ligand (Figure 10).

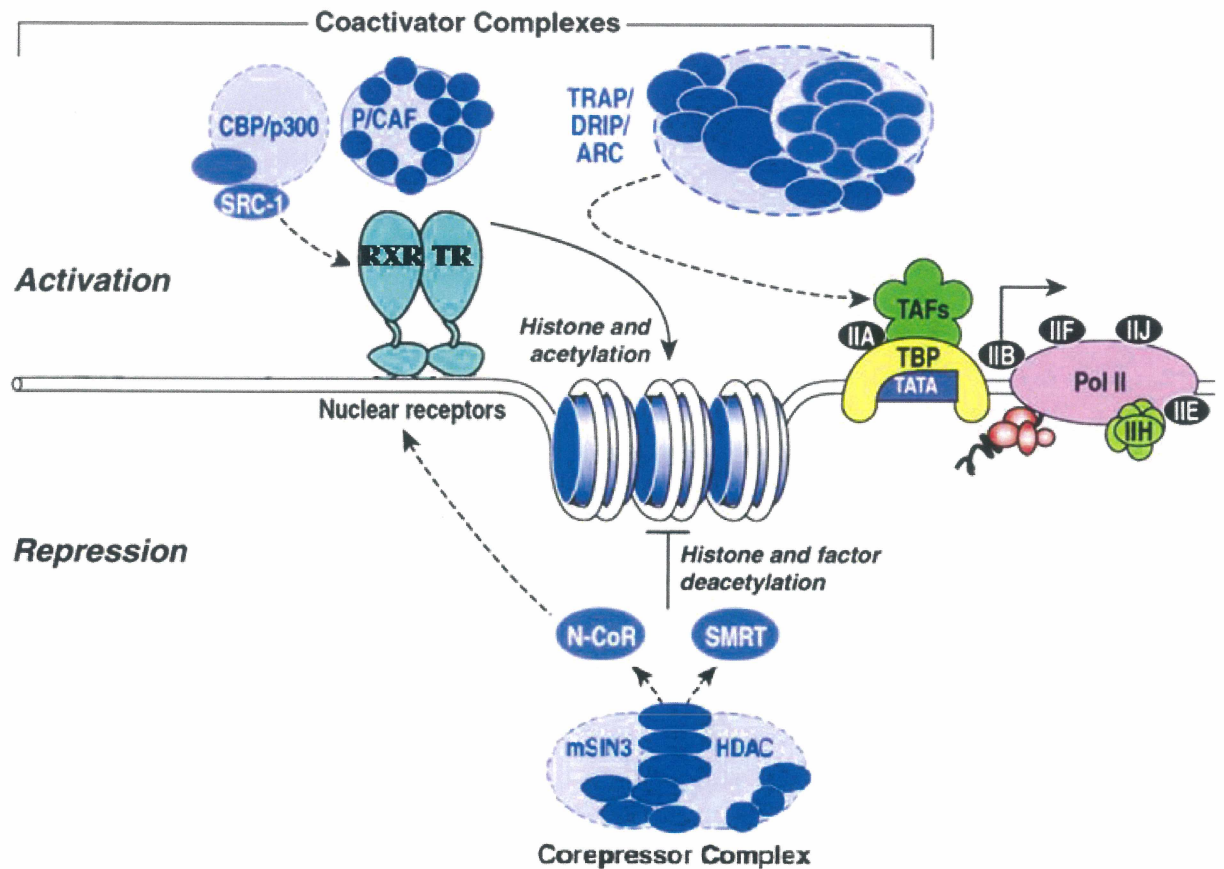


Figure 10. Le mécanisme d'action génomique des récepteurs des hormones thyroïdiennes. La liaison des récepteurs des hormones thyroïdiennes sous forme d'hétérodimère entre le RXR (à gauche) et le TR (à droite) au niveau d'un pTRE. En présence de T_3 , les TRs interagissent avec des co-activateurs ainsi que différents complexes protéiques ayant soit une activité HAT (CBP/p300, PCAF et TRAP/DRIP/ARC) ou favorisant le glissement des nucléosomes de manière ATP-dépendant (BRG1). Les complexes médiateurs qui interagissent avec la machinerie transcriptionnelle de base sont recrutés par le complexe TRAP/DRIP/ARC. En absence de T_3 , les TRs se lient au pTRE et recrutent des co-répresseurs (NCoR/SMRT). Ces co-répresseurs interagissent avec différentes HDACs entraînant une inhibition de la transcription des gènes cibles. L'image provient de (ROSENFELD et GLASS, 2001).

3.5.1 Les co-activateurs classiques

La famille des co-activateurs p160/SRCs (selon leur poids moléculaire ou pour *steroid receptor coactivators*) est impliquée dans l'activation transcriptionnelle de tous les NRs. Les membres de la famille p160 sont : SRC-1/NCoA (ONATE et al., 1995, KAMEI et al., 1996), SRC-2/TIF2/GRIP1 (HONG et al., 1996, VOEGEL et al., 1996), et SRC-3/pCIP/AIB1/ACTR/RAC3/TRAM-1 (Figure 11A) (TORCHIA et al., 1997, ANZICK et al., 1997, CHEN et al., 1997, TAKESHITA et al., 1997). Les SRCs sont des protéines ubiquitaires mais leur niveau d'expression varie d'un tissu à l'autre. Leur affinité pour les différents NRs ainsi que leurs isoformes est également variable, apportant un second niveau de régulation de l'activité transcriptionnelle des NRs.

Ces co-activateurs interagissent principalement dans le LBD des NRs suite aux changements de conformation importants survenant lors de la liaison de la T_3 , et qui favorise leur liaison par rapport aux co-répresseurs (Figure 5 & 10) (DARIMONT et al., 1998, APRILETTI et al., 1998, RIBEIRO et al., 1998, pour revue). Les membres de la famille p160 interagissent avec les TRs *via* trois boîtes CoANRs localisées dans leur région centrale. Les boîtes CoANRs contiennent un motif en hélice- α *LxxLL* (Figure 11A) (HEERY et al., 1997, MCINERNEY et al., 1998). Le point de contact majeur de SRC-1 se situe au niveau du AF-2 des TRs (TIAN et al., 2006). Toutefois, les membres de la famille SRCs sont également capables d'interagir avec le domaine A/B de certains NRs dont les ERs et les GRs ainsi que les isoformes TR β (IWASAKI et al., 2006). De plus, il a été démontré que la présence du domaine A/B des TR β est essentielle afin de permettre l'interaction ainsi que de promouvoir l'activité transcriptionnelle maximale en lien avec SRC-1.

Les co-activateurs membre de la famille p160 possèdent une activité HAT intrinsèque dans leur région carboxy-terminale (Figure 11). Par contre, leur apport net sur l'état hyperacétylé des histones n'est pas assez important pour permettre l'ouverture de la chromatine nécessaire et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base (SPENCER et al., 1997). Le rôle de la famille p160 est plutôt d'initier la relaxation de la structure chromatinienne de l'ADN et de recruter les autres complexes co-régulateurs *via* deux domaines d'interactions situés dans leur région médiane et carboxy-terminale dont notamment CBP/p300 et PCAF (Figure 10 & 11A). Il existe également des mécanismes d'activation de la transcription par SRC-1 qui sont indépendants de la présence de CBP (IKEDA et al., 1999, DENNLER et al., 2005).

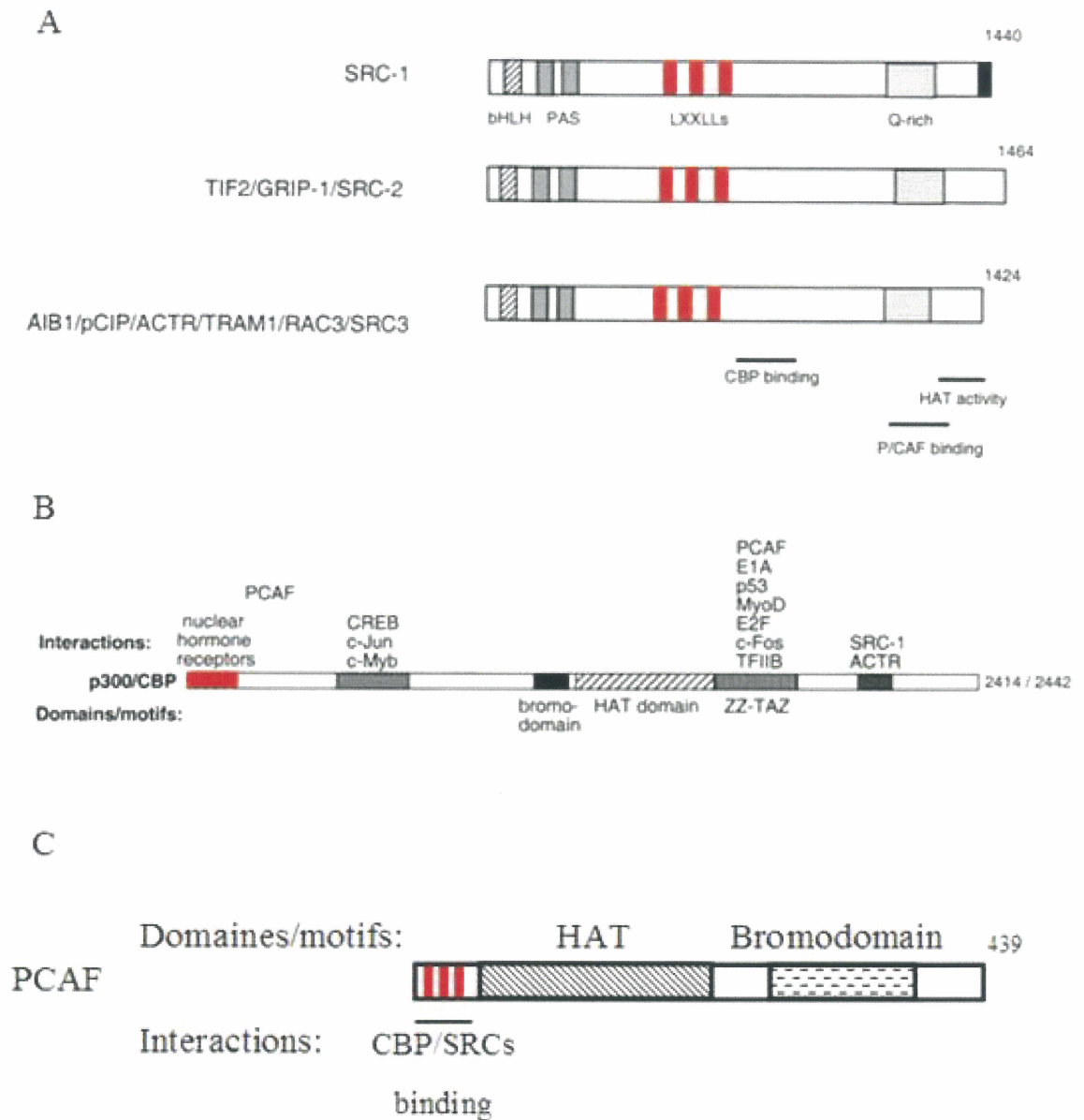


Figure 11. Les co-activateurs des récepteurs nucléaires et leurs domaines d'interaction. Représentation schématique des domaines structuraux des co-activateurs des NRs ainsi que les rôles associés à chacun. Les sites d'interaction des NRs, ou boîtes CoANRs sont identifiées en rouge. L'image de la famille des SRCs provient de (YEN, 2001), de CBP/p300 (MARMORSTEIN, 2001) et celle de PCAF (STERNER et BERGER, 2000).

3.5.2 Les co-activateurs généraux ou intégrateurs

Les deux étapes requises pour l'activation de la transcription par les NRs sont l'ouverture de la chromatine et l'arrimage de la machinerie transcriptionnelle de base au promoteur. Parmi les partenaires d'interactions des TRs on retrouve des co-activateurs généraux impliqués dans l'activation transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription. Ils sont plus volumineux que les SRCs et possèdent une activité HAT intrinsèque supérieure (YANG et al., 1996, OGRYZKO et al., 1996, BANNISTER et KOUZARIDES, 1996, CHEN et al., 1997). On dénombre parmi eux le (*cAMP response element-binding protein*) *CREB binding protein* (CBP) et son homologue p300 (CBP/p300) (CHAKRAVARTI et al., 1996) ainsi que le *CBP/p300 associated factor* (PCAF) (Figure 11B & C) (YANG et al., 1996).

Les co-activateurs généraux sont décrits comme faisant partie de la seconde vague de co-activateurs recrutés aux TRs (LI et al., 2000a, SHARMA et FONDELL, 2002, LIU et al., 2006b). Le recrutement du CBP/p300 est accompli par les TRs et par les membres des SRCs (SMITH et al., 1996, IKEDA et al., 1999, LEE et al., 2003). L'AF-2 est considéré comme un point d'interaction mineur pour CBP/p300, le point de contact majeur se situe plutôt à l'AF-1 des TRs (OBERSTE-BERGHAUS et al., 2000). Tandis que PCAF est recruté par les SRCs et le CBP/p300 (Sternier et Berger, 2000). Le modèle mécanistique actuel propose qu'en présence de T₃, les SRCs se lient au domaine AF-2 et le CBP/p300 est recruté par la suite au niveau du AF-1. Ensuite, le CBP/p300 s'associe aux SRCs (OBERSTE-BERGHAUS et al., 2000). Ce second contact permet, entre autres, de stabiliser les interactions entre les co-activateurs et les TRs (TIAN et al., 2006). Par son activité HAT, CBP/p300 permet l'ouverture de la structure chromatinienne et sert de lien entre les TRs et la machinerie transcriptionnelle de base (Figure 10) (IKEDA et al., 1999, TIAN et al., 2006, GOODMAN et SMOLIK, 2000, pour revue).

3.5.3 Les complexes multi-protéiques médiateurs et l'arrimage de la machinerie transcriptionnelle

D'autres complexes recrutées par les TRs en présence du ligand, comme le *thyroid hormone receptor-associated protein* aussi appelé *vitamin D receptor interacting protein* ou *activator-recruited cofactor* (TRAP/DRIP/ARC) (FONDELL et al., 1996, RACHEZ et al., 1999, ITO et al., 1999) sont impliqués dans le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base (Figure 10) (KOTANI et al., 1998, pour revue). TRAP/DRIP/ARC est recruté par les NRs en présence du ligand au niveau de l'AF-2 (LEE et al., 1999, CAIRA et al., 2000). La liaison aux NRs est orchestrée en grande majorité par la sous-unité TRAP220 (REN et al., 2000).

La machinerie transcriptionnelle de base contient plusieurs complexes protéiques. Ils sont requis afin de débiter et de maintenir la transcription par l'ARN polymérase II. Parmi eux, on note, différents complexes nommés, *basal transcription factors* (TFs) dont : TFIIA, B, D, E, F, H et K (ZAWEL et al., 1993, ALBRIGHT et TJIAN, 2000, pour revue). Le TFIID est aussi appelé *TATA binding protein* (TBP) et il possède plusieurs sous-unités nommées *TBP-associated factors* (TAFs) (LEMON et al., 2001). La liaison des sous-unités de TFIID se produit de manière tardive et correspond généralement à l'initiation de la transcription (SHARMA et FONDELL, 2000).

3.5.4 Complexes ATP-dépendants

Les complexes protéiques BRG1 et SWI/SNF (Figure 10) impliqués dans le mécanisme d'activation transcriptionnelle ATP-dépendant ont d'abord été identifiés chez la levure. Ils n'apportent pas de modification post-traductionnelle aux histones mais provoquent le glissement des nucléosomes sur l'ADN en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP. Ces complexes arrivent à retirer environ 50 paires de base d'une séquence enroulée dans un

nucléosome par dixième de seconde en hydrolysant 10 molécules d'ATP (KASSABOV et al., 2003). Le bout d'ADN retiré est ensuite stabilisé par des interactions avec d'autres protéines du complexe, tout en permettant l'accessibilité à cet ADN. Ce phénomène de glissement des nucléosomes permet l'exposition d'une nouvelle portion de l'ADN et facilite la liaison de la machinerie transcriptionnelle de base. La présence du complexe SWI/SNF est nécessaire afin de promouvoir l'activité transcriptionnelle maximale des NRs (INOUE et al., 2002).

Le complexe SWI/SNF est recruté entre autres par CBP/p300 (HUANG et al., 2003). L'arrimage du complexe SWI/SNF dépend également des modifications post-traductionnelles au niveau des histones (BELOTSEKOVSKAYA et al., 2003) car ses ATPases contiennent un bromodomaine qui s'associe aux résidus Lys acétylés des histones.

3.5.5 Les co-répresseurs

Les principaux co-répresseurs identifiés comme partenaires des TRs sont le *nuclear receptor corepressor* (NCoR) (HORLEIN et al., 1995) et le *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors* (SMRT) qui partagent des domaines fonctionnels semblables et une homologie de séquence de 40% (Figure 12) (CHEN et EVANS, 1995, CHEN et al., 1996). Des études *in vitro* ont démontré que les TRs possèdent un plus haut degré d'affinité pour NCoR que SMRT (CHEN et al., 1995, COHEN et al., 1998). Il existe également d'autres molécules qui peuvent agir comme co-répresseurs pour les TRs dans un contexte précis, soit ; Alien (DRESSEL et al., 1999), Hairless (POTTER et al., 2001), LCoR (FERNANDES et al., 2003), RIP-140 (CAVAILLES et al., 1995) et SUN-CoR (ZAMIR et al., 1997).

Les co-répresseurs reconnaissent les TRs et plusieurs facteurs de transcription *via* leurs boîtes CoRNRs, contenant le motif $(L/V)XX(I/V)$, situées dans leur région carboxy-terminale (Figure 12) (SEOL et al., 1996, ZAMIR et al., 1996, CHEN et EVANS, 1995, NAGY et al.,

1997, JEPSEN et ROSENFELD, 2002, pour revue). L'interaction entre les TRs et NCoR/SMRT a pour fonction de recruter des enzymes possédant une activité HDACs et histones méthylases (Figure 10). Le recrutement des HDACs s'effectue *via* les *repressor domains* (RDs) situés dans leur portion amino-terminale (Figure 12) (HEINZEL et al., 1997, LI et al., 2000b). Il existe plusieurs complexes HDACs qui sont recrutés par NCoR et SMRT. Par contre, des études effectuées avec différents NRs démontrent que l'inhibition transcriptionnelle implique surtout l'HDAC3 (GUENTHER et al., 2000, Li et al., 2000b, ZHANG et al., 2002, LI et al., 2002, ISHIZUKA et LAZAR, 2003). De plus, NCoR et SMRT régulent l'activité enzymatique de l'HDAC3. La présence des *deacetyltransferase activation domains* (DADs) ainsi que des domaines SWI3-ADA2-NCoR-TFIIB (SANT) de NCoR et SMRT sont requis afin que l'HDAC3 atteigne son activité maximale (GUENTHER et al., 2001). La présence de la HDAC3 ainsi que de la *mammalian switch-independent 3 protein* (mSin3) est essentielle à l'inhibition transcriptionnelle des TRs (ISHIZUKA et LAZAR, 2003, YOON et al., 2003).

Les co-répresseurs NCoR et SMRT interagissent différemment avec l'ensemble des isoformes des TRs. La région amino-terminale spécifique de TR β 2 établit des contacts supplémentaires avec SMRT et NCoR au niveau de leurs RDs, et empêche aussi les HDACs d'atteindre leur activité maximale (HOLLENBERG et al., 1996, YANG et al., 1999). Ce phénomène explique en partie que TR β 2 soit moins apte à inhiber la transcription en absence de T₃ au niveau de pTREs (HOLLENBERG et al., 1995b, SJOBERG et VENNSTROM, 1995).

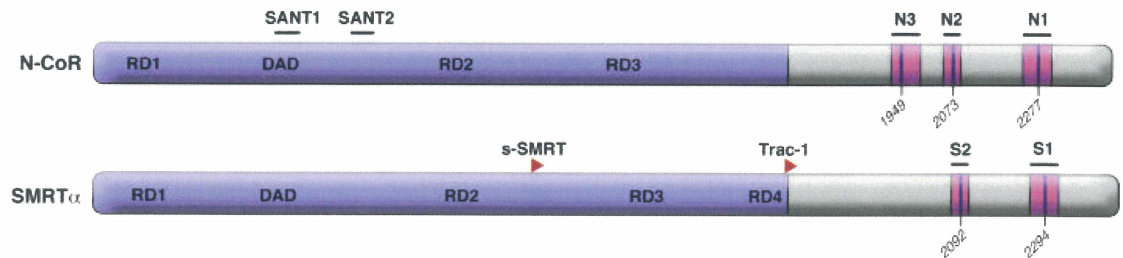


Figure 12. Les co-répresseurs des récepteurs nucléaires et leurs domaines d'interaction. Représentation schématique des domaines structuraux des co-répresseurs des NRs ainsi que les rôles associés à chacun. Les flèches rouges indiquent les fragments correspondant aux variants de SMRT soient : le s-SMRT et le *TR/RAR associated cofactor* (TRAC-1). Les différents domaines contenus dans les co-répresseurs sont : le *deacetylase activation domain* (DAD) et le *SWI3/ADA2/NCoR/TFIIIB-like domain* (SANT1/2), le *repression domain* (RD). Les sites d'interaction des boîtes CoRNR/sites d'interaction des NRs (N pour NCoR et S pour SMRT). L'image provient de (GOODSON et al., 2005)

3.6 Mécanismes de régulation négative

Le mécanisme de répression en présence d'HTs est un domaine de recherche qui a longtemps été quasi exclusivement associé à la régulation des gènes impliqués dans l'axe HHT. Pourtant, différentes études ont démontré que près de 200 ARNm étaient modifiés dépendamment des HTs au niveau hépatique et que parmi eux, 40% de ces transcrits étaient inhibés par les HTs (SEELIG et al., 1981, FENG et al., 2000). Par contre, les mécanismes ainsi que les protéines partenaires qui doivent être présents dans la régulation négative ne sont que partiellement connus, et ce, malgré que l'on croit maintenant qu'il existe un nombre égal de gènes régulés de manière positive et négative *in vivo* (OPPENHEIMER et al., 1987, YEN et al., 2003).

Comme pour les pTREs, des protéines co-régulatrices ainsi que des modifications post-traductionnelles des histones sont impliquées dans la régulation des nTREs (LAZAR, 2003, pour revue). Dans le mécanisme de régulation négative, les TRs s'associent également aux co-répresseurs NCoR et SMRT en absence de T_3 , mais contrairement aux pTREs, l'association des TRs avec les co-répresseurs sur les nTREs se traduit souvent en une augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles. Des études ont même démontré que la surexpression de NCoR et/ou SMRT stimule d'avantage la transcription du promoteur de la thyrolibérine en absence de T_3 (SHIBUSAWA et al., 2003a). L'importance des co-activateurs a aussi été confirmée pour l'inhibition de la transcription en présence de T_3 (ONATE et al., 1995, TAKEUCHI et al., 2002). De plus, les souris *KO* pour SRC-1 sont résistantes au HTs au niveau de l'axe HHT, c'est-à-dire qu'en présence de taux élevés d'HTs circulantes, la sécrétion de thyrolibérine et de thyrostimuline n'est pas inhibée (XU et al., 1998).

Une des hypothèses retenue pour expliquer le phénomène de la régulation négative au niveau des nTREs est un mécanisme de *snatching* (TAGAMI et al., 1997, TAGAMI et al.,

1999). Dans ce modèle, les complexes formés par les TRs avec les co-répresseurs feraient en sorte de séquestrer les HDACs ailleurs qu'aux sites responsables de l'activation de la transcription. Ainsi, l'activité des HDACs n'influencerait pas l'expression génique du promoteur. La région promotrice impliquée dans l'activation de la transcription devient ainsi plus propice à recevoir des HATs, par rapport aux HDACs, qui sont recrutés activement dans des régions situées en amont. La situation inverse se produirait en présence de T₃. Les TRs seraient alors associés à leurs co-activateurs et aux HATs, au niveau de régions qui ne sont pas en lien avec l'activation transcriptionnelle, favorisant la présence des HDACs aux régions chaudes. Outre le rôle majeur joué par le LBD, il a également été démontré que la présence d'un DBD fonctionnel est nécessaire afin de promouvoir la régulation de pTREs ainsi que de l'axe HHT *in vivo* (SHIBUSAWA et al., 2003a et b).

3.7 Autres facteurs impliqués

Les protéines co-régulatrices des TRs sont partagées avec les autres NRs ainsi que d'autres facteurs de transcription. Cette interdépendance envers les co-régulateurs peut entraîner des interférences dans l'action d'autres récepteurs (BARETTINO et al., 1994, ZHANG et al., 1996). Comme il existe un nombre limité de protéines co-régulatrices dans une cellule, il est donc possible de croire que les NRs sont en compétition pour la liaison aux co-régulateurs. Par exemple, en présence de T₃ et de l'acide 9-*cis* rétinolique, les TRs et les RXRs sont en compétition pour la liaison aux co-régulateurs. Ce phénomène a été démontré avec d'autres membres de la superfamille des NRs (BEATO et al., 1995, pour revue). Le résultat serait une diminution de l'activation de la transcription dans les deux cas.

4 La protéine GRP1

Le *general receptor of phosphoinositides-1* (GRP1) ou *ARF nucleotide-binding-site opener 3* (ARNO3) a été découvert lors d'expériences dont le but était d'identifier de nouvelles protéines liant les phosphoinositides (FRANCO et al., 1998). GRP1 a pour effet de moduler l'activité de certains *ADP-ribosylation factor* (ARFs) par la catalyse de l'échange nucléotidique du GDP par le GTP. La localisation de GRP1 est principalement cytoplasmique, mais on en retrouve aussi au noyau (CLODI et al., 1998, VENKATESWARLU et al., 1998, LANGILLE et al., 1999, OATEY et al., 1999). GRP1 est recruté à la membrane plasmique suite à une stimulation de la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) par des facteurs de croissance comme l'insuline (VENKATESWARLU et al., 1998, CLODI et al., 1998, OATEY et al., 1999).

4.1 La structure et le profil d'expression de GRP1

La protéine GRP1 est membre de la famille des cytohésines et possède trois domaines : un domaine hélicoïdal (ou *coil-coiled*), le domaine *Sec7* et le *pleckstrin homology domain* (PH) (Figure 13). Le domaine *Sec7* localisé dans la région centrale de GRP1 est commun à la cytohésine-1. Il est responsable de la liaison de GRP1 aux ARFs ainsi que de l'échange nucléotidique. La portion carboxy-terminale de GRP1 contient un domaine PH suivi d'une séquence d'acides aminés polybasiques. Le domaine PH est responsable de la reconnaissance par GRP1 des phosphoinositides de la membrane (VENKATESWARLU et al., 1998) : il possède une très forte affinité pour le phosphoinositide-3,4,5-triphosphate et une affinité moins importante pour le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (VENKATESWARLU et al., 1998, KLARLUND et al., 2000). On ignore le rôle joué par les acides aminés polybasiques de GRP1, mais on croit qu'ils jouent un rôle dans la fonction du domaine PH.

GRP1 est exprimé de manière quasi ubiquitaire (FRANCO et al., 1998). Des niveaux plus faibles d'expression sont observés au niveau hépatique, du thymus et des lymphocytes circulants (KORTHÄUER et al., 2000). GRP1 est également exprimé dans la lignée pré-adipocytaire murin 3T3-L1 (CLODI et al., 1998).

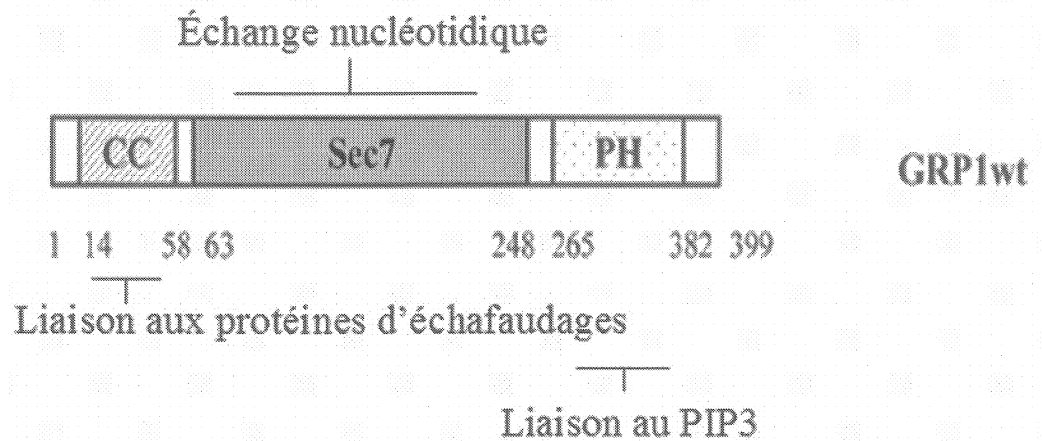


Figure 13: Les domaine de GRP1. Représentation schématique des domaines structuraux de GRP1 ainsi que les rôles associés à chacun. La protéine GRP1 contient un domaine *coil-coiled* (CC) suivi d'un domaine Sec7 et un domaine *pleckstrin homology domain* (PH). L'image a été modifiée à partir de (POIRIER et al., 2005).

4.2 Les effets et partenaires de GRP1

Le rôle le mieux connu de GRP1 est celui de facteur d'échange nucléotidique pour la protéine ARF. Les ARFs sont de petites protéines G monomériques qui appartiennent à la famille Ras (ENOMOTO et GILL, 1980, KAHN et GILMAN, 1984). Il existe cinq protéines ARFs chez l'homme qui sont classées en trois groupes selon leur homologie de séquence et de structure. La classe I contient les ARFs 1 et 3. Elles sont impliquées dans les voies de sécrétion ainsi que dans l'assemblage du manteau des vésicules (ROTH et al., 1999, pour revue). La classe II contient ARF4 et ARF5 dont on ignore présentement la fonction. La classe III possède un seul membre, ARF6, qui est impliqué dans l'endocytose ainsi que dans le recyclage membranaire et dans l'assemblage du cytosquelette d'actine (COTTON et al., 2006).

Pour passer d'un état inactif lié au GDP, à un état actif lié au GTP, les ARFs ont besoin de protéines accessoires. Il existe deux familles de protéines qui stimulent l'échange et l'activité GTPasique des ARFs soit : les cytohésines et les centaurines (HAWADLE et al., 2002, pour revue). GRP1 possède 80% d'homologie avec les cytohésines et il favorise l'échange nucléotidique de ARF1 et ARF5 et de ARF6 lors d'essais *in vitro* (FRANCO et al., 1998, KLARLUND et al., 1998). La surexpression de GRP1 cause le désassemblage de l'appareil de Golgi et de ses protéines résidentes; ces effets impliquent les ARF1 et ARF5. Au niveau cellulaire, GRP1 se co-localise avec ARF6 à la membrane cytoplasmique suite à l'activation de la voie de l'IP3K (LANGILLE et al., 1999).

GRP1 possède deux protéines d'échafaudage soit : *GRP1-associated scaffold protein* (GRASP) et *GRP1 signaling partner 1* (GRSP1). L'expression de GRASP est induite par l'acide rétinolique et on retrouve de hauts niveaux de GRASP au cerveau (NEVRIVY et al., 2000). Le rôle de GRASP serait de cibler et ancrer GRP1, au niveau de la membrane cytoplasmique, par

son interaction avec le domaine CC. GRSP1, est une protéine qui se co-localise avec GRP1, suite à l'activation de la voie de signalisation de l'insuline (KLARLUND et al., 2001).

5 La protéine RanBPM

Une forme tronquée de la protéine *Ran binding protein in microtubules* (RanBPM), RanBPM55 (pour son poids moléculaire de 55-kDa), fut d'abord identifiée suite à un criblage double-hybride chez la levure en utilisant la protéine Ran comme appât (Figure 14) (NAKAMURA et al., 1998). Des études de surexpression menées avec RanBPM55 ont démontré que la protéine était localisée dans les centrosomes et interagissait de manière spécifique avec le Ran-GTP. La surexpression de la protéine RanBPM55 entraînait la production d'une localisation sous forme de points ectopiques qui étaient co-localisés avec la tubuline- γ .

Par la suite, la protéine complète a été découverte RanBP9/RanBPM90 (pour son poids moléculaire de 90-kDa) (Figure 14) (NISHITANI et al., 2001). La protéine complète interagit très faiblement avec le Ran-GTP. De plus, la localisation cellulaire de la protéine complète a été étudiée et aucune fluorescence dans le centrosome ni de co-localisation avec la tubuline- γ n'ont été observées. La fluorescence spécifique à RanBPM est localisée aux niveaux de l'espace péri-nucléaire, du noyau et du cytoplasme. La fluorescence retrouvée au noyau est jugée plus importante que celle retrouvée dans le cytoplasme ou dans l'espace péri-nucléaire (NISHITANI et al., 2001).

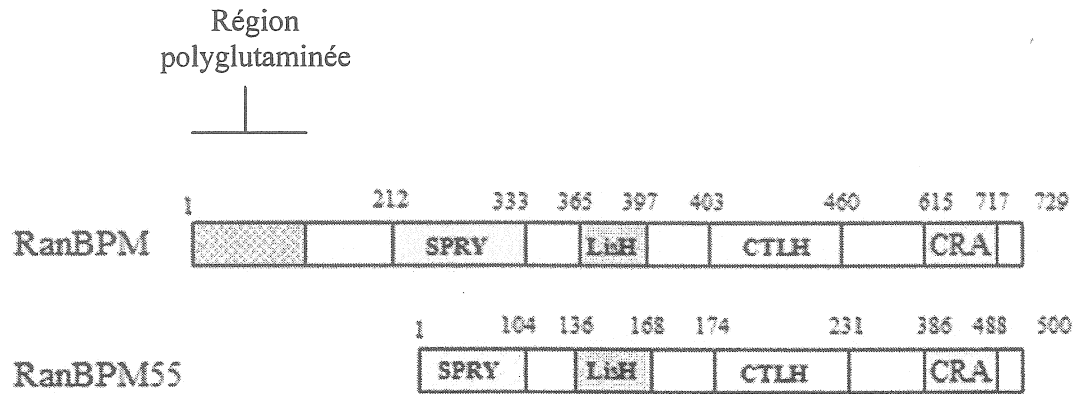


Figure 14 : Les domaines de RanBPM et RanBPM55. Représentation schématique des domaines structuraux de RanBPM et RanBPM55. Au niveau de l'amino-terminus de RanBPM on retrouve une région polyglutaminée (aa 5-131), ensuite, les domaines SPRY, LisH, et les motifs CTLH et CRA. L'image a été modifiée à partir de (POIRIER et al., 2006b).

Tous les autres *Ran binding proteins* (RanBP) identifiés à ce jour possèdent des caractéristiques différentes de celles de RanBPM. Les RanBPs ont la particularité de contenir un ou plusieurs domaines RanBP1 qui possèdent une homologie au domaine PH. La localisation des RanBPs est principalement cytoplasmique et on leur associe des rôles dans la régulation du transport nucléocytoplasmique ainsi que dans les fonctions du centrosome, en lien avec la protéine Ran (KUTAY et al., 2000, GUARGUAGLINI et al., 2000).

5.1 La structure et le profil d'expression de RanBPM

La protéine RanBPM contient plusieurs domaines qui sont impliqués dans les interactions protéine-protéine. En amino-terminal on retrouve la région polyglutaminée, qui correspond à une longue chaîne de prolines et d'alanines suivie de plusieurs résidus glutamine (Figure 14). Le domaine *Dictyostelium discoideum kiansse splA and mammalian Ca²⁺-release channels ryanodine receptors* (SPRY) (PONTING et al., 1997) possède une nouvelle nomenclature. On le qualifie maintenant de domaine BR30.2 (WOO et al., 2006). Ce domaine a été découvert dans une protéine qui est codée par un exon au niveau du *human class I major histocompatibility complex region* (VERNET et al., 1993). Les domaines SPRY et BR30.2 sont très homologues. Le domaine SPRY est plus court en son amino-terminal que le BR30.2 si bien que le domaine SPRY apparaît donc maintenant comme un sous-domaine du BR30.2. L'analyse de la séquence de RanBPM à l'aide des moteurs d'analyses Pfam (BATEMAN et al., 2004) et SMRT (SCHULTZ et al., 1998) confirme la présence d'un domaine BR30.2 (WOO et al., 2006).

RanBPM contient un domaine *Lis1-homologous* (LisH) associé au motif *C-Terminal to LisH* (CTLH) ainsi qu'un motif CT11-RanBPM (CRA). Ces domaines sont impliqués dans des interactions protéine-protéine (PONTING et al., 1997, WEBER et VINCENZ, 2001, Gerlitz et al., 2005, YUAN et al., 2006, MENON et al., 2004). Leurs fonctions et partenaires sont peu connus.

RanBPM est une protéine ubiquitaire. Par contre, on observe des variations dans ses niveaux d'expression dans certains tissus. La protéine RanBPM semble fortement exprimée dans les lignées de prostate et dans les testicules (RAO et al., 2002) ainsi que dans plusieurs lignées de cancer du sein (EMBERLEY et al., 2002). On en retrouve peu dans les tissus musculaires (DENTI et al., 2004). On détecte également la présence de RanBPM au cerveau (MENON et al., 2004, DENTI et al., 2004) et dans les neurones progéniteurs (BRUNKHORST et al., 2005).

5.2 Les partenaires d'interaction de RanBPM

La majorité des articles concernant RanBPM débutent par une expérience de double-hybride chez la levure. Donc, bien que la revue de la littérature concernant RanBPM contienne 38 publications à ce jour, les rôles et effets de RanBPM au niveau physiologique demeurent obscurs. Les publications présentent en grande majorité, la caractérisation d'une nouvelle interaction à laquelle on ajoute quelques expériences de surexpression de RanBPM ou de formes tronquées de la protéine dans des lignées cellulaires. De plus, aucune équipe (mis à part celle impliquée dans la découverte de RanBPM) n'a publié plus d'un article faisant suite à la découverte de RanBPM comme nouveau partenaire d'interaction (UMEDA et al., 2003, YUAN et al., 2006). Ce que l'on peut dire c'est que RanBPM est probablement une protéine multifonctionnelle. L'ensemble des partenaires de RanBPM humain et murin, sera présenté à l'aide de tableaux. Ils résumeront la littérature concernant les interactions entre RanBPM, les récepteurs transmembranaires et leurs protéines accessoires (Tableau 2), les facteurs de transcription et leurs co-régulateurs (Tableau 3), les autres protéines et enzymes partenaires (Tableau 4). Il est à noter que la protéine RanBPM a également été isolée comme partenaire de différentes protéines exprimées au niveau du virus de l'hépatite B (LIN et al., 2006) et chez la plante aquatique *Marsilea vestita* (KLINK et WOLNIAK, 2003). Les découvertes en lien avec mon projet de doctorat seront discutées de manière plus détaillée.

5.2.1 Les récepteurs transmembranaires et leurs protéines d'échafaudage

RanBPM interagit au niveau du domaine cytoplasmique de plusieurs récepteurs transmembranaires (Tableau 2). Parmi eux on remarque que RanBPM interagit avec de nombreux récepteurs à protéine tyrosine kinase (RPTK) qui utilisent la voie de signalisation des MAPKs (WANG et al., 2002, YUAN et al., 2006). De plus, RanBPM interagit avec des protéines impliquées dans la voie des MAPKs : Sos (WANG et al., 2002), Raf (JOHNSON et al., 2006). Plusieurs équipes ont également identifié RanBPM comme partenaire de molécules d'adhésion, comme les intégrines (DENTI et al., 2004, CHENG et al., 2005). En se basant seulement sur les fonctions des récepteurs transmembranaires et molécules d'adhésion partenaires de RanBPM, on pourrait croire que RanBPM est impliqué dans plusieurs processus qui touchent la migration cellulaire de différents types cellulaires, dont les neurones et les lymphocytes (WANG et al., 2002, DENTI et al., 2004, CHENG et al., 2005, YUAN et al., 2006) ainsi que la croissance cellulaire (CHENG et al., 2005, HAFIZI et al., 2006, JOHNSON et al., 2006, TOGASHI et al., 2006). Les fonctions de RanBPM au niveau des voies de signalisation et de récepteurs transmembranaires pourraient également influencer les actions non génomiques des HTs qui sont décrites à la section 3.1.

Tableau 2. Les récepteurs transmembranaires et leurs protéines d'échafaudage partenaires de RanBPM

Protéines partenaires de RanBPM	Fonction	Caractéristiques de l'interaction avec RanBPM	Localisation de RanBPM	Effets de la surexpression de RanBPM	Référence
MET RPTK & <i>Son of sevenless</i> (Sos) Protéine d'échafaudage.	Le HGF, son ligand, stimule la voie des MAPKs et favorise la migration cellulaire. Stimule l'échange du -GDP au -GTP de la protéine G monomérique Ras.	RanBPM interagit au niveau du site d'encharge des protéines adaptatrices du récepteur MET. Le domaine SPRY de RanBPM interagit avec Sos.	RanBPM exogène se localise à la membrane cytoplasmique. -	La surexpression de RanBPM stimule la réponse du HGF. Elle favorise la migration cellulaire ainsi que l'activité transcriptionnelle au niveau d'un SRE-Luc. -	WANG, 2003
p75NTR RPTK	L'activation du p75NTR par une neurotrophine en absence du Trk spécifique à cette neurotrophine induit l'apoptose.	-	-	-	BAI, 2003
<i>Lymphocytes function-associated antigen-1</i> (LFA-1) Récepteur transmembranaire hétérodimérique à sous-unités α_L et β_2	Récepteur d'adhésion des cellules lymphocytaires. Il influence la mobilité, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.	RanBPM interagit avec le domaine cytoplasmique de la sous-unité β_2 .	RanBPM endogène est localisé à la membrane cytoplasmique.	RanBPM est phosphorylé sur des résidus sérines par LFA-1 lors de l'induction d'un stress cellulaire. La surexpression de RanBPM stimule la voie de signalisation de LFA-1 au niveau de la régulation du promoteur AP-1.	DENTI, 2004
L1 Molécule d'adhésion des neurones	Elle favorise la croissance et la migration des neurones.	La portion amino-terminale (aa 117-354, contenant le domaine SPRY) interagit avec le domaine cytoplasmique de L1.	La surexpression de RanBPM (aa 117-354) co-localise avec L1 au niveau de la membrane cytoplasmique.	La surexpression de RanBPM (aa 117-354) inhibe l'activation des kinases et cause une diminution de la croissance et des branchements des neurites en lien avec L1.	CHENG, 2005

Tableau 2. (suite) Les récepteurs transmembranaires et leurs protéines d'échafaudage partenaires de RanBPM (suite)

Protéines partenaires de RanBPM	Fonction	Caractéristiques de l'interaction avec RanBPM	Localisation de RanBPM	Effets de la surexpression de RanBPM	Référence
Raf Kinase	Protéine responsable de l'activation de MEK1/2 par sa phosphorylation.	-	-	La surexpression de RanBPM et de Raf inhibe la transcription du gène codant de la <i>MyoD-directed</i> .	JOHNSON, 2006
Axl et Sky Sous-famille des RPTKs	Le domaine extracellulaire de Axl/Sky est homologue à celui de L1. Ils sont impliqués dans la croissance et la migration cellulaire.	RanBPM est un partenaire constitutif du récepteur Axl. Une construction de RanBPM sans le domaine SPRY et LisH n'interagit pas avec Axl.	-	-	HAFIZI, 2006
<i>Tropomyosin-related kinase</i> (TrkA) Récepteur des neurotrophines	Son activation stimule la voie des MAPKs, la PI3K ainsi que la PLC- γ par Sema3A.	Le domaine SPRY de RanBPM interagit avec le domaine cytoplasmique de TrkA.	-	La surexpression de RanBPM inhibe l'activité transcriptionnelle induite par le NGF.	YUAN, 2006
Plexine-A (PlexA) Récepteur de la sémaphorine3A (Sema3A)	Son activation cause la réduction des ramifications des cellules non-neurales et inhibe la croissance axonale des neurones.	Une portion de la région amino-terminale de RanBPM (aa 207-492, qui ne contient pas la région polyG, ni le domaine SPRY complet) interagit avec le domaine cytoplasmique de PlexA.	-	La surexpression de RanBPM et de PlexA induit la contraction des axones et inhibe leur croissance en absence de Sema3A. Par contre, une construction de RanBPM (aa 1-333) stimule la croissance axonale de manière indépendante à Sema3A.	TOGASHI, 2006
Decine-1 isoforme E (Dec-1E) Récepteur transmembranaire de type II à la lectine	On en sait peu sur sa fonction.	Une portion de l'aminoterminus de RanBPM (aa 133-402, contenant le domaine SPRY) est suffisante pour l'interaction avec le <i>C-type lectin-like domain</i> de Dec-1E	RanBPM-pEGFP surexprimé est co-localisé avec le Dec-1E à la membrane cytoplasmique.	-	XIE, 2006

5.2.2 Les facteurs de transcription et les co-régulateurs

RanBPM a été identifié comme étant un partenaire de plusieurs facteurs de transcription comme p73 α (KRAMER et al., 2005) ainsi qu'un membre de la superfamille des NRs, le AR (Tableau 3) (RAO et al., 2002). En plus de stimuler l'activité transcriptionnelle des ARs en présence de l'agoniste R1881, RanBPM agit également comme un co-activateur des GRs en présence de dexaméthasone. Par contre, RanBPM n'a aucun effet sur l'activation dépendante du ligand des récepteurs de l'estrogène (ER α/β) (RAO et al., 2002).

RanBPM interagit également avec différents co-régulateurs dont plusieurs sérine/thréonine kinases nucléaires : Mirk/Dirk1B (ZOU et al., 2003), HIPK2 (WANG et al., 2002). Une équipe a aussi démontré que RanBPM est un partenaire d'interaction de TAF4, une sous-unité du complexe TFIID (BRUNKHORST et al., 2005). Ceci est intéressant pour notre domaine d'étude quand on considère que TFIID est recruté au niveau de plusieurs promoteurs où l'on retrouve des HREs et que sa présence est importante pour l'expression génique régulée par le RAR, le TR et le VDR (voir section 3.5.3) (MENDUS et al., 1997, FELINSKI et QUINN, 2001, HERMANSON et al., 2002, pour revue).

Tableau 3. Les facteurs de transcription et les co-régulateurs partenaires de RanBPM

Protéines partenaires de RanBPM	Fonction	Caractéristiques de l'interaction avec RanBPM	Localisation de RanBPM	Effets de RanBPM en surexpression	Référence
<i>Homeo-domain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)</i> Sérine/thréonine kinase nucléaire de la même famille que Mirk/Dyrk1B	Co-répresseur des facteurs de transcription contenant des homéodomaines.	-	RanBPM55 exogène est co-localisé au noyau avec HIPK2.	-	WANG, 2002
AR et GR Membres de la superfamille des récepteurs nucléaires	Facteur de transcription dont l'activité est dépendante de la présence du ligand (androgènes ou glucocorticoïdes, respectivement).	La région amino-terminale et le DBD du AR interagissent avec le domaine SPRY de RanBPM. La présence d'un agoniste des ARs favorise la liaison de RanBPM.	-	RanBPM et surtout une construction de RanBPM (aa 148-729, sans la région polyglutaminée) stimule l'activité transcriptionnelle des ARs et des GRs. Aucun effet sur les ERs.	RAO, 2002
<i>Minibrain-related kinase (Mirk)/Dyrk1B</i> Sérine/thréonine kinase nucléaire de la même famille que HIPK2	Co-activateur des facteurs de transcription. Ex : CREB	Une portion de la région carboxy-terminale de RanBPM (aa 480-520) interagit avec une région commune à Mirk/Dyrk1A et à HIPK2.	-	La co-transfection de RanBPM et Mirk diminue l'activité transcriptionnelle du SRE.	ZOU, 2003

Tableau 3. (suite) Les facteurs de transcription et les co-régulateurs partenaires de RanBPM (suite)

Protéines partenaires de RanBPM	Fonction	Caractéristiques de l'interaction avec RanBPM	Localisation de RanBPM	Effets de RanBPM en surexpression	Référence
<i>Cyclin-dependent kinase 11</i> ^{P46} (CDK11 ^{P46})	Kinase qui participe à la régulation transcriptionnelle de protéines impliquées dans le cycle cellulaire/apoptose.	Le domaine SPRY de RanBPM interagit une portion de CDK11 ^{P46} qui contient le domaine catalytique et le site de liaison à l'ATP.	RanBPM exogène (aa 60-729) se localise au noyau et dans la région péri-nuléaire.	CDK11 ^{P46} phosphoryle RanBPM.	MIKOLAJCZYK, 2003
p73 α Facteur de transcription <i>p53-related</i>	Facteur de transcription qui lors de dommages à l'ADN est stabilisé pour ensuite jouer un rôle dans la balance de l'arrêt du cycle cellulaire/ou l'apoptose.	RanBPM (aa 112-408 contenant les domaines SPRY et LisH) interagit dans la région carboxy-terminale de p73 α . RanBPM n'interagit pas avec p53.	RanBPM exogène est principalement localisé au cytoplasme. La co-transfection de p73 α et RanBPM augmente la localisation nucléaire de RanBPM.	La surexpression de RanBPM inhibe l'ubiquitination de p73 α et stimule son activité transcriptionnelle. Ceci a pour effet d'inhiber la croissance cellulaire et de favoriser l'apoptose.	KRAMER, 2005
TAF4 Une sous-unité de TFIID	TAF4 est essentielle à l'activité transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription Ex. CREB, RAR, TR.	RanBPM (aa 1-388, contenant la région polyglutaminée et le domaine SPRY ainsi qu'une portion du LisH) interagit avec la région carboxy-terminale de TAF4 responsable de la stimulation de l'activité transcriptionnelle de TFIID.	RanBPM endogène se localise au noyau aux niveaux des mêmes populations de neurones que TAF4.	La co-transfection de RanBPM (aa 60-729) et TAF4 provoque l'augmentation du nombre de neurites primaires.	BRUNKHORST, 2005

5.2.3 Les autres protéines et enzymes partenaires

La protéine RanBPM a été isolée comme étant un nouveau partenaire d'interaction de certaines enzymes. La localisation cellulaire des protéines partenaires de RanBPM peut être membranaire (LUTZ et al., 2003, WU et al., 2006, KABIL et al., 2006), cytoplasmique (EMBERLEY et al., 2002, MENON et al., 2004, JANG et al., 2004) ou nucléaire (GREENBAUM et al., 2003, SHIBATA et al., 2004). En lien avec mon projet on note que RanBPM interagit avec une déubiquitinase à substrat spécifique, USP11 (IDEGUCHI et al., 2002). Les déubiquitinases sont des protéases spécifiques à l'ubiquitine (CIECHANOVER, 1998, pour revue). L'interaction entre RanBPM et USP11 a un effet protecteur sur la dégradation de RanBPM par le protéasome (IDEGUCHI et al., 2002). De plus, l'interaction entre le facteur de transcription p73 α et RanBPM inhibe la dégradation de p73 α et stimule ainsi son activité transcriptionnelle (KRAMER et al., 2005).

Tableau 4. Les enzymes et autres protéines partenaires des RanBPM

Protéines partenaires de RanBPM	Fonctions	Caractéristiques de l'interaction avec RanBPM	Localisation de RanBPM	Effets de RanBPM en surexpression	Référence
<i>Ubiquitin-specific protease</i> (USP11) Déubiquitinase à substrat(s) spécifique(s)	Membre de la famille des ubiquitines protéases.	Le domaine SPRY de RanBPM est suffisant à l'interaction.	-	RanBPM est ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. RanBPM est déubiquitiné <i>in vitro</i> par USP11.	IDEGUCHI, 2002
Psoriasine Membre de la famille des protéines S100	Protéine liant le calcium, impliquée dans la croissance, le chemotactisme, l'adhésion cellulaire et le cytosquelette d'actine. Fortement exprimée dans les cancers du sein pré-invasifs.	RanBPM55 interagit avec la psoriasine.	-	L'expression de l'ARNm de RanBPM est plus importante au niveau des tumeurs et des carcinomes invasifs du sein (humain) que dans les tissus normaux.	EMBERLEY, 2002
<i>Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1</i> (CD39) Ecto-nucléosidase (NTPDase)	Une NTPDase qui influence l'activation du récepteur P2 est lui-même responsable de la régulation de l'adhésion des cellules vasculaires et immunes dans les processus d'inflammation.	Le domaine SPRY de RanBPM est suffisant à l'interaction.	RanBPM endogène est co-localisé avec CD39 au niveau de la membrane cytoplasmique des lymphocytes-B humains.	La co-transfection de RanBPM et de CD39 inhibe l'activité NTPDase de CD39.	WU, 2006
<i>Two hybrid associated protein No. 1</i> (Twa1) et l'homologue humain de la muskeline murine (hMuskelin)	La hMuskelin est importante dans l'adhésion des cellules aux matrices. Twa1 et la Muskeline possèdent des domaines LisH-CTLH.	-	RanBPM exogène se localise au noyau.	La surexpression de la hMuskeline provoque la translocation de RanBPM et Twa1 dans le cytoplasme.	UMEDA, 2003
<i>Calbindin D_{28K}</i>	Module des canaux calciques et l'activité des neurones.	Le peptide LASIKNR qui correspond à une portion en 5' du domaine CTLH à plusieurs points de contacts sur la <i>calbindin D_{28K}</i> .	-	-	LUTZ, 2003

Tableau 4. (suite) Les enzymes et autres protéines partenaires des RanBPM (suite)

Protéines partenaires de RanBPM	Fonctions	Caractéristiques de l'interaction avec RanBPM	Localisation de RanBPM	Effets de RanBPM en surexpression	Référence
<i>Prophobilinogen deaminase</i> (PBGD)	Une enzyme limitante dans la biosynthèse de l'hème. Les niveaux d'expression de cette protéine sont élevés dans plusieurs tumeurs humaines.	L'interaction entre PBGD et RanBPM ne demande pas la présence du domaine CTLH.	La PBGD et RanBPM sont principalement retrouvés au noyau.	-	GREENBAUM, 2003
<i>Fragile X mental retardation protein</i> (FMRP)	Son absence cause le syndrome du fragile X. Le FMRP établit un réseau complexe d'interactions avec l'ARNm.	La région carboxy-terminale de FMRP (hautement chargée et où la liaison à l'ARN s'effectue) interagit avec domaine CRA de RanBPM.	RanBPM endogène est retrouvé au niveau du cortex cérébral et dans les cellules de Purkinje.	-	MENON, 2004
<i>Polo-like kinase</i> (Plk) Une Sérine/thréonine kinase	Rôle dans la progression de la phase mitotique.	RanBPM55 interagit avec les boîtes polo 1 et 2 situées en carboxy-terminal de la Plk. La protéine Ran est aussi un partenaire de la Plk.	RanBPM55 exogène est co-localisé avec la Plk dans les centrosomes.	RanBPM55 mais pas Ran est phosphorylé par la Plk <i>in vitro</i> .	JANG, 2004
<i>Sperm membrane protein</i> (hSMP-1)	Son rôle est peu connu.	L'interaction avec RanBPM55 se fait <i>via</i> la région carboxy-terminale de hSMP-1.	RanBPM55 exogène est co-localisé avec hSMP-1 dans la région péri-nucléaire et forme des <i>speckles</i>	-	TANG, 2004
<i>Germline specific RNA helise</i> , le produit de <i>mouse vasa homolog</i> (Mvh) Hélicase ATP-dépendante	Elle est impliquée dans le développement des cellules germinales mâles.	RanBPM murin (aa 72-653) interagit avec la région amino-terminale de Mvh.	RanBPM murin endogène est co-localisé avec le Mvh dans la région péri-nucléaire et ils sont associés aux corps chromatoides dans les testicules.	-	SHIBATA, 2004
<i>Cytathionine β-synthase</i> (CBS)	CBS est impliqué dans la première étape de transulfuration des métabolites toxiques.	RanBPM possède plusieurs sites d'interaction avec CBS.	-	-	KABIL, 2006

Partie II

OBJECTIFS DE RECHERCHE

6 Objectifs de recherche

L'importance des glandes endocrines n'est plus à démontrer, les recherches de par le monde ne cessent de nous en faire découvrir les aspects importants. La présente étude veut s'inscrire dans cette démarche. L'objectif général de recherche du laboratoire est de mieux comprendre les mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes. Dans cette optique, nous tentons d'identifier et de caractériser des nouveaux partenaires des TRs.

Mon projet de recherche porte sur la caractérisation de l'interaction entre GRP1 et RanBPM et les TRs et sur l'étude de leurs fonctions et mécanismes d'action.

6.1 Résumés des travaux antérieurs et problématiques

C'est l'étudiante à la maîtrise, Geneviève Hamann qui a débuté les études concernant la protéine GRP1. Elle a étudié son expression (*Northern blot et dot blot*) en plus d'avoir effectué la caractérisation des domaines de GRP1 requis pour l'interaction avec les TRs en utilisant des essais de précipitation à la GST. Elle a conclu ses études en effectuant des essais transcriptionnels sur des pTREs et nTREs couplés à un gène rapporteur à la luciférase.

Ma participation dans le projet concernant la protéine GRP1 a débuté lors de la caractérisation finale de l'interaction. J'ai effectué les clonages des constructions DBDonly-GST et ØDBD-GST ainsi que les essais de précipitation à la GST qui ont permis de démontrer hors de tout doute que le DBD était suffisant et essentiel à l'interaction entre les TRs et GRP1. Par la suite, j'ai confirmé la présence de GRP1 au niveau nucléaire, des études de fractionnement cellulaire et, par buvardage de type Western. J'ai aussi démontré que l'interaction entre les TRs et GRP1 dans des cellules non-transfectées était présente au niveau du cytoplasme et du noyau. Ensuite, j'ai caractérisé le mécanisme d'action de GRP1 par des essais de précipitation à la GST

qui ont démontré que GRP1 n'influçait pas la formation des dimères TR/TR ou TR/RXR. J'ai également effectué la mise au point requise afin de prouver *in vitro* que GRP1 agissait comme un compétiteur du TRE DR+4 pour la liaison des TRs. Cette technique d'essais de précipitation à la GST modifiée n'avait jamais été effectuée dans le laboratoire. Par des essais de précipitation à la GST, nous avons aussi déterminé que GRP1 était un partenaire des PPARs. J'ai activement participé aux tâches entourant la publication de l'article GRP1 tant au niveau de l'analyse des données qu'à l'écriture avec le Dr Langlois ainsi qu'à l'élaboration des figures de même qu'aux corrections.

J'ai entamé les études entourant la protéine RanBPM avec l'aide de Dr Liette Laflamme. J'ai étudié les domaines impliqués dans l'interaction entre les TRs et RanBPM ainsi que l'effet du ligand (*in vitro* et dans des extraits cellulaires). Afin de confirmer l'interaction entre les TRs et RanBPM j'ai effectué des co-immunoprécipitations dans des cellules non-transfectées. Suite à la confirmation de l'interaction, j'ai mené des essais transcriptionnels avec des pTREs et des nTREs couplés au gène rapporteur luciférase. J'ai réalisé l'analyse des résultats et l'écriture des manuscrits ainsi que la composition des figures des articles concernant RanBPM. Les travaux visant à déterminer le rôle de RanBPM dans la régulation de l'axe HHT ont été réalisés avec l'aide de Mylène Brunelle lors d'un stage d'été qu'elle effectuait sous ma supervision. Par des essais de précipitation à la GST, nous avons également déterminé que RanBPM était un partenaire des PPARs.

J'ai également travaillé à la continuation des expériences qui tentent de préciser le mécanisme d'action de RanBPM comme un co-activateur classique. Tout d'abord en démontrant que RanBPM est un partenaire des SRCs mais pas de mCBP en essai de précipitation à la GST. Par la suite, j'ai étudié l'effet de la co-transfection de RanBPM et des co-activateurs classiques en essais transcriptionnels couplés à un gène rapporteur.

Partie III

ARTICLES

Article #1

GENERAL RECEPTOR FOR PHOSPHOINOSITIDES 1, A NOVEL REPRESSOR OF THYROID HORMONE RECEPTOR ACTION THAT PREVENTS DEOXYRIBONUCLEIC ACID BINDING

Poirier MB, Hamann G, Domingue ME, Roy M, Bardati T, Langlois MF. Mol Endocrinol. 2005 Aug;19(8):1991-2005. (Facteur d'impact (2005): 5.708)

SUMMARY

Thyroid hormone receptors (TR) bind to response elements (TREs) located in the promoter region of target genes and modulate their transcription. The effects of TRs require the presence of coregulators that act as adaptor molecules between TRs and complexes that are involved in chromatin remodeling or that directly contact the basal transcription machinery. Using the yeast two-hybrid system, we identified a new interacting partner for TRs: GRP1 (general receptor for phosphoinositides-1), a nucleotide exchange factor, that had never been shown to interact with nuclear receptors. We reconfirmed the interaction between TRs and GRP1 in yeast and GST pull-down assays, and determined the areas of TRs and GRP1 involved in the interaction. Co-immunoprecipitation studies demonstrated that the interaction between GRP1 and TRs takes place in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. To assess functional consequences of the interaction, we used transient transfection of CV-1 cells with TR and GRP1 expression vectors and luciferase reporter genes. On positive TREs (TRET_K, LYSX2, DR+4), GRP1 decreased activation by 45-60%. On the negative TREs (TRH, TSH α) it increased repression by blunting the activation in the absence of T₃, except for TR β 2 that was not affected. Using EMSA, we have determined that addition of GRP1 diminishes the formation of TR/TR homodimers and TR/RXR heterodimers on TREs which could explain the effect of GRP1 on transcription. Furthermore, protein interaction assays using increasing concentrations of double-stranded TREs show a dose-dependent decrease of the interaction between GRP1 and TRs. The homo/heterodimers formed by TRs and RXR α were not influenced by the presence of GRP1, also suggesting that GRP1 rather interferes directly with DNA-binding. Taken together, these data provide evidence that GRP1 is a new corepressor for TRs, which modulates both positive and negative regulation by T₃ by decreasing TR-complex formation on TREs.

INTRODUCTION

Thyroid hormones (THs) produce important physiological effects in development, growth and homeostasis. Cellular effects of THs are principally mediated by the binding of T_3 to thyroid hormone receptors (TRs) which are part of the nuclear receptor superfamily of ligand-dependent transcription factors (1). It is well described that most effects of THs are due to the regulation of target gene expression by thyroid hormone receptors. In addition, there is evidence that thyroid hormones also have rapid non-genomic pathways involving cytoskeletal remodelling, mitochondrial respiration, and several signalization pathways (2).

In vertebrates, two genes code for TRs: *c-erbA α* and *c-erbA β* , from which three active isoforms are derived: TR α 1, TR β 1 and TR β 2. TRs share similar domain organization than other nuclear receptors (Fig. 1A). The N-terminal transactivation region (domain A/B) is the least conserved between TR isoforms and responsible for some of their functional differences (3, 4). The DNA-binding domain (DBD, domain C) of TRs is composed of two zinc fingers and is mainly responsible of the recognition of the thyroid hormone response element (TRE), a consensus DNA sequence located in the promoter region of target genes. The hinge region (domain D) contains the nuclear localization signal and interacts with corepressors. Finally, the carboxyl-terminal ligand-binding domain (LBD, domain E/F) is responsible for the binding of T_3 , dimerization and recruitment of some coactivators.

Recent years have yielded prolific results in the discovery of partners for nuclear receptors, including TRs, which are important for the mediation of their transcriptional effects. These proteins, corepressors and coactivators, are crucial in thyroid hormone action and generally act as adaptor molecules between TRs and complexes that are either involved in chromatin

remodelling or recruitment of the basal transcription machinery (5, 6). Most known coregulators interact with the hinge region or LBD of nuclear receptors; this may be due in part to the receptor domains that have been used as bait to screen libraries for new partners. However, other binding sites for coregulators have been described. For example, the N-terminus of TR β 2 interacts with the silencing domain of the corepressor SMRT and this interaction blocks the recruitment of other components of the corepressor complex (7). Recently, some coregulators have been described to interact with the DBD of nuclear receptors: the histone acetyl-transferase PCAF (8), GT198 that acts like a tissue-specific coactivator (9) and PSF, a corepressor which recruits Sin3A to TRs (10).

In order to identify new interacting partners for TRs, we screened a human foetal brain cDNA library in a yeast two-hybrid system, using the DBD and a small region of TR β 2 N-terminus as bait. We identified GRP1 (general receptor for phosphoinositides-1), a nucleotide exchange factor for ARF (ADP-ribosylation factor) (11), as a new TR interacting-partner. GRP1, also known as ARNO3, is a member of the cytohesin family. Although its functions are not yet well defined, GRP1 has been found to participate, with ARF6, to the formation of membrane ruffles (12, 13). Overexpression of GRP1 induces the disassembly of the Golgi complex, suggesting that ARF1 is also a potential substrate of GRP1 (11).

In this report, we describe for the first time and characterize the interaction between GRP1 and TRs, and explore a novel function of GRP1 as a repressor of TR-mediated transcription.

RESULTS

Cloning of a novel protein interacting with TRs

To identify new interacting partners for TRs, we performed a yeast two-hybrid screen of a human fetal brain cDNA library using amino acids 89-220 of TR β 2 as bait. This region comprises the DNA binding domain (DBD) and a section of the unique N-terminus of TR β 2 (Fig. 1A). Positive clones were isolated, among which some were known proteins, but not previously described as TR partners. A BLAST sequence analysis revealed one clone to be a partial nucleotide sequence of GRP1, also known as ARNO3. GRP1, a nucleotide exchange factor for ARF (11, 13-15) which is schematically represented in Figure 1B, possesses three well described regions: a coiled coil domain that recognizes scaffold proteins like GRP1 signaling partner 1 (GRSP1) and Tamalin (GRP1-associated scaffold protein, GRASP) (16, 17), a Sec7 domain that is responsible of the nucleotide exchange (11, 15) and a PH domain, that recognizes membrane phosphoinositides with a specificity for phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate (PIP₃) (18-20). The partial cDNA clone we identified was encompassing the PH domain and polybasic tail of GRP1 (100% homologue to a.a. 285-399) and the 3' untranslated region. The interaction between TRs and this initial clone was reconfirmed, in yeast cotransformed with the bait, using β -galactosidase assays. We then amplified and cloned the complete cDNA sequence of GRP1 using specific primers and cDNA derived from JEG-3 cells RNA.

Expression of GRP1 in human tissues and cell lines

In order to determine the expression level of GRP1 in human tissues and cell lines, a commercial dot blot membrane was hybridized with a radiolabelled probe representing the

complete cDNA of GRP1 (Fig. 2A). GRP1 was expressed in all of the adult and fetal human tissues and cell lines tested. Results reported per ng of RNA per dot revealed that the highest expression was found in placenta (dot blot position B8), testis (F8) and the SW480 cell line derived from a colorectal adeno-carcinoma (G10). Patterns of GRP1 transcript found by the dot blot assay are in accordance with previous studies that have shown ubiquitous expression of GRP1 mRNA in mouse tissues (21). The presence of GRP1 protein has also been reported in HIRcB cells and 3T3-L1 adipocytes (12).

We have also assessed the expression profiles of the GRP1 protein by Western blotting in different cell lines: HeLa, JEG-3, CV-1 and GH3 cells (Fig. 2B). All these carcinoma cell lines endogenously express GRP1.

GRP1 interacts with TRs in their DNA-binding domain

We next assessed *in vitro* interactions between TRs and GRP1 using pull-down analysis of recombinant GST fusion proteins and ³⁵S-labelled *in vitro*-translated proteins. As shown in Figure 3A, full-length TR α 1, TR β 1 and TR β 2 interact with GRP1. Since GRP1 was isolated following a yeast two-hybrid experiment using TR β 2, we used deletion mutants of this TR isoform to determine the regions implicated in the interaction (Fig. 1A). TR β 2 1-120 Δ , that lacks the a.a. 89-116 of TR β 2 conferring the specificity of this isoform in the regulation of the hypothalamo-pituitary axis (3), interacts with GRP1 (Fig. 3B). The construction bearing only the DBD of TRs (DBD-only) is sufficient to precipitate GRP1, and deletion of the DBD (\emptyset DBD) results in a loss of the interaction. From these results we conclude that the DNA-binding domain of TRs is sufficient and essential for the interaction to occur.

Since the interaction between TRs and coregulators is often influenced by the presence of hormone, we assessed the influence of T_3 in GST pull-down assays. We tested physiological (10nM) and supraphysiological T_3 concentrations (100nM). In Figure 3C the GST pull-down assay and the gel analysis show that the interaction between GRP1 and TRs is not affected by increasing concentrations of T_3 .

Given that the DBD is the most conserved region among nuclear receptors and is essential and sufficient for the interaction between GRP1 and TRs, we tested the possible interaction of GRP1 and other members of the nuclear receptor superfamily. As demonstrated in Figure 4, GRP1 interacts well with hAR and hER, weakly with hRXR, and no detectable interaction was found with hRAR. Therefore, GRP1 could also have an effect on the action of other nuclear receptors.

TRs interact with the PH domain of GRP1

In order to identify the region of interaction with TRs, we designed constructions of GRP1 (Fig. 1B). As shown in Figure 5, GST pull-down assays conducted with these deletion mutants of GRP1 show that the coiled-coil and the sec7 domain do not interact with TR β 2. The PH domain of GRP1 strongly binds the receptor with two-fold higher binding compared to GRP1wt. These results confirming the interaction of GRP1 through its PH domain or polybasic tail are not surprising since the initial GRP1 clone isolated in the yeast two-hybrid screen contained only this region of GRP1.

GRP1 interacts with TRs in intact mammalian cells

After identifying the interaction in yeast and studying the regions involved *in vitro*, we wanted to examine whether native GRP1 and TRs are able to interact in mammalian cells. We have shown that GRP1 mRNA and protein are expressed in HeLa cells (Fig. 2A and B). It has also been described that HeLa cells contain functional thyroid hormone receptors (22, 23). Thus, using co-immunoprecipitation of HeLa whole-cell extracts, we could demonstrate the interaction of the endogenous proteins in a mammalian cell environment (Fig. 6A). We also wanted to examine whether the interaction between TRs and GRP1 was taking place in the cytoplasm and/or nucleus. Although TRs shuttle rapidly between the cytoplasm and nucleus, the majority of TRs are found in the nucleus (24-26). On the other hand, the majority of GRP1 is located in the cytoplasm and translocates to the cytoplasmic membrane after PIP_3 production (12, 27, 28). However, endogenous and GFP-tagged GRP1 can be observed in the nucleus of cells in many reports (although not always mentioned in the text) (12, 13, 27, 28). We thus proceeded to cell fractionation studies with immunoblot analysis. Immunoblot of cellular fractions confirmed that GRP1 is present predominantly in the cytoplasm; however, it also shows that the GRP1 protein can also be found in significant levels in the nuclear fraction of cells (Fig. 6B). Co-immunoprecipitation studies performed in cell fractions suggest that GRP1 and TR interact both in the cytoplasm and nucleus (Fig. 6A). We used an anti-I κ B- α antibody to show that there was no cross contamination between the cytoplasmic and nuclear fractions (Fig. 6C). The I κ B- α family of proteins is strictly found in the cytoplasm where it inhibits the binding of p50-p65 NF κ B complexes (29). Also, TRs can be detected in whole-cell extracts of HeLa cells and after co-immunoprecipitation with GRP1-specific antibody (N17) (Fig 6D). As demonstrated previously *in vitro* in Figure 3C, the TR-GRP1 interaction is not influenced significantly by the

presence of the ligand in co-immunoprecipitation studies (Fig. 6E).

From these experiments, we conclude that *in vitro* and *in vivo* interaction assays confirm the presence of a complex between GRP1 and TRs in the cytoplasm and nucleus of cells.

GRP1 represses TR-induced transcriptional activation

In order to explore the nuclear functions for this newly discovered interaction, we analyzed the role of GRP1 in the transactivation of TR in mammalian cells, using transient transfections with luciferase reporter genes. In TR-deficient CV-1 cells (3, 30, 31), we studied negative and positive TREs. In Figure 7A/B, using TRET_K, a positive TRE composed of two idealized palindromes arranged in tandem, we can observe repression of transcription by all isoforms in absence of T₃, and activation of transcription in its presence. TR α 1 is more potent and TR β 2 is less effective in this action, as previously described (1). When GRP1 is cotransfected, we observe a decrease of the maximal activation for all TR isoforms, which results in a 45-60% decrease in fold activation of this reporter gene. On positive TREs, the repression in the absence of ligand is not affected by GRP1. Decrease in TR-mediated transcriptional activation is also seen for other pTREs like the inverted palindromes found in the chicken lysozyme gene (LYSX2, Fig. 7C/D) and direct repeats (DR+4, *data not shown*).

Unlike the majority of genes reported to be influenced by thyroid hormone, genes from the hypothalamo-pituitary axis are negatively regulated by T₃ (1). These genes show transcriptional activation in the absence of thyroid hormone and repression in the presence of T₃, as shown in Figure 8. These negative TREs were studied with cotransfection of RXR, since CV-1 cells are RXR-deficient (32). We have previously shown that RXR is a necessary partner for

negative regulation, especially by the TR α 1 and TR β 1 isoforms (32).

Cotransfection of GRP1 almost completely abolishes the activation in the absence of ligand of TR α 1 and TR β 1, on both the TRH (Fig. 8A) and TSH α promoters (Fig. 8C). This translates in a decrease in fold-repression (Fig. 8 B/D). GRP1 does not affect overall repression induced by the TR β 2 isoform; TR β 2 has been shown previously to be more potent in the regulation of the hypothalamo-pituitary axis (3) and to interact differently with coregulator proteins (7, 33). Also, the heterodimeric partner RXR, that is important for negative regulation by TR α 1 and β 1, was previously shown not to be critical for TR β 2 (32). It is thus not surprising to find a different behaviour of TR β 2 for genes that are negatively regulated by T₃.

We next studied the dose-response of GRP1 (50-150-350-500-1000 ng per 6-well plate) on the TRETk reporter to assure that the effect seen was specific and not due to squelching. Compared to the transfection of the empty pSG5 vector, cotransfection of GRP1 with TR β 1 results in a decreased activation that is seen starting at 50 ng and plateaus at 350 ng of GRP1 (Fig. 9).

GRP1 decreases DNA-binding of TR complexes

Since the interaction with GRP1 takes place in the DBD of TRs, the next hypothesis we wanted to verify was that the observed repression of transcriptional activity in the presence of GRP1 could be secondary to an inhibition of receptor-binding to TREs. We thus performed electromobility shift assays (EMSA) to assess the formation of TR/TR homodimers and TR/RXR heterodimers on TREs. As shown in Figure 10, the addition of GRP1 decreases the binding of TR/TR homodimers by 25-35% and TR/RXR heterodimers by 45-50% on direct repeat (Fig. 10 A-B) and palindromic (Fig. 10 C-D) pTREs. Interestingly, no additional complex is formed when

GRP1 is added, suggesting that it is not able to interact with TRs that are bound on DNA. The composition of TRE-bound complexes was confirmed by supershifts with anti-TR and anti-RXR antibodies (*data not shown*).

To further investigate the hypothesis that GRP1 competes with DNA for TR binding we performed a GST pull-down experiment using ³⁵S-radiolabeled GRP1 and TRβ2-GST where we added increasing amounts of double-stranded oligos corresponding to the DR+4 TRE or a non-specific sequence (NS) corresponding to one C/EBP binding site of the haptoglobin A protein promoter region (34). In Figure 11A (upper panel) is a representative GST pull-down experiment where increasing amounts of DR+4 oligos (1, 3, 5pmol) caused a diminution of the complex formed by TRβ2 and GRP1 also represented graphically after gel quantification. The amount of complexes formed gradually decreased to 75% when 5 pmol of DR+4 were added. No change in the interaction between TRβ2 and GRP1 was found when adding increasing amounts of the NS oligos (Fig. 11B). Therefore GRP1 competes with DNA for TR binding and the GST pull-down results are in concordance with our EMSA experiments.

To further assess the hypothesis that GRP1 could influence directly the binding of homo/heterodimers on TREs or dimer formation, we designed GST pull-down assays. TR-GST fusion protein fixed on GSH-beads was incubated with radiolabelled TRβ2 or RXRα in the presence of increasing amounts of GRP1. Our results show that GRP1 did not influence TR-TR or TR-RXR dimer formation (Fig. 11C). Taken together, these results clearly suggest that GRP1 directly decreases DNA binding rather than dimer formation. From these data, we conclude that competition between TREs and GRP1 for TR-binding could thus explain the mechanism of action of this novel corepressor.

DISCUSSION

We have identified a novel TR-interacting protein, GRP1, which interacts with the receptor both in *in vitro* pull-down assays and in the cytoplasm and nucleus of mammalian cells. More importantly, we have demonstrated that GRP1 inhibits TR-mediated activation of transcription and decreases TR homodimer and heterodimer binding to thyroid hormone response elements and that GRP1 competes with TRE for TR binding by GST pull-down assays. This is a newly recognized mechanism of inhibition of thyroid hormone action.

GRP1, also known as ARNO3, is a guanine nucleotide exchange factor for ARF, which is a small G-protein implicated in vesicle trafficking pathways and actin cytoskeleton assembly (35, 36). This protein is composed of 3 distinct regions: an N-terminal coiled-coil domain, a central Sec7 domain responsible for ARF binding and exchange activity and a C-terminal PH domain that recognizes phosphoinositides (Fig. 1B). GRP1 was first identified as a putative PIP₃ receptor (15). After signalling-mediated induction of PI₃-kinase, it is translocated to the cell membrane where it binds PIP₃ and uses principally ARF-6 as a substrate for its GEF activity (13, 28). Overexpression of GRP1 results in fragmentation of the Golgi apparatus (11) and induces ARF-6 dependent actin rearrangements (12). However, the exact physiological functions of GRP1 remain unknown and we are the first to report an interaction with TRs and members of the nuclear receptor superfamily. In addition it is novel for GRP1 to have a role in transcriptional regulation by decreasing the availability of the receptors for their DNA-binding sites.

Although data analysis from previous publications demonstrates the presence of GRP1 in the nucleus of cells, we are the first to explore nuclear roles of GRP1. GRP1 is found predominantly in the cytoplasm of cells, but it is also seen in the nucleus, especially after PIP₃

formation and translocation of cytoplasmic GRP1 to the cell membrane (12, 13, 27, 28). A nuclear localization of GRP1 is thus compatible with the functions of GRP1 as a repressor of transcription that we describe here.

Considering the cellular localization of GRP1, it is also possible that the interaction with TRs might take place in the cytoplasm before TRs enter the nucleus. TRs are synthesized in the cytoplasm, and the first step in their nuclear action is transport to the nucleus. GFP fluorescent probes have allowed the study of TR distribution in living cells: it was shown by Baumann et al. (24) that in the absence of T_3 , the nuclear/cytoplasm (n/c) ratio for TR β was 5.5 or 85-90% nuclear. Zhu et al. (25) have found that the n/c ratio of TR β 1-GFP in the absence of the ligand was 1.5, corresponding to ~60% nuclear. Although there seems to be some variability in the results reported regarding the sub-cellular localization of TR β in hormone-free cells, both reports stated that there is only 10 to 15% of TR β present in the cytoplasm in T_3 -treated cells. They also have shown rapid changes in the intracellular distribution of TRs in living cells and both agreed that in the presence of the hormone most of the receptors enter the nucleus (24, 25). The fact that TRs interact with GRP1 both in the nucleus and cytoplasm may also suggest that in addition to the transcriptional effects of GRP1, it might be implicated in non-genomic actions of thyroid hormone that take place in the cytoplasm or in the detergent-insoluble regions of the cellular membrane where GRP1 is also found. In fact, thyroid hormone has been implicated in the activation of PI $_3$ -kinase (37), an important player in GRP1 subcellular localization. In addition, it was recently described that other members of the nuclear receptor superfamily like ER, that was also shown to interact with GRP1 in this report, are located in part near the cell membrane in membrane ruffles and caveolae, and important functions of nuclear receptors are now being attributed to their extra-nuclear fractions (38, 39). GRP1 might thus be implicated in membrane

localization and actions of these nuclear receptors and further studies are needed to precise the roles of GRP1 in thyroid hormone action.

Numerous coregulator proteins associate with the LBD of TRs to modulate transcription of target genes. NCoR and SMRT were the first corepressors identified (40, 41). These corepressor proteins are composed of receptor-binding domains and repressor domains, which recruit Sin3A and histone deacetylase in order to repress transcriptional activity. GRP1 is a repressor of a novel class with no sequence homology with NCoR and SMRT. However, like NCoR and SMRT (42), GRP1 influences the regulation of both pTREs and nTREs: on pTREs, it decreases T_3 -dependent activation, while on nTREs it diminishes ligand-independent activation in an isoform-specific manner.

Also, the interacting domain of GRP1 is located within the DBD of TRs which we have shown to be sufficient and essential for the interaction, confirming the importance in this region of TRs for other functions than TRE recognition and binding. It was recently found that PSF (PTB associated splicing factor) binds the DBD of nuclear receptors, and acts as a corepressor protein for TR/RXR, mediating its effect through Sin3A *via* chromatin remodelling (10). Like GRP1, PSF represses transcription and its interactions with TRs are not modified by the presence of thyroid hormone, unlike most coregulators that prefer a conformation of receptors that is modified by ligand binding.

Although the majority of coregulatory proteins have been studied for their ability to remodel chromatin structure, there is a recent interest in exploring other pathways that contribute to the modification of transcriptional activity by TRs. The nuclear transport of TRs has been studied for its ability to modify transcription (25). Also, the stability and ubiquitination of TR proteins, which is influenced by phosphorylation and ligand binding, has been shown to influence reporter

gene activity (30, 43). We have shown here that homodimer and heterodimer DNA-binding is decreased in the presence of increasing amounts of GRP1, and this could explain its repressive effects on transcription. Inhibition of DNA-binding is a novel mechanism that will need to be further explored. Burriss et al. have identified a corepressor, TRUP (thyroid receptor-uncoupling protein), that attenuates hormone-dependent transactivation of TR and RAR by decreasing heterodimer formation on response elements (44). By interacting with the DBD of TRs, GRP1 might also disturb the formation of receptor dimers, since there are dimerization interfaces in this region of nuclear receptors (45, 46). However our GST pull-down studies (Fig. 10G) show no effect of GRP1 on TR-TR or TR-RXR dimer formation, demonstrating that the effect of GRP1 would be on the inhibition of TRs to bind to the thyroid hormone response element. Another possible mechanism, although not supported by our EMSA and TRE-competition studies, would be competition of GRP1 for the binding sites of other coactivators interacting with the DBD of TRs, like PCAF and GT198 (8, 9).

In conclusion, we have described the interaction of TRs with a novel repressor of their transcriptional activity: GRP1. This cofactor may also be important for the activity of other nuclear receptors since we have shown it to interact with other members of the superfamily. GRP1 decreases binding of homo- and heterodimer on TREs and competes with TRE for TR binding. The exact mechanism of repression of GRP1, which probably involves decreased access of thyroid hormone receptors to TREs, and its possible involvement in non-genomic actions of thyroid hormone need to be further studied.

MATERIALS AND METHODS

Yeast two-hybrid

We have used a portion of TR β 2 composed of amino acids (a.a.) 89-220 cloned in frame in PAS2-1 (Fig. 1A) as bait to screen a human foetal brain cDNA library cloned in pACT2 (Clontech, Palo Alto, CA). Plasmids were cotransformed in yeast strain Y190 according to "MATCHMAKER Two-Hybrid System 2" manufacturer's instructions (Clontech, Palo Alto, CA). We initially isolated 19 clones growing on His-/Trp-/Leu- selection media and producing LacZ. Plasmid DNA was extracted from these colonies and transformed in MC106 *E.Coli* to isolate pACT2 plasmids. These were retransformed in yeast together with the TR bait in order to confirm the interaction using β -galactosidase assays. The GRP1-PH clone (Fig. 1B), a cDNA corresponding to a.a. 285-399 of GRP1, was then sequenced (Sequencing service, Ottawa University, Ottawa, On) and analyzed by sequence similarity searches (BLAST).

Plasmid Constructions

The cDNAs of human TR α 1, hTR β 1, hTR β 2, TR β 2 1-120 Δ , \emptyset DBD, DBD-only and hAR, hER, hRAR, hRXR (3) were inserted into pSG5 or the pGEX-4T1 vector (Stratagene, La Jolla, CA) (47) (Fig. 1A). The GST- \emptyset DBD (deletion a.a. 119-221) and DBD-only mutant (a.a. 116-218) were produced by PCR amplification of hTR β 2 and inserted into pGEX-4T1 at the *EcoRI* site and *BamHI* site respectively.

After cloning a cDNA identical to a.a. 285-399 of GRP1, we amplified the full-sized cDNA (Genbank accession no. 2909436) from a RT-PCR on JEG-3 cells RNA. The full-length GRP1 cDNA was sub-cloned in pSG5 expression vector at the *BglIII* site, and inserted in frame in

pGEX-4T2. GRP1-PH was generated by inserting the *EcoRI-XhoI* fragment from the original yeast two-hybrid clone, in frame in pGEX-4T2 (Fig. 1B). Cloning a *BamHI* fragment of GRP1 in frame in pGEX-4T2 produced GRP1-CC (Fig. 1B). The GRP1-CC-Sec7 construct was obtained by PCR amplification and inserted in pSG5 (Fig. 1B). Exactitude of all insert sequences was confirmed by DNA sequencing. The size of mutant proteins was confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The TRETk reporter contains two copies of an idealized positive TRE (pTRE) arranged as a palindrome, upstream of a minimal thymidine kinase promoter and fused to the luciferase gene in the PSVO vector (48). The pTREs LYSX2 (2 copies of an inverted palindrome from the chicken lysozyme gene) and DR+4 (direct repeat) were incorporated in the PA3-Luc vector (49, 50). The negative thyroid response element (nTRE) reporter constructs included the 5'-flanking sequences from the human TRH (-900/+55) (47), and the common glycoprotein α -subunit (TSH α -846/+26) fused upstream of a luciferase reporter gene in the PSVO vector (51).

RNA expression analysis

A commercial membrane was used for dot blot analysis (Multiple Tissue Expression Array, Clontech, Palo Alto, CA, Fig. 2). The blots were hybridized with a ³²P-random labelled cDNA probe (RediprimeTM II, Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Qc) representing the entire GRP1 cDNA obtained by digestion of the GRP1-pSG5 plasmid with *Bgl*III. After washes, the blots are revealed by autoradiography. The blots were stripped and hybridized with a probe for human ubiquitin supplied by the manufacturer and resulted in consistent signals for all poly A⁺ RNA dots (*data not shown*). Gel-Pro Analyser program, version 4 (MediaCybernetics, Carlsbad, CA) was used for gel analysis.

Glutathione S-transferase pull-down assays

Fusion constructs were generated by inserting appropriate restriction fragments isolated from cloned cDNAs or PCR products in frame in pGEX-4T1 or -4T2 (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Qc, Fig. 1). Glutathione S-transferase (GST) fusion proteins are prepared after optimization of manufacturer's instructions. Part of the proteins are analyzed in SDS-PAGE and quantified, the rest is kept on GSH-Sepharose beads for pull-down assays. Interacting proteins are *in vitro* translated and labelled with S³⁵ methionine (TNT T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega, Nepean On). These S³⁵ proteins are incubated with GST protein on GSH-beads in the HEMG buffer [40 mM Hepes pH 7.8, 40 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.5 % Triton X-100, 10% glycerol, 1.5 mM DTT], supplemented with 10mg/ml BSA and 1% protease inhibitors (Complete-Mini EDTA-free, Roche, Laval Qc) at room temperature for 2 hours. Protein-protein-beads complexes are pulled-down by centrifugation, washed and separated in 10% SDS-PAGE. For the protein interaction competition experiments (Fig. 11A/B) unprogrammed reticulocyte lysate is added to adjust volume for each reaction. Interacting proteins are revealed by autoradiography. Data presented in the Figures are representative of at least three independent experiments. In order to evaluate quantitatively the interactions the autoradiograms were scanned and analyzed with the ImageQuant 5.0 Build 050 software, Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA) or the Gel-Pro Analyser program, version 4 (MediaCybernetics, Carlsbad, CA) when stated.

The DNA competition assays were performed using the GST-GRP1 immobilized on GSH-Sepharose combined with *in vitro* translated ³⁵S-labeled hTRβ2wt (52). Briefly, the protein complexes are allowed to form as described above followed by washes to discard the unbound

³⁵S-radiolabeled protein. The GST-complexes are incubated in the presence of 0, 1, 3, 5 pmol of cold PCR-generated double-stranded oligos containing a non-specific DNA sequence (haptoglobin protein A, containing a C/EBP binding site) or the DR+4 TRE in the reaction buffer [15 mM Tris pH 7.9, 2 mM EDTA, 20 mM KCl, 4 mM DTT, 0.5 mM ZnCl₂] containing 2 μg/ml polyIdC (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) for 1 hour at room temperature. The GSH-Sepharose was then washed thoroughly in the wash buffer [20 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% Nonidet P-40 (NP40), 2 mM DTT]. Protein-protein-beads complexes are pulled-down by centrifugation, washed and separated in 10% SDS-PAGE. In order to evaluate quantitatively the interactions the autoradiograms were scanned and analyzed with the ImageQuant 5.0 Build 050 software, Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA).

Cell extracts and immunoprecipitation studies

CV-1 (*Cercopithecus aethiops*, ATCC #CCL-70), GH3 (*Rattus norvegicus*, ATCC #CCL-82.1), HeLa (*Homo sapiens*, ATCC #CCL-105), JEG-3 (*Homo sapiens*, ATCC #HTB-36) were lysed in 50mM Hepes and 1% Triton X-100 with protease inhibitors (Complete Mini, EDTA-free, Roche, Laval, Qc) on ice for 30 minutes. Lysates are then collected by scraping and cells are centrifuged for 5 min at 3000g at 4°C. Whole cell extracts are collected in the supernatants.

For cellular fractionation studies, cells are scraped in PBS and pelleted by centrifugation at 200g at 4°C, for 10 minutes. The pelleted cells are resuspended in homogenization buffer (0.32 M sucrose, 3 mM MgCl₂, 0.25% Triton X-100 in a sodium-phosphate buffered solution pH 6.5) and lysed on ice for 10 minutes. After 10 minutes of centrifugation at 300g, at 4°C, the supernatant is kept as the cytoplasmic/membrane fraction. The pellet containing the nucleus is resuspended in the purification solution (1.5 M sucrose, 3 mM MgCl₂ in a sodium-phosphate buffered solution

pH 6.5 with protease inhibitors) and centrifuged at 12 000 rpm for 90 minutes at 4°C. The nucleus pellet is then incubated on ice for 20 minutes in lysis buffer (30 mM TrisBase pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.4 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 15 mM 2-β mercaptoethanol, 10% glycerol with protease inhibitors). The nuclear extract is incubated for 45 minutes on ice with agitation every 15 minutes, and recuperated after centrifugation for 20 minutes at 12 000 rpm at 4°C. Cell extract concentrations were measured using a standard Bradford_{Dc} assay (Bio-Rad, Indianapolis, IN, USA).

In the co-immunoprecipitation experiments, TR-associated proteins were precipitated using a polyclonal antibody against the full-length thyroid hormone receptor (anti-TRα1 FL408: sc-772; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) recognizing all TR isoforms of mouse, rat, human and chicken origin. The negative controls represent complexes immunoprecipitated with preimmune rabbit sera or an antibody directed against a histidine probe (H-3, sc-8036; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA). The GRP1 protein was revealed using either the N17 goat polyclonal antibody (sc-9730, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) or a polyclonal GRP1-antiserum produced in our laboratory after immunization of a rabbit with GST-GRP1 (GL02). 300μg of pre-cleared cell extracts were incubated overnight with 3-5 μg of antibody at 4°C with rocking. Protein G-Sepharose was then added and samples were rocked for 2 h at 4°C. The immunoprecipitated complexes were washed five times (first and second washes in 0.1% Triton X-100, 0.1% BSA prepared in TSA pH 8.0, third wash in TSA pH 8.0, fourth wash in 0.05 M Tris-HCl pH 6.8 prepared in TSA, fifth wash in TBS pH 8.0).

For the immunoblot, proteins are resolved in 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinyl difluoride membrane. The membrane is blocked and incubated overnight at 4°C with constant agitation with the primary antibody: anti-TR antibody (FL408) or anti-GRP1 (GL02 or

N17). Anti-I κ B- α was used as control (sc-371, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) to assure that nuclear fractions are not contaminated with cytoplasm (29). Non-radioactive *in vitro* translated (GRP1-pSG5) or GST-tagged proteins (TR β 2-pGEX-4T1) expressed in *E. coli* were used as positive controls for the immunoblot step. The membrane is washed with TBS/Tween 20 and detection is accomplished using horseradish peroxidase conjugated antibody (Amersham Biosciences, Baie D'Urfe, Qc) and enhanced chemiluminescence detection system (Roche, Laval Qc). Data presented in the Figures are representative of at least three independent experiments. Gel-Pro Analyser program, version 4 (MediaCybernetics, Carlsbad, CA) was used for gel analysis.

Cell culture and transfection assays

The CV-1 (*Cercopithecus aethiops*, ATCC #CCL-70) cell line was maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin, streptomycin, and amphotericin (Gibco, Burlington, On). Transient transfections are realized in 6-well plates on subconfluent cells using the calcium-phosphate technique. Unless otherwise indicated, each experiment utilizes 1.6 μ g of reporter construct and 80 ng of each receptor or cofactor expression vector or vector alone per well. Sixteen hours after transfection, culture medium is replaced by medium containing FBS stripped of hormone by anion-exchange resin and charcoal, with or without 10 nM T₃. Thirty-six to forty hours after transfection, cells are harvested and assayed for luciferase activity. Data are from at least three independent experiments, performed in *triplicate*, and are displayed as mean +/- standard error.

Electromobility shift assay

Positive TREs DR+4 (5'-TCAGGTCACAGGAGGTCAAC-3') and PAL (5'-TCAGGTCATGACCTGAC-3') double-stranded DNA probes are radiolabelled by PCR using 32 P-dCTP (NEN, St-Laurent, Qc). Unincorporated 32 P is removed by ProbeQuant G-50 column (Amersham Biosciences, Baie D'Urfe, Qc). Proteins are made by *in vitro* transcription/translation in rabbit reticulocyte lysate (TNT T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System). Protein production is verified in parallel transcription/translation reactions with 35 S incorporation and visualized on SDS-PAGE followed by autoradiography. Between 1 and 7 μ L of lysate proteins are incubated with radiolabelled probes ($0.5-1 \times 10^6$ cpm depending on experiment). Total protein volumes are adjusted with reticulocyte lysate to give equal volumes for each reaction. Reactions are performed in a 20 μ L volume of binding buffer (20 mM Hepes, 50 mM KCl, 20% glycerol, 1 μ g/ μ L Poly dIdC, 1 mM DTT, 0.1mg/ml salmon sperm DNA) for 20 minutes at room temperature. Supershift reactions were performed by first incubating proteins and probes in binding buffer for 20 minutes at room temperature, followed by further 30 minutes incubation on ice with anti-TR (FL408) or anti-RXR α (Δ N197; sc-774, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) antibody to ensure complex composition. Reactions are resolved on 5.2% non-denaturing polyacrylamide gels containing 5% glycerol at 4°C for 3 to 4 hours. Binding shifts are visualized by autoradiography. Data presented in the Figures are representative of at least three independent experiments. Gel analysis was performed with the ImageQuant 5.0 Build 050 software, Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA).

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported in part by grants and scholarships from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-15655 and MOP-67203) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec to MFL; and by a Fonds de la Recherche en Santé du Québec scholarship to MED.

This work was presented in part at the 2001 Endocrine Society Meeting. We would like to thank Dr Fredric E. Wondisford & Dr Lenore K. Beitel for plasmids, and Dr Claude Asselin for the haptoglobin promoter oligos.

FOOTNOTE

Marie-Belle Poirier and Genevieve Hamann contributed equally to this work.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Schematic representation of the constructions used in this study. A- TR β 2 wt, TR β 2 bait used for yeast two-hybrid screen, and TR β 2 mutants. B- GRP1 wt and deletion mutants.

Figure 2: Ubiquitous expression of GRP1 in human tissues and cell lines. A- A commercial multiple tissue dot blot membrane was hybridized with a radiolabelled probe representing the complete cDNA of GRP1. GRP1 is ubiquitously expressed in adult and fetal human tissues and cell lines. Highest expression is found in the placenta (B8), testis (F8) and SW480 cell line (position G10). After stripping of the membrane, a ubiquitin probe was utilized as loading control (*data not shown*). B- Representative Western blot analysis of GRP1 protein expression in different cell lines: HeLa, JEG-3, CV-1 and GH3 cells. 50 μ g of whole-cell extracts were loaded into each lane. The immunoblot was revealed using an antibody raised against GRP1 (GL02). The GRP1 protein is expressed in every carcinoma cell line tested.

Figure 3: Thyroid hormone receptors and GRP1 interact in vitro. Representative pull-down analysis of GST fusion proteins and ³⁵S-labelled *in vitro*-translated proteins. Percentage of input is included for reference (lane 1) and GST alone was used as a negative control (lane 2). A- TR α 1, TR β 1 and TR β 2 interact with GRP1-GST. B- GST-TR β 2 and TR β 2 deletion mutant 1-120 Δ interact similarly with GRP1; the DNA-binding domain of TRs is sufficient to mediate this interaction (DBD-only). The deletion of the TR-DBD (\emptyset DBD) results in loss of the interaction, suggesting that the DNA-binding domain is essential and sufficient for the interaction to occur C- *In vitro* interaction between TRs and GRP1 was not affected by the addition of increasing levels

Poirier M-B et al. GRP1, a novel repressor of thyroid hormone action

of T₃ or the vehicle alone. The % of binding for each protein was obtained using the ImageQuant 5.0 program; results are from at least three independent experiments.

Figure 4: GRP1 interacts with other nuclear receptors. Representative GST pull-down analysis of GST-GRP1 fusion protein and ³⁵S-labelled *in vitro*-translated hAR, hER α , hRXR α , hRAR α . Percentage of input is included for reference (lane 1) and GST alone was used as a negative control (lane 2). GRP1 binds to the hAR and hER α , interacts weakly with hRXR α and does not interact with hRAR α .

Figure 5: Thyroid hormone receptor interacts with the PH domain of GRP1. Representative pull-down analysis of GST fusion proteins and ³⁵S-labelled *in vitro*-translated proteins. Percentage of input is included for reference (lane 1) and GST alone was used as a negative control (lane 2). **A-** GST-GRP1wt and PH domain interact with ³⁵S-TR β 2. **B-** GST-TR β 2 does not interact with ³⁵S-labelled GRP1 mutant CC-sec7. The % of binding for each protein was obtained using the ImageQuant 5.0 program; results are from at least three independent experiments.

Figure 6: Thyroid hormone receptors and GRP1 protein interact in intact HeLa cells. **A-** HeLa cell extracts were immunoprecipitated with TR-specific antibody FL408 (IP TR) or with preimmune rabbit sera (IP Pi), and subjected to immunoblot using GRP1-specific antibody GL02. No signal is found when cellular extracts are immunoprecipitated with the pre-immune (Pi) serum, showing specificity of the immunoprecipitation reaction. *In vitro* translated GRP1 (GRP1 i.v.) was used as a positive control. Data show that GRP1 interacts with TRs in whole-cell,

cytoplasmic and nuclear fractions. **B-** Representative Western blot analysis of HeLa whole-cell, cytoplasmic or nuclear extracts (50 µg per lane). Extracts and *in vitro* translated GRP1 (GRP1 i.v.) were resolved by 10% SDS-PAGE. Immunoblots were conducted with the GRP1-specific antibody GL02. GRP1 is mainly localized in the cytoplasm, but is also present in the nucleus. **C-** Immunoblot analysis of HeLa whole-cell, cytoplasmic and nuclear extracts (50 µg per lane) with an IκB-α antibody shows that nuclear extracts are not cross-contaminated with cytoplasmic proteins. **D-** Whole-cell extracts of HeLa cells were immunoprecipitated with GRP1-specific antibody (N17, IP GRP1) or with an antibody against histidine-probe (H-3, sc-8036, IP His-probe) as a negative control and subjected to immunoblot using TR-specific antibody FL408. GST-tagged TRβ2 (92 kDa) and whole-cell extract of HeLa (60 µg) were used as positive controls for the immunoblot. This result shows the presence of endogenous TRs and the interaction with GRP1 in HeLa cells. **E-** Co-immunoprecipitation study of HeLa whole-cell extracts (300µg). Proteins were immunoprecipitated using a TR-specific antibody FL408 in the presence of 100nM T₃ or the vehicle alone followed by immunoblotting with GRP1-specific antibody (N17). The interaction between TRs and GRP1 is not significantly influenced by T₃. Gel-Pro Analyser program, version 4 (MediaCybernetics, Carlsbad, CA) was used for gel analysis.

Figure 7: GRP1 decreases ligand-dependent activation on positive thyroid response elements.

Effect of TR isoforms and GRP1 cotransfected in CV-1 cells on the regulation of positive response elements TRETk (A and B) and LYSX2 (C and D) showing a decrease in T₃-dependent activation levels and fold activation. The data are expressed in relative luciferase activity (RLU) compared to pSG5 vector alone without T₃ (A and C), or fold activation (B and D) (RLU in the

presence of T_3 /RLU in the absence of T_3). Data are compiled from at least three independent experiments and presented as mean +/- SEM.

Figure 8: *GRP1 decreases ligand-independent activation on negative thyroid response elements.* Effect of TR isoforms and GRP1 cotransfected in CV-1 cells on the regulation of negative responsive element TRH (A and B) and TSH α (C and D) showing a decrease in the activation in the absence of T_3 and fold repression. The data are expressed in relative luciferase activity (RLU) compared to pSG5 vector alone without T_3 (A and C), or fold repression (B and D) (RLU in the absence of T_3 /RLU in the presence of T_3). Data are compiled from at least three independent experiments and presented as mean +/- SEM.

Figure 9: *Dose-response studies of the effect of GRP1 on the TRETk reporter.* Effect of TR β 1 and increasing doses (50 to 1000 ng) of GRP1 or empty pSG5 vector cotransfected in CV-1 cells, on the TRETk reporter gene. The repressor effect of GRP1 is visible at low doses and plateaus at 350 ng. The data is expressed in relative luciferase activity (RLU), compared to pSG5 vector alone without T_3 , compiled from at least three independent experiments and presented as mean +/- SEM.

Figure 10: *GRP1 decreases homodimer and heterodimer formation on thyroid hormone response elements.* Electromobility shift assays (EMSA) showing the effect of increasing amounts of *in vitro* translated GRP1 protein on the formation of TR β 1-homodimer or TR β 1/RXR α heterodimer on positive thyroid response elements (pTRES). 32 P-radiolabelled

probes representing pTREs are incubated with *in vitro* translated TR β 1, RXR α and GRP1 (1,3, 5, 7 μ l) as indicated. Unprogrammed lysate (UPL) is used to adjust for the amount of protein in each reaction. On diagrams accompanying the representative autoradiography, are plotted the quantification of binding intensity of complexes using the ImageQuant 5.0 program, from at least 3 independent experiments, expressed as mean \pm SEM. **A-** EMSA assay using a direct repeat (DR+4) pTRE showing that GRP1 decreases the TR β 1-homodimer formation. **B-** GRP1 inhibits the TR β 1/RXR α -heterodimer formation on the DR+4 pTRE. **C-** EMSA assay using a palindromic (PAL) pTRE showing that GRP1 decreases TR β 1-homodimer formation. **D-** GRP1 inhibits the TR β 1/RXR α -heterodimer formation on the palindromic (PAL) pTRE.

Figure 11: GRP1 competes with DNA for TR-binding but does not influence dimer formation.

Representative GST pull-down assays using increasing amounts of double-stranded oligos in the presence of 35 S-TR β 2 and GRP1-GST. Percentage of input is included for reference (lane 1) and GST alone was used as a negative control (lane 2). The proteins complexes were first allowed to interact, followed by the addition of increasing concentrations (0, 1, 3, 5 pmol) of DR+4 (**A**) or C/EBP binding site of the promoter region of the haptoglobin A protein (**B**) as a non-specific control (NS oligo). Graphical representation of the decrease of the interaction between 35 S-TR β 2 and GRP1-GST in a dose-dependent manner when adding the oligos. **C-** Representative GST pull-down analysis of GST fusion proteins and 35 S-labelled *in vitro* translated proteins. 10% of the input proteins (TR β 2 or RXR α) is included for reference (lane 1 and 5) and GST alone was used as a negative control (lane 2 and 6). GST-TR β 2 is able to precipitate the 35 S-radiolabeled TR β 2 or RXR α forming homodimers and heterodimers respectively. The addition of GRP1 (7 μ l)

Poirier M-B et al. GRP1, a novel repressor of thyroid hormone action

does not influence the amount of the radiolabelled TR β 2 and RXR α precipitated by GST-TR β 2.

Unprogrammed lysate (UPL) from the TNT kit was used to ensure the same quantity of protein in each experiment. The quantification of the bands was performed using the Gel-Pro Analyser program.

REFERENCES

1. **Yen PM** 2001 Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Review* 81:1097-1142
2. **Davis PJ, Davis FB** 1996 Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 6:497-504
3. **Langlois MF, Zanger K, Monden T, Safer JD, Hollenberg AN, Wondisford FE** 1997 A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *J Biol Chem* 272:24927-24933
4. **Hollenberg AN, Monden T, Wondisford FE** 1995 Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem* 270:14274-14280
5. **McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW** 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344
6. **Dillworth FJ, Chambon P** 2001 Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20:3047-3054
7. **Yang Z, Hong SH, Privalsky ML** 1999 Transcriptional anti-repression. Thyroid hormone receptor beta-2 recruits SMRT corepressor but interferes with subsequent assembly of a functional corepressor complex. *J Biol Chem* 274:37131-37138
8. **Blanco JC, Minucci S, Faivre C** 1998 The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *GENES Dev* 12:1638-1651
9. **Ko L, Cardona GR, Henrion-Caude A, Chin WW** 2002 Identification and characterization of a tissue-specific coactivator, GT198, that interacts with the DNA-binding domains of nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 22:357-369
10. **Mathur M, Tucker PW, Samuels HH** 2001 PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 21:2298-22311
11. **Franco M, Boretto J, Robineau S, Monier S, Goud B, Chardin P, Chavrier P** 1998 ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor

- 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9926-9931
12. **Clodi M, Vollenweider P, Klarlund J, Nakashima N, Martin S, Czech MP, Olefsky JM** 1998 Effects of general receptor for phosphoinositides 1 on insulin and insulin-like growth factor I-induced cytoskeletal rearrangement, glucose transporter-4 translocation, and deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinol* 139:4984-4990
 13. **Langille SE, Patki V, Klarlund JK, Buxton JM, Holik JJ, Chawla A, Corvera S, Czech MP** 1999 ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J Biol Chem* 274:27099-27104
 14. **Klarlund JK, Czech MP** 2001 Isolation and properties of GRP1, an ADP-ribosylation factor (ARF)-guanine nucleotide exchange protein regulated by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Methods Enzymol* 329:279-289
 15. **Klarlund JK, Guilherme A, Holik JJ, Virbasius JV, Chawla A, Czech MP** 1997 Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* 275:1927-1930
 16. **Klarlund JK, Holik J, Chawla A, Park JG, Buxton J, Czech MP** 2001 Signaling complexes of the FERM domain-containing protein GRSP1 bound to ARF exchange factor GRP1. *J Biol Chem* 276:40065-40070
 17. **Nevrivy DJ, Peterson VJ, Avram D, Ishmael JE, Hansen SG, Dowell P, Hrubby DE, Dawson MY, Leid M** 2000 Interaction of GRASP, a protein encoded by a novel retinoic acid- induced gene, with members of the cytohesin family of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* 275:16827-16836
 18. **Gray A, Van Der Kaay J, Downes CP** 1999 The pleckstrin homology domains of protein kinase B and GRP1 (general receptor for phosphoinositides-1) are sensitive and selective probes for the cellular detection of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and/or phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in vivo. *Biochem J* 344 Pt 3:929-936
 19. **Ferguson KM, Kavran JM, Sankaran VG, Fournier E, Isakoff SJ, Skolnik EY, Lemmon MA** 2000 Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 6:373-384

20. **Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, Lambright DG** 2000 Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 6:385-394
21. **Korthäuer U, Nagel W, Davis EM, LeBeau MM, Menon ML, Mitchell EO, Kozak CA, Kolanus W, Bluestone JA** 2000 Anergic T lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family. *Journal Immunol* 164:308-318
22. **Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM** 1986 The *c-erb-A* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324(6098):641-646
23. **Doulabi BZ, Schiphorst MP, Van Beeren HC, Labruyere WT, Lamers WH, Fliers E, Bakker O, Wiersinga WM** 2002 TR β 1 Protein Is Preferentially Expressed in the Pericentral Zone of Rat Liver and Exhibits Marked Diurnal Variation. *Endocrinol* 143:979-984
24. **Baumann CT, Maruvada P, Hager GL, Yen PM** 2001 Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J Biol Chem* 276:11237-11245
25. **Zhu XG, Hanover JA, Hager GL, Cheng SY** 1998 Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. *J Biol Chem* 273:27058-27063
26. **Bunn CF, Neidig JA, Freidinger KE, Stankiewicz TA, Weaver BS, McGrew J, Allison LA** 2001 Nucleocytoplasmic shuttling of the thyroid hormone receptor alpha. *Mol Endocrinol* 15:512-533
27. **Oatey PB, Venkateswarlu K, Williams AG, Fletcher LM, Foulstone EJ, Cullen PJ, Tavare JM** 1999 Confocal imaging of the subcellular distribution of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in insulin- and PDGF-stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical J* 344:511-518
28. **Venkateswarlu K, Gunn-Moore F, Oatey PB, Tavare JM, Cullen PJ** 1998 Nerve growth factor- and epidermal growth factor-stimulated translocation of the ADP-ribosylation factor-exchange factor GRP1 to the plasma membrane of PC12 cells requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the GRP1 pleckstrin homology domain. *Biochem J* 335:139-146

29. **Yamamoto Y, Gaynor RB** 2004 I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochemical Sci* 29:72-79
30. **Dace A, Zhao L, Park KS, Furuno T, Takamura N, Nakanishi M, West BL, Hanover JA, Cheng SY** 2000 Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8985-8990
31. **Nakano K, Matsushita A, Sasaki S, Misawa H, Nishiyama K, Kashiwabara Y, Nakamura H** 2004 Thyroid-hormone-dependent negative regulation of thyrotropin β gene by thyroid hormone receptors: study with a new experimental system using CV1 cells. *Biochem J* 378:549-557
32. **Laflamme L, Hamann G, Messier N, Maltais S, Langlois MF** 2002 RXR acts as a coregulator in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis by thyroid hormone receptors. *J Mol Endocrinol* 29:61-72
33. **Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE** 2001 Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest* 107:1017-1023
34. **Gheorghiu I, Deschênes C, Blais M, Boudreau F, Rivard N, Asselin C** 2001 Role of Specific CCAAT/Enhancer-binding Protein Isoforms in Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem* 276:44331-44337
35. **Cullen PJ, Venkateswarlu K** 1999 Potential regulation of ADP-ribosylation factor 6 signalling by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Biochem Soc Trans* 27:683-689
36. **Jackson CL, Casanova JE** 1998 Turning on ARF: the sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* 10:60-67
37. **Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK** 2000 Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538-541
38. **Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER** 2002 ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 16:100-115
39. **Song RXD, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ** 2002 Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER alpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 16:116-127

40. **Horlein AJ, Naar AM** 1995 Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404
41. **Chen JD, Evans RM** 1995 A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457
42. **Hollenberg AN, Monden T, Madura JP, Lee K, Wondisford FE** 1996 Function of nuclear co-repressor protein on thyroid hormone response elements is regulated by the receptor A/B domain. *J Biol Chem* 271:28516-28520
43. **Chen SL, Chang YJ, Wu YH, Lin KH** 2003 Mitogen-activated protein kinases potentiate thyroid hormone receptor transcriptional activity by stabilizing its protein. *Endocrinol* 144:1407-1419
44. **Burris TP, Nawaz Z, Tsai MJ, O'Malley BW** 1995 A nuclear hormone receptor-associated protein that inhibits transactivation by the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9525-9529
45. **Zechel C, Shen XQ, Chen JY, Chen ZP, Chambon P, Gronemeyer H** 1994 The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J* 13:1425-1433
46. **Perlmann T, Rangarajan PN, Umesono K, Evans RM** 1993 Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev* 7:1411-1422
47. **Breathnach R, Harris BA** 1983 Plasmids for the cloning and expression of full-length double-stranded cDNAs under control of the SV40 early or late gene promoter. *Nucleic Acids Res* 11:7119-7136
48. **Chatterjee VK, Nagaya T, Madison LD, Datta S, Rentoumis A, Jameson JL** 1991 Thyroid hormone resistance syndrome. Inhibition of normal receptor function by mutant thyroid hormone receptors. *J Clin Invest* 87:1977-1984
49. **Baniahmad A, Steiner C, Kohne AC, Renkawitz R** 1990 Molecular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* 61:505-514
50. **Adams M, Matthews C, Collingwood TN, Tone Y, Beck-Peccoz P, Chatterjee VK** 1994 Genetic analysis of 29 kindreds with generalized and pituitary resistance syndrome. *Thyroid* 4:225-232

Poirier M-B et al. GRP1, a novel repressor of thyroid hormone action

51. **Chatterjee VK, Lee JK, Rentoumis A, Jameson JL** 1989 Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9114-9118
52. **Loven MA, Muster N, Yates JR, Nardulli AM** 2003 A novel estrogen receptor α -associated protein, template-activating factor, inhibits acetylation and transactivation. *Mol Endocrinol* 17:67-78

Figure 1

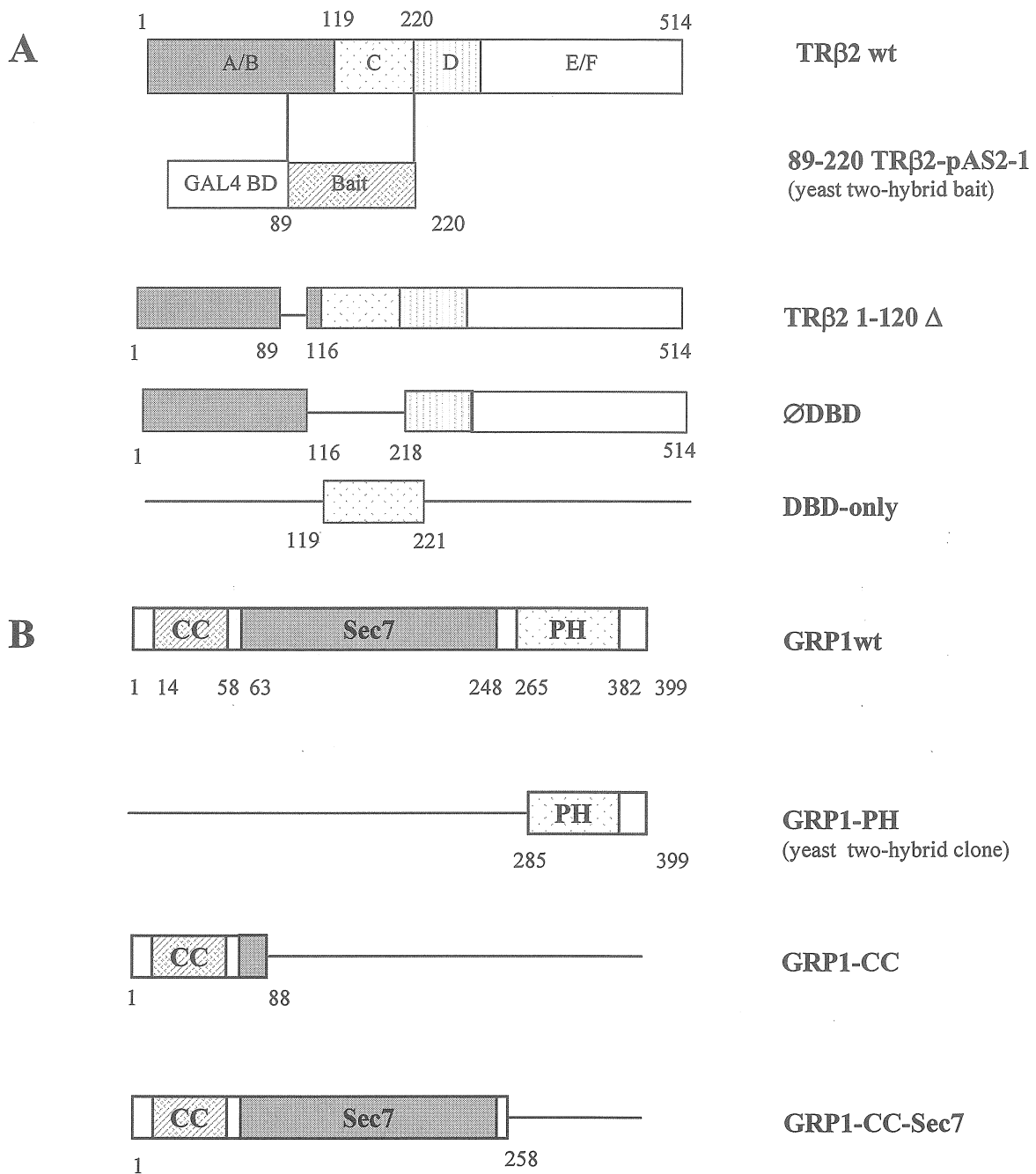
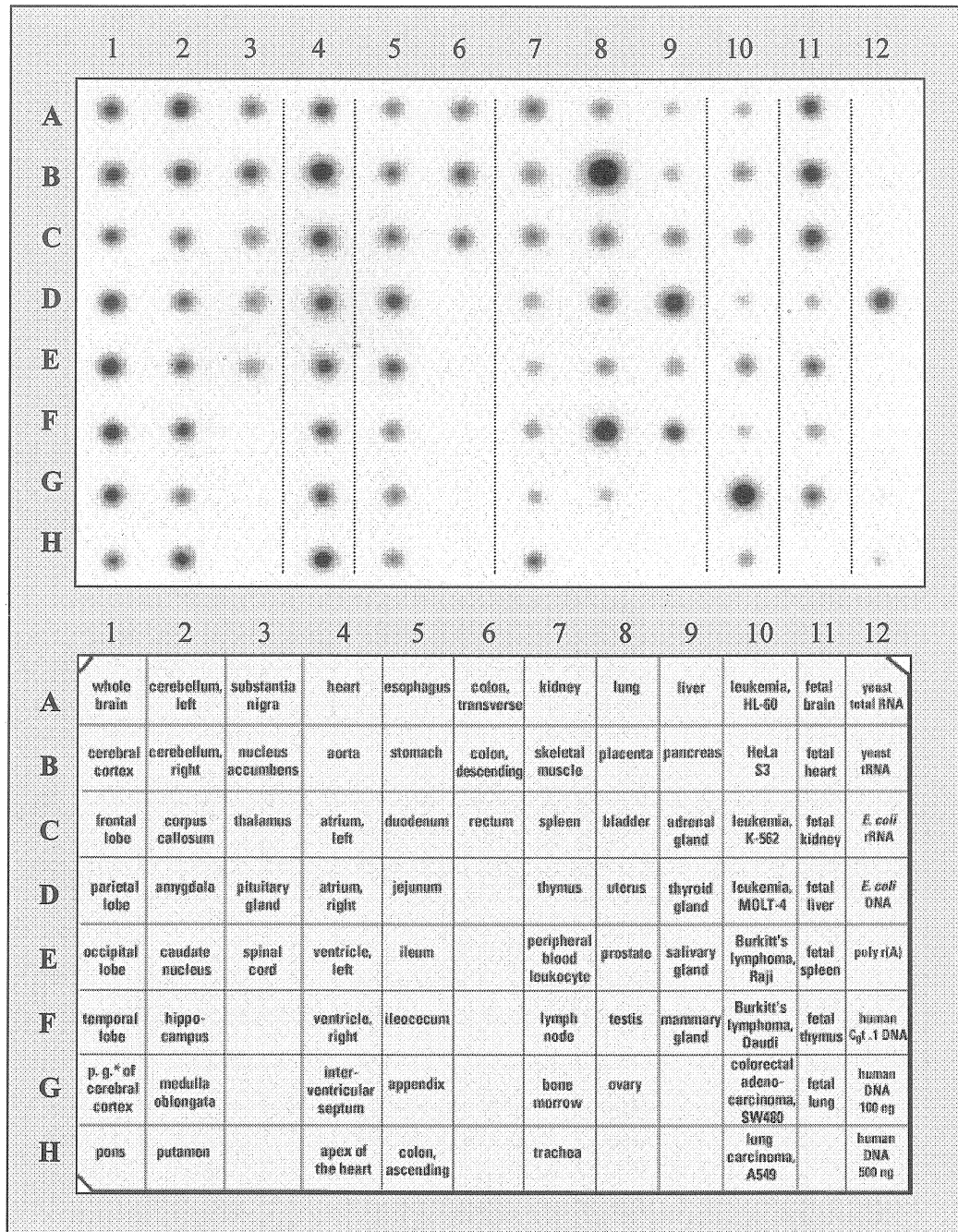


Figure 2

A



B

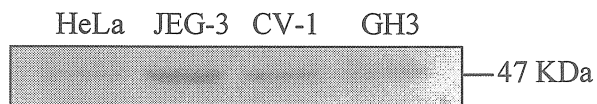


Figure 3

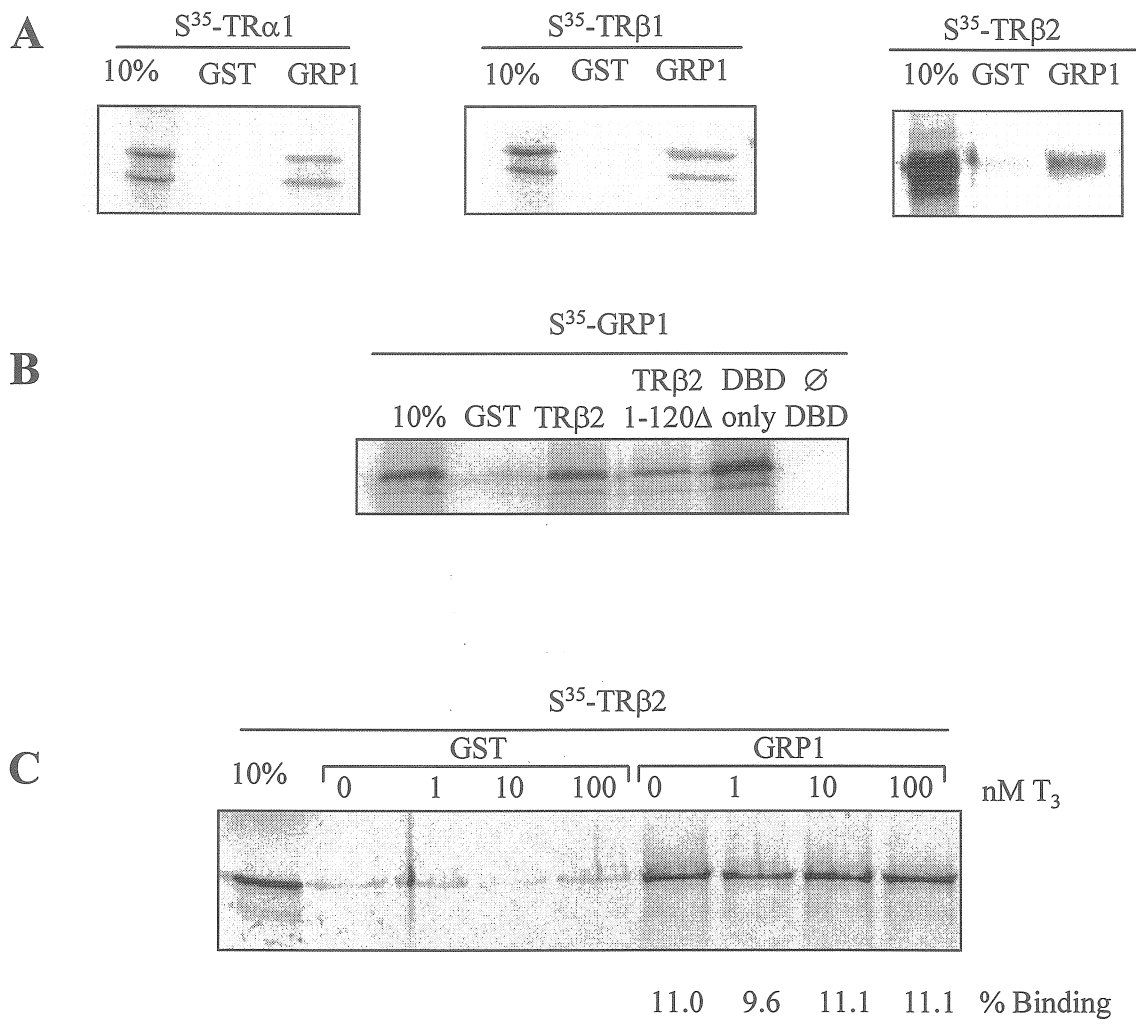


Figure 4

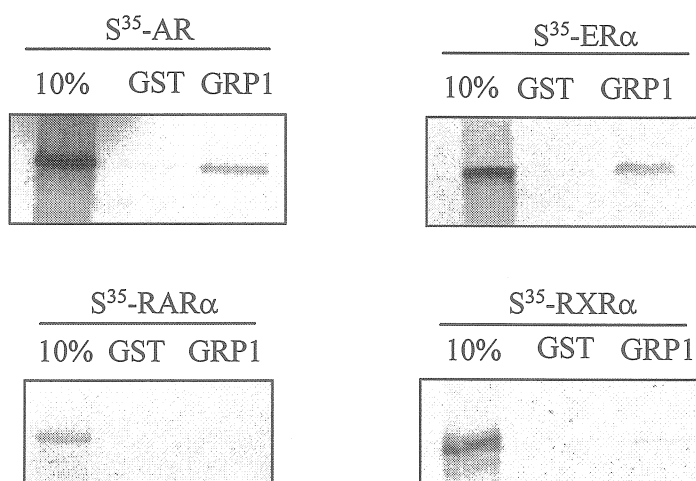


Figure 5

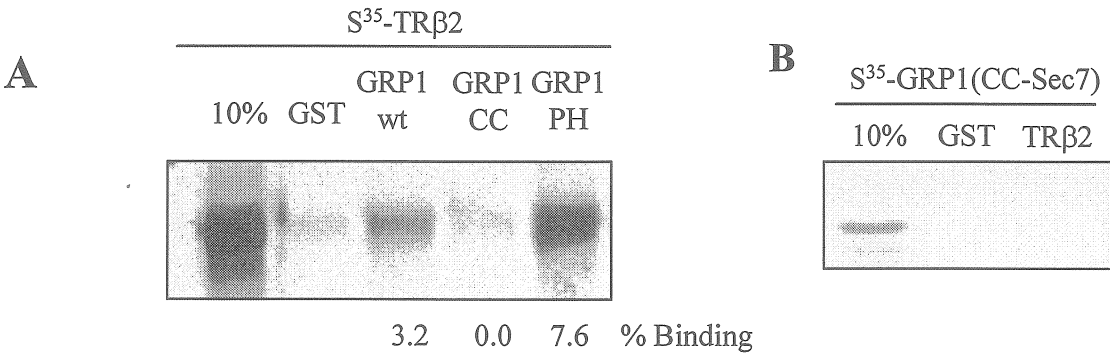
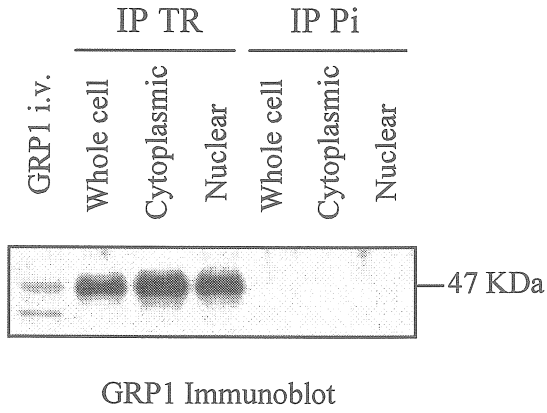
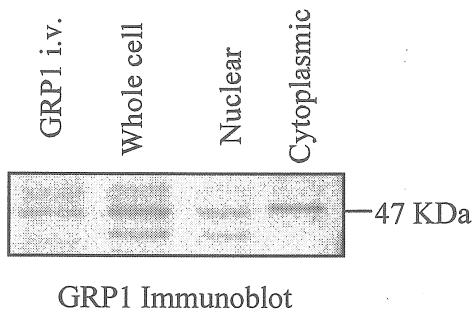


Figure 6

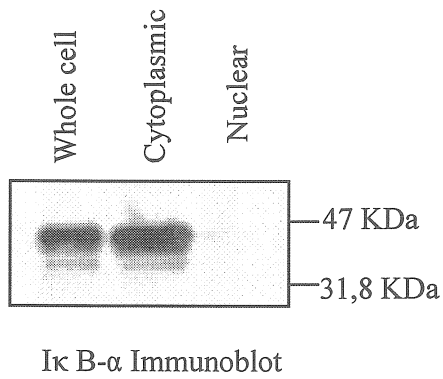
A



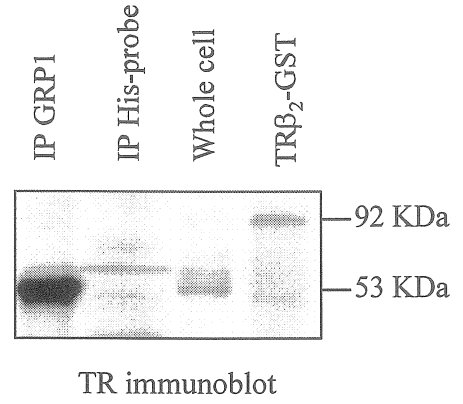
B



C



D



E

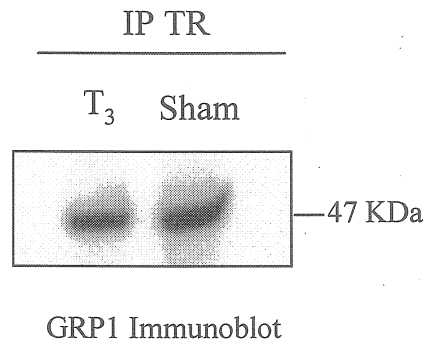


Figure 7

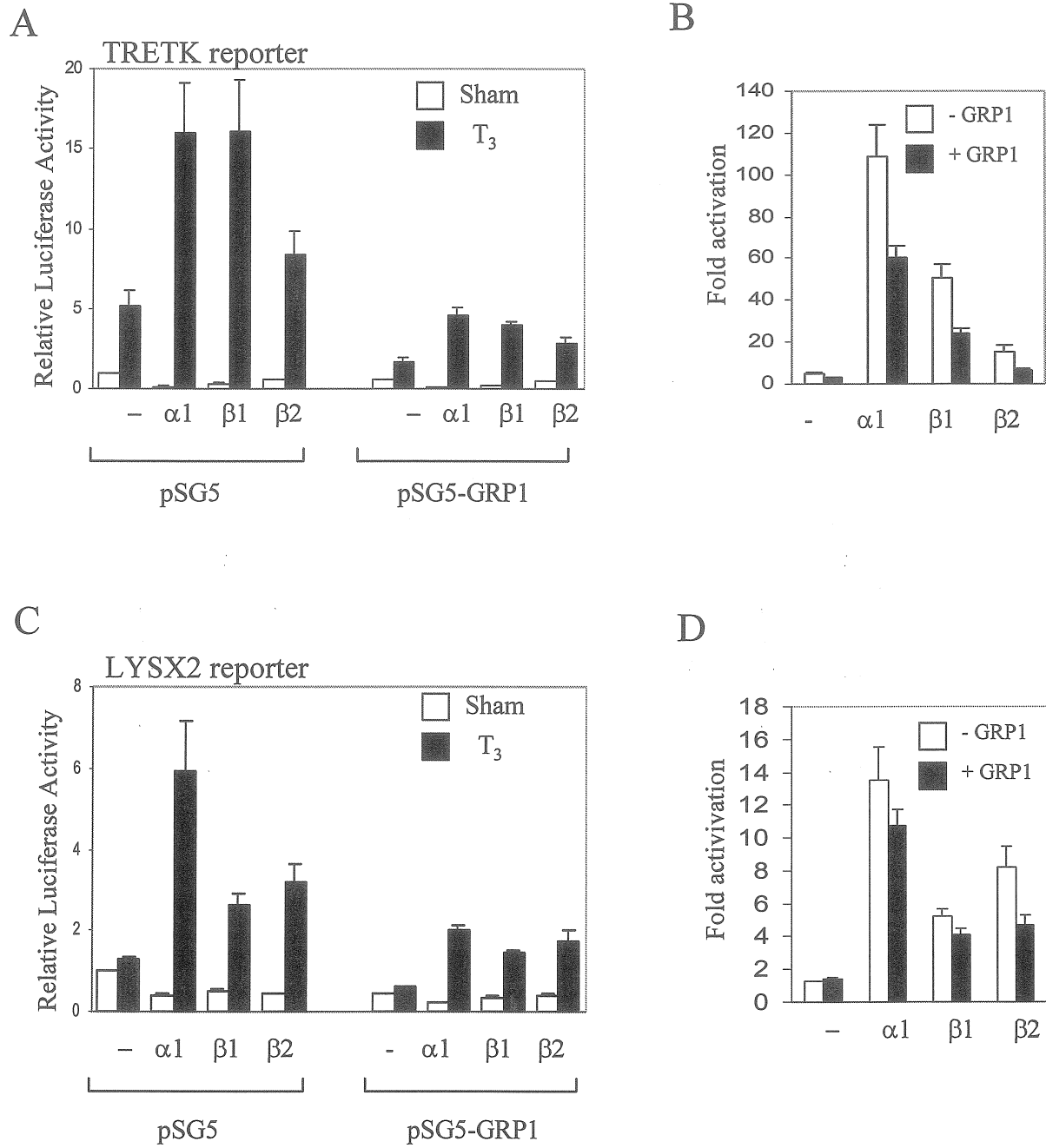


Figure 8

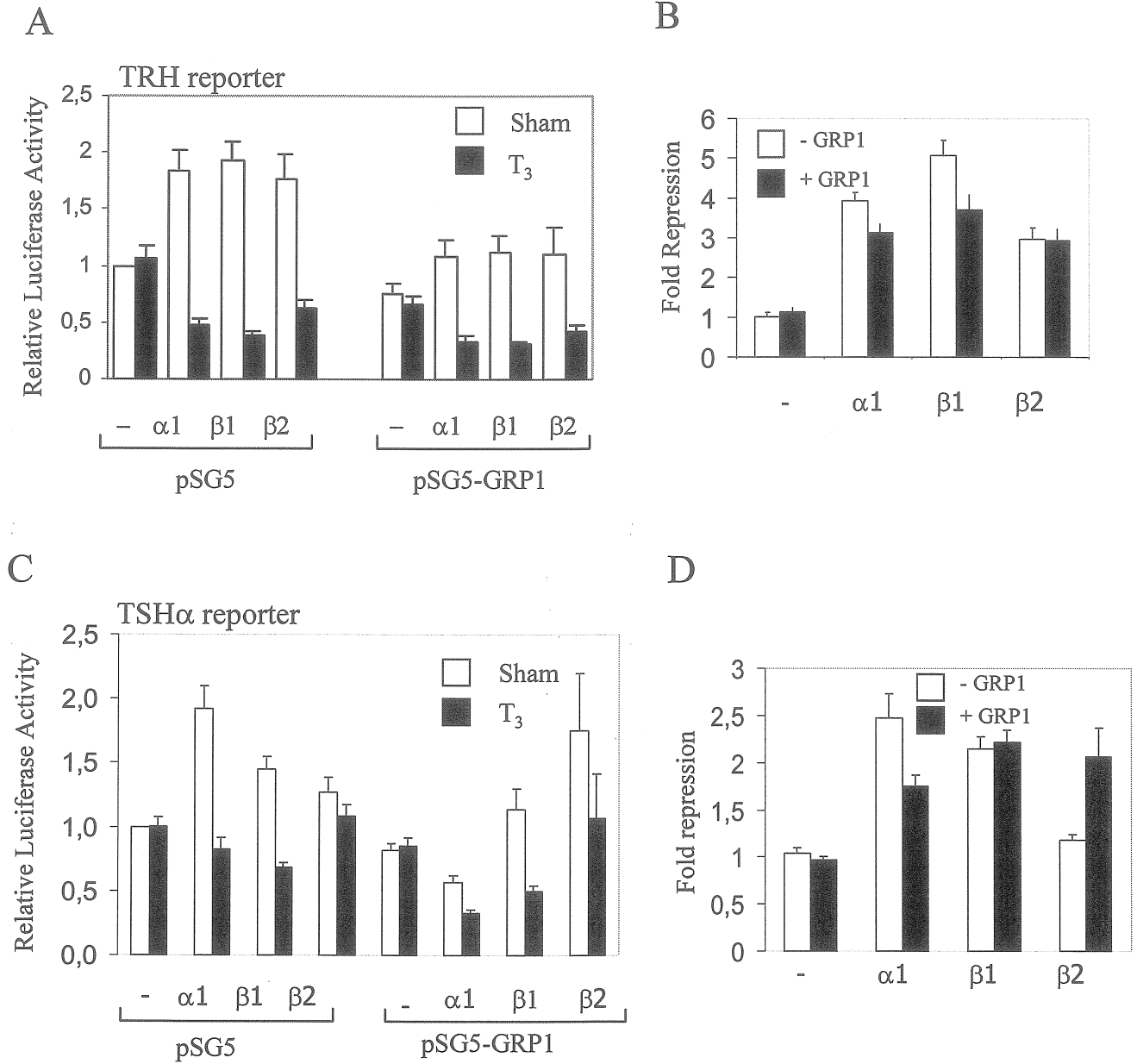


Figure 9

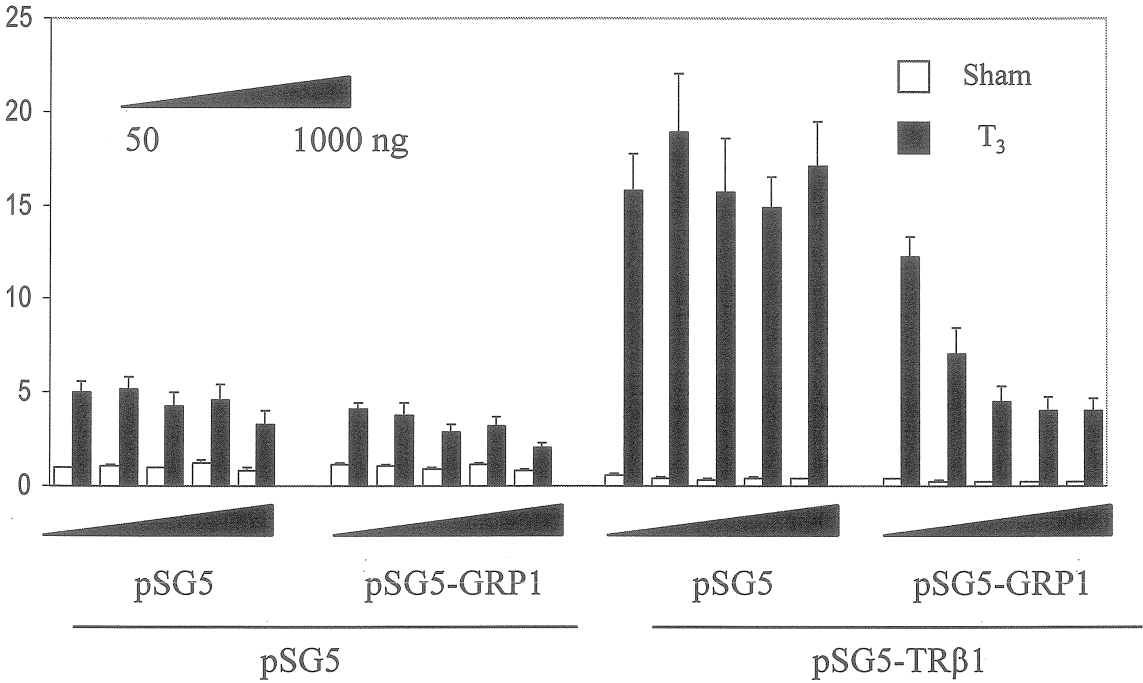


Figure 10

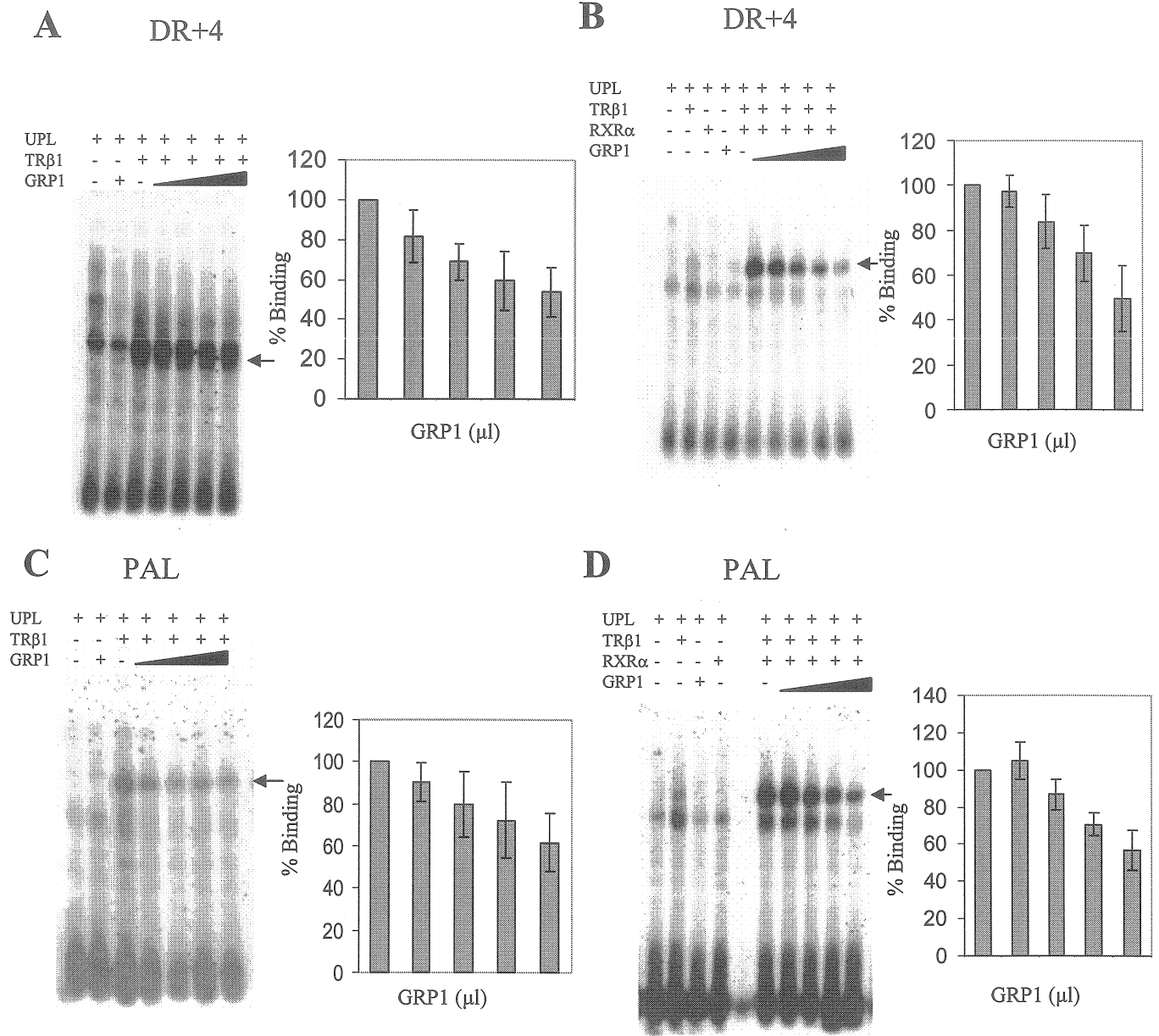
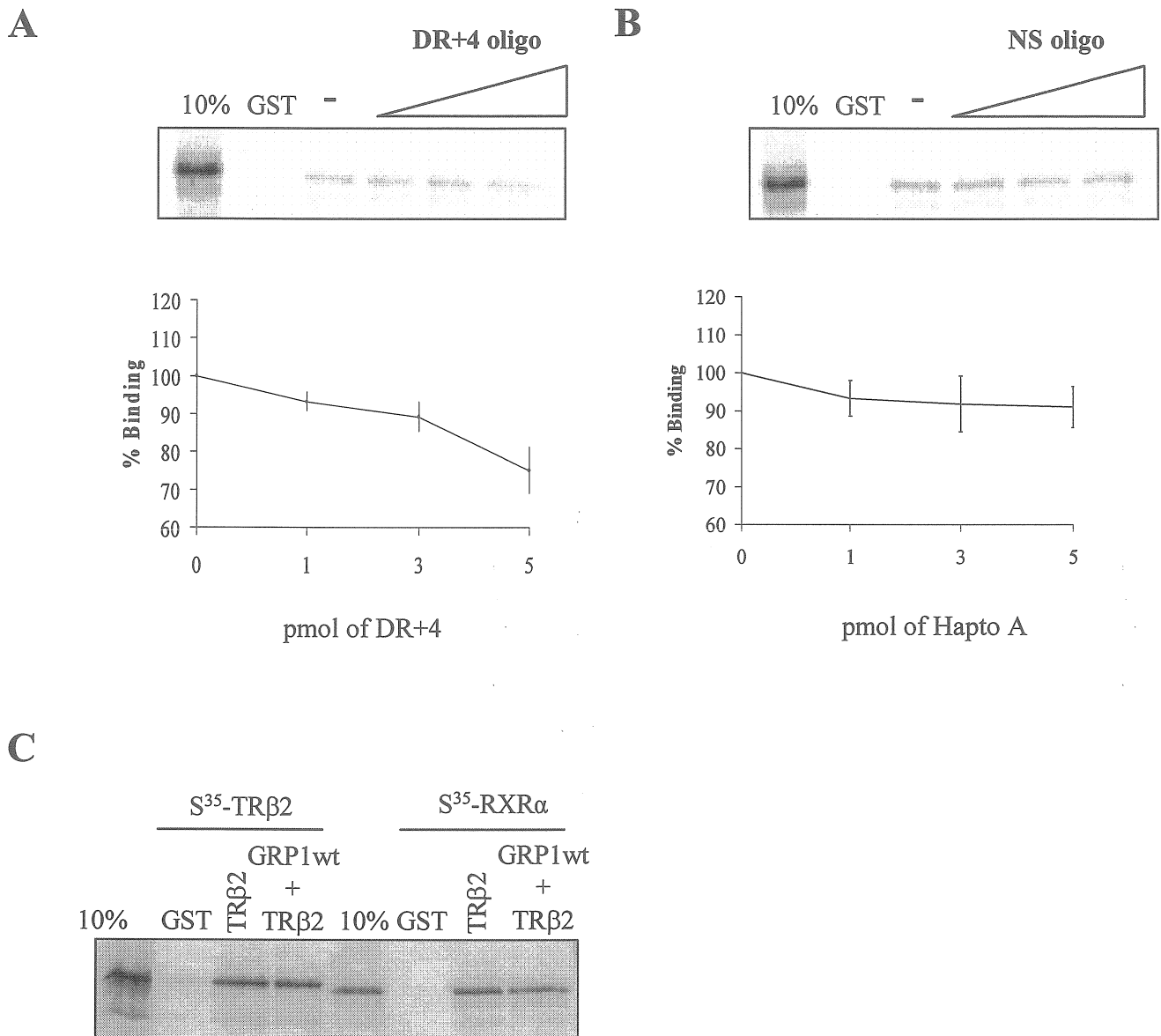


Figure 11



Article #2

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RANBPM, A NOVEL COACTIVATOR OF THYROID HORMONE RECEPTORS

Poirier MB, Laflamme L, Langlois MF. J Mol Endocrinol. 2006 Apr;36(2):313-25. (Facteur d'impact (2005): 3.855)

**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RANBPM, A NOVEL COACTIVATOR
OF THYROID HORMONE RECEPTORS**

Marie-Belle Poirier, Liette Laflamme and Marie-France Langlois; Department of Medicine and Physiology, Division of Endocrinology, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Quebec, Canada.

Corresponding Address (to whom reprints should be requested):

Marie-France Langlois MD,
Department of Medicine, Division of Endocrinology,
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
C.H.U.S., 3001, 12th Avenue North,
Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4.
Tel.: (819) 564-5223
Fax: (819) 564-5292
Email: Marie-France.Langlois@USherbrooke.ca

Keywords: thyroid hormone receptor, nuclear receptors, coactivator, RanBPM, transcriptional regulation

Abbreviated title : RanBPM, a Novel Coactivator of Thyroid Hormone Receptors

ABSTRACT

Thyroid hormone receptors (TRs) are transcription factors members of the nuclear receptor superfamily. The transcriptional activity of TRs is controlled by thyroid hormones and cell specific coregulators. Using the yeast two-hybrid system, we identified RanBPM as a new protein partner for TRs. RanBPM was initially discovered as an interacting partner for Ran, and was also shown to be a protein partner and coactivator of the androgen receptor.

The novel interaction between RanBPM and TR isoforms was addressed by GST pull-down assays and co-immunoprecipitation in intact mammalian cells, where RanBPM was shown to bind TRs in a ligand-independent fashion. We also studied the regions implicated in the interaction with deletion mutants: the principal interacting region of RanBPM is comprised within its carboxyl-terminal end and it binds to the DNA-binding domain of TRs. To investigate the potential role of RanBPM in thyroid hormone action, transient transfections with luciferase reporter genes were performed in CV-1 cells. We found that the overexpression of RanBPM increases the activation of TRETk and DR+4 positive thyroid hormone response elements. Interestingly, overexpression of the truncated protein RanBPM55, which lacks the N-terminal polyglutaminated region but binds TRs with the same affinity, decreased the fold activation by up to 80%. Furthermore, we performed competition assays using transient transfection of RanBPM and increasing amounts of RanBPM55. This experiment revealed that the stimulating effect on TR-transactivation by the full-length protein was inhibited in a dose-dependent fashion by RanBPM55. This suggests that although the polyglutaminated region of RanBPM is not required for the binding to TRs, it is required for the stimulation of TR-transactivation. Taken together, our results provide evidences that RanBPM is a potent novel coactivator for thyroid hormone receptors.

INTRODUCTION

Thyroid hormones (THs) play a critical role in development, growth and metabolism. In addition, they are required for the normal function of most tissues, and have major effects on oxygen consumption and metabolic rate. Thyroid hormone receptors (TR) are very well conserved members of the nuclear receptor (NR) superfamily of ligand-dependent transcription factors. The transcriptional regulation of TH target genes is mediated *via* the binding of TRs to thyroid hormone response elements (TREs) in their promoter region (Yen, 2001). Unlike steroid hormone receptors, like the glucocorticoid (GR) and androgen receptors (AR), that are inactive in the absence of their ligand and found in the cytoplasm bound to heat-shock proteins, TRs are present in the nucleus both in the absence and presence of T₃, and modulate gene expression in both states.

Most target genes that have been extensively studied are positively regulated by TH. In the absence of ligand, TRs are associated with corepressors, like the nuclear receptor corepressor (NCoR), creating a template for the recruitment of histone deacetylases (HDACs) and inhibiting the transcription of the upstream gene (Chen & Evans, 1995, Horlein & Naar, 1995). On the other hand, upon binding to their ligand, conformational changes in the C-terminal TR tail releases corepressor complexes and allow the recruitment of coactivator proteins which loosen the DNA-chromatin structure (McKenna *et al.*, 1999). Chromatin remodelling is a defining step in the transcriptional initiation process essential for gene transactivation. This feature is not inherent to coactivators, like the p160 family that mediate histone acetylation, but is an important event required for subsequent transcription preinitiation complex assembly (Lee *et al.*, 2003) and is necessary for maximal activation of T₃-responsive genes. Another characterized group of chromatin-modifying complexes interacting with TRs, is the ATP-dependent SWI/SNF complex, which disrupt the association of histones with DNA *via* nucleosomal modifications (Huang *et al.*, 2003). Other coactivators enhance the transcription of target genes *via* their ability to recruit components of the basal transcriptional machinery and function as an interface between sequence-specific transcription factors and the general transcription apparatus (Fondell *et al.*,

RanBPM, a Novel Coactivator of Thyroid Hormone Receptors

1999). Although most coregulators identified to date interact with TRs in a ligand-dependent fashion, the interaction of some coregulators, like with GT198 and PSF, is not modified by T₃ (Ko *et al.*, 2001, Mathur *et al.*, 2001). Ligand-dependent transcriptional regulation by TRs is thus a complex process involving the recruitment of various coregulators to the promoter of target genes. In order to better understand TH action, further identification and characterization of transcriptional coregulators is warranted.

Using the yeast two-hybrid (YTH) system, we identified the Ran binding protein in microtubule (RanBPM) as an novel ligand-independent interacting partner for TRs. RanBPM, was first discovered to be an interacting partner of Ran, but its physiological role remains unclear (Nakamura *et al.*, 1998). Ran is a small G protein member of the Ras family, and is responsible of the active transport of macromolecules through the nuclear pore complex (NPC) (Steggerda & Paschal, 2002). RanBPM was recently shown to interact with other NRs: androgen receptor (AR) and glucocorticoid receptor (GR) (Rao *et al.*, 2002). In this report, we describe the interaction of RanBPM with the DNA-binding domain of TRs, and determine its function as a coactivator for thyroid hormone receptors.

MATERIAL AND METHODS

Plasmid Constructions

TR and RanBPM constructions are schematically represented in Figure 1. TR isoforms and the TR β 2 mutants previously described (Langlois *et al.*, 1997) were cloned in frame in the pGEX-4T1 or -4T2 vectors (Amersham Biosciences Inc., Baie D'Urfe, Qc, Canada) by restriction enzyme digestion or PCR. Another GST-hTR β 2 mutant, DBD-only (a.a. 119-221) was produced by PCR amplification of hTR β 2 and inserted into the pGEX-4T1 vector at the *Bam*HI site (Fig.1B). The RanBPM55 cDNA was recovered by YTH screening of a human foetal cDNA library inserted into the pACT-2 vector (Clontech, Palo Alto, CA) and subcloned in pSG5 by restriction enzyme digestion (Stratagene, La Jolla, CA) (Breathnach & Harris, 1983). The full-length cDNA of the human RanBPM protein inserted into pcDEBA was kindly provided by Dr T. Nishimoto from the Kyushu University, Fukuoka, Japan (Nishitani *et al.*, 2001). GST-fusion protein vectors used for production of RanBPM mutant constructions were made by restriction enzyme digestion, as shown in Figure 1D and inserted in pGEX-4T1/2. The expression vector used for the *in vitro* transcription/translation, RanBPM55-pTracer (Invitrogen Canada Inc, Burlington, On, Canada), was originated by PCR amplification and inserted with *Eco*RI and *Not*I. In the transient transfection experiments, the mammalian expression plasmids were pTracer-RanBPM55, pcDEBA-RanBPM90, pSG5-hTR isoforms and the corresponding empty vectors as controls.

The TRETk reporter contains two copies of an idealized positive TRE (pTRE) arranged as a palindrome, upstream of a minimal thymidine kinase promoter and fused to the luciferase gene in the PA3 vector (Chatterjee *et al.*, 1989). The pTRE DR+4 (direct repeat) was also incorporated in the PA3-Luc vector. All insert sequences were confirmed by DNA sequencing.

Yeast Two-Hybrid Screening

A cDNA fragment coding for amino acids 89-220 of the human TR β 2 isoform (Fig. 1A) was cloned into the pAS2-1 vector for expression of a fusion protein with the GAL4 DNA-binding domain (MatchMaker Two-hybrid System-2; BD Biosciences-Clontech, Mississauga, On, Canada). In this system, a human foetal brain cDNA library fused to the GAL4 transactivation domain in the pACT2 expression vector was screened. These constructions were transformed into Y190 yeast strain. Transformants were selected for growth on minimal medium agar lacking tryptophan, histidine and leucine in the presence of 3-amino-1,2,3-triazole. Positive clones were tested by β -galactosidase assays, according to the manufacturer's instructions. Further selection of positive clones was based on their β -galactosidase scores by colony filter-lift after retransformation in yeast. Transformants with the highest scores were then sequenced (Sequencing service, University of Ottawa, On, Canada) and nucleotide comparisons were performed using the GenBank™ database and the BLAST program (NCBI). Clone number 83 (Fig. 1C) represented a cDNA sequence identical to amino acids 146-683 of RanBPM.

RNA Expression Analysis

RNA isolation analysis from CV-1 (*Cercopithecus aethiops*, ATCC #CCL-70), HeLa (*Homo sapiens*, ATCC #CCL-105), HEK-293 (*Homo sapiens*, ATCC #CRL-1573), JEG-3 (*Homo sapiens*, ATCC #HTB-36) and PC12wt (*Rattus norvegicus*, ATCC #CRL-1721) cells was performed according to standard procedures using the TRIzol™ Reagent (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, On, Canada). For each cell type analyzed by Northern Blot, 20 μ g of total RNA was loaded in a MOPS-based gel and transferred on a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Indianapolis, IN). The radiolabelled probe comprising 953 base pairs of the C-terminal end of RanBPM was generated using the Rediprime™ Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences Inc.) and free 32 P-dCTP was discarded with ProbeQuant™ MicroColumns (Amersham Biosciences Inc.). Northern blots were then hybridized at 65°C overnight with the 32 P cDNA probe and revealed by autoradiography. The blot was

RanBPM, a Novel Coactivator of Thyroid Hormone Receptors

then stripped and hybridized with a probe against the human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (hGAPDH) for loading control. Gel-Pro Analyser program, version 4 (MediaCybernetics, Carlsbad, CA) was used for gel analysis.

The expression pattern of RanBPM was also studied using a commercial nylon membrane containing normalized loadings of poly A⁺ RNA of human tissues (MTN blot; BD Biosciences-Clontech). The same RanBPM probe was used following the manufacturer's instructions. The membrane was then stripped and hybridized with a control probe against human ubiquitin cDNA supplied by the manufacturer and resulted in consistent signals for all poly A⁺ RNA dots (*data not shown*). Gel-Pro Analyser program, version 4 was used for gel analysis.

Glutathione S-Transferase Pull-Down Assays

GST-coupled proteins were produced and purified as previously described (Smith & Johnson, 1988). 1-5 µg of purified GST-fusion protein was incubated with 5 µl of *in vitro* translated ³⁵S-labelled protein (TNT kit; Promega, Nepean On). The binding reaction was performed at room temperature with moderate shaking during 2 h in HEMG buffer [40 mM Hepes pH 7.8, 40 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.5 % Triton X-100, 10% glycerol, 1.5 mM DTT], supplemented with 10 mg/ml BSA and protease inhibitors. The reactions were washed five times in non-supplemented HEMG buffer. The bound proteins were subjected to SDS-PAGE analysis and detected by autoradiography. Results shown are representative of at least three independent experiments. Autoradiograms were analysed with the ImageQuant 5.0 Build 050 software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) in order to evaluate the interactions.

Immunoprecipitation and Immunoblotting

HeLa cells, grown in 75mm² Petri dishes supplemented with T₃ (10 nM) or the vehicle alone (Sham) until they reached 80% of confluence, were lysed in a 50 mM Hepes solution containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors. After 30 minutes of incubation on ice followed by centrifugation

at 3000 X g for 15 minutes, supernatants were collected and put at -20°C overnight to complete lysis. Total cell extract concentrations were measured using a standard Bradford assay (Bio-Rad Laboratories). Immunoprecipitation was performed using a rabbit polyclonal IgG antibody raised against chicken TR α 1 but recognizing all human TR isoforms (FL-408; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) (Pellizas *et al.*, 2002). The formation of immuno-complexes was made in the presence or absence of T $_3$; positive control represents 50 μg of HeLa whole cell extracts. After overnight incubation of the pre-cleared sample with FL-408 antibody at 4°C with rocking with T $_3$ (10 nM) or the vehicle alone (Sham), protein G-SepharoseTM (Amersham Biosciences Inc.) was added in the dilution buffer (0.1 % Triton X-100, 0.1 % BSA in Tris saline azide (TSA) buffer [0.1M Tris-HCl, 0.14 M NaCl, 0.025% (w/v) NaN $_3$], and samples were rocked for 2 h at room temperature. After five washes, proteins were resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred on a polyvinylene difluoride membrane (Roche, Laval, Qc, Canada). The membrane was blocked with 5% skim milk, 0.05% Tween-20 in TBS buffer, pH 7.5 and incubated for 2 h at room temperature with the 5M anti-RanBPM antibody of rabbit origin provided by Dr T. Nishimoto from Kyushu University, Fukuoka, Japan (Nishitani *et al.*, 2001). Detection was accomplished using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IGg antibody (Amersham Biosciences Inc.) and enhanced by the BM chemiluminescence Blotting Substrate (ECL, Roche).

Cell Culture and Transient Transfections

The CV-1 cells were maintained in phenol red Dulbecco's Modified Eagle's Medium media supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), with a mix of antibiotics and antimycotics (Life Technologies, Burlington, On, Canada). The day before transfection, cells were seeded in 6-well plates at approximately 10,000 cells per 35mm 2 well. Cells were transfected as described before using the calcium phosphate precipitate technique (Speciality Media, Boston, MA) (Laflamme *et al.*, 2002, Langlois *et al.*, 1997). Into each plate, 100 ng or 500 ng of TR-pSG5, 3 μg of RanBPM55-pTracer,

RanBPM, a Novel Coactivator of Thyroid Hormone Receptors

RanBPM90-pcDEBA or the corresponding empty vectors, and 10 μg of the luciferase reporter gene were used unless otherwise stated. Sixteen hours after transfection, cells were fed with fresh media supplemented with charcoal and resin stripped FBS with the addition of T_3 (10 nM) or the vehicle alone (Sham). Cells were harvested 24-36 hours following the hormonal treatment and processed for luciferase assay; β -galactosidase assays were used initially to assure efficiency of transfection, as previously described (Laflamme *et al.*, 2002, Langlois *et al.*, 1997). Luciferase activity was measured using an EG&G Berthold lumat LB 9507 luminometer. The results from at least three independent experiments each performed in triplicate are displayed as mean \pm SEM.

RESULTS

Identification of RanBPM as an Interacting Partner for TRs

In order to identify novel proteins interacting with TRs, a fragment corresponding to the amino acids 89-220 of TR β 2 (Fig. 1A) was used as a bait to screen a human foetal brain cDNA library. Following the YTH screening, different positive clones were isolated. RanBPM, first described as an interacting protein for Ran (Nakamura *et al.*, 1998, Nishitani *et al.*, 2001), was identified as a strong positive clone on β -galactosidase assays (*data not shown*). The RanBPM clone corresponded to the amino acids 146-683 of RanBPM (RanBPM55) (GenBank accession number: AB008515), which is schematically represented in Figure 1C. This novel interaction with TRs was reconfirmed in yeast cotransformed with the bait using β -galactosidase assays (*data not shown*). The RanBPM protein has multiple domains: its amino-terminal end contains a long stretch of prolines and glutamines referred to as the polyglutaminated region, followed by repeats in *splA* and *Ryr* domain (SPRY) (Ponting *et al.*, 1997), a lissencephaly type-I-like Homology motif (LisH) and a carboxy-terminal to LisH motif domain (CTLH) domain. The SPRY, LisH and CTLH domains have unknown functions but have been previously associated with protein-protein interactions (Adams, 2003, Ponting *et al.*, 1997).

RanBPM is Expressed Ubiquitously

The RanBPM sequence in humans is highly homologous to rodents and is conserved in other mammals (Nishitani *et al.*, 2001). In order to establish the presence of endogenous RanBPM in different cell lines, we conducted a Northern blot analysis (Fig. 2A). Blot analysis shows that RanBPM transcripts are widely expressed in eukaryotic cells lines, as it was also established by others (Nakamura *et al.*, 1998, Nishitani *et al.*, 2001). Accordingly, it shows RanBPM mRNA expression in every cell line tested (Fig. 2A). Within the cell lines we used, RanBPM transcript was the highest in HEK, JEG-3 and HeLa respectively. In CV-1 and PC12wt cells we found the lowest level of RanBPM transcripts compared to hGAPDH in the cellular lines tested.

The expression pattern of RanBPM in different human tissues was also studied using a commercial dot blot membrane of human tissues revealing ubiquitous expression (Fig. 2B). RanBPM transcripts were predominantly found in the testis (blot position F8) and oesophagus (A5). Interestingly, we have also found high expression levels of RanBPM in the whole brain (A1), cerebral cortex (B1) and the frontal lobe (C1).

Characterization of the Interaction between TRs and RanBPM

In order to reconfirm the interaction found in yeast, we performed GST pull-down assays with GST-RanBPM55 and radiolabelled TR isoforms. Figure 3A shows that RanBPM and all TR isoforms interact *in vitro* and that this interaction is specific since the GST alone is not able to significantly precipitate TRs.

Next, we wanted to characterize the regions implicated in the binding of TRs to RanBPM. Since RanBPM was obtained using a portion of TR β 2 as bait, this determination was accomplished using this isoform. We used GST-TR β 2 mutants represented in Figure 1B. Figure 3B shows a representative GST pull-down assay; RanBPM interacts as well with the wild type TR β 2 than the construction lacking the amino-terminal region used in the YTH experiment (TR β 2 1-120 Δ). Furthermore, the construction TR DBD-only was sufficient to precipitate the radiolabelled RanBPM protein (Fig. 3B). Taken together, these results suggest that the DNA-binding domain of TRs is sufficient to bind RanBPM and is the main domain implicated in the interaction.

In order to determine the interacting region within RanBPM, we used different GST-RanBPM constructions (Fig. 1D). The mutant corresponding to the amino acids 409-730 interacts with even more affinity than RanBPM (Fig. 3C). This mutant contains an incomplete CTLH domain and the C-terminal region of RanBPM. The RanBPM mutant corresponding to amino acids 231-409, containing a truncated portion in the C-terminal of the SPRY domain and the complete LisH and CTLH domains, is very weakly interacting with TR β 2. The SPRY domain was previously described to be important for the

interaction between RanBPM and other protein partners (Wang *et al.*, 2002). However, our data suggest that the SPRY and LisH domains are not required for TR-binding.

Since it is well known that many coregulatory molecules interact with TRs in a ligand-dependent fashion (Ko *et al.*, 2002), we tested whether the interaction between RanBPM and TRs was affected by the presence of the ligand. Accordingly, GST pull-down assays were carried out in the presence of increasing concentrations of T₄ and T₃. Results show that RanBPM is associated with both the free and ligand-bound form of the receptor, in physiological and supra-physiological concentrations (Fig. 3D).

RanBPM interacts strongly with the DBD of TRs, a region which shares the highest homology among NRs. We thus studied the interaction between RanBPM and other NRs. In Figure 4, we thus reconfirmed the interaction with AR that was previously reported (Rao *et al.*, 2002), and we demonstrated that RanBPM interacts with ER and that a weak interaction is present with RAR and RXR α .

RanBPM Interacts with TRs in Intact Cells

In order to confirm the presence of this novel interaction *in vivo*, co-immunoprecipitation in intact mammalian cells was accomplished. Lysates from HeLa cells were used, since they endogenously express TRs (Doulabi *et al.*, 2002, Weinberger *et al.*, 1986) and the RanBPM protein (Nishitani *et al.*, 2001). To raise proteins complexes, we used a polyclonal antibody recognizing all TR isoforms (FL-408) or normal rabbit IgG as negative control. We show that the complexes formed by precipitating TRs in living cells contain the RanBPM protein (Fig. 5). Furthermore, physiological (10 nM) and supra-physiological (100 nM, *data not shown*) concentrations of T₃ did not influence the interaction between RanBPM and TRs, in concordance with *in vitro* GST pull-down assays. Therefore, we conclude that the interaction between RanBPM and TR is ligand-independent in intact mammalian cells.

RanBPM is a novel coactivator for thyroid hormone receptors

To help determine the physiological function of this novel interaction in the regulation of TR-responsive genes, we have accomplished transient transfections using luciferase reporter genes. CV-1 cells were chosen since they contain very low levels of TRs (Castillo *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 1997). In Figure 6 is depicted the relative luciferase activity and the fold activation on the TRETk pTRE. Overexpression of RanBPM caused an important increase in hormone-dependent transactivation. RanBPM effect on the transactivation of the reporter gene depended on the TR isoforms studied: the increase in fold activation was 30%, 70% and 190% for TR α 1, TR β 1 and TR β 2 respectively. There was no effect on the ligand-independent repression (LIR) for all TR isoforms. In Figure 7 is represented the results obtained with overexpression of the truncated protein, RanBPM55 that also interacts with TRs but lacks the polyglutaminated region. When overexpressed, RanBPM55 dramatically inhibits the transcription of the reporter gene, and the fold activation diminishes by 80%. Similar results with RanBPM and RanBPM55 were also observed with the DR+4 pTRE (*data not shown*). Therefore, even if the N-terminus region of RanBPM is not required for the interaction with TR to occur, it is essential for TR-mediated transactivation.

RanBPM and RanBPM55 both interacting with TRs, we thus hypothesized that the inhibitory effect of RanBPM55 was due to the competition with endogenous RanBPM present in CV-1 cells. To explore this possibility we designed a competition experiment. In Figure 8 we show the dominant-negative effect of RanBPM55: the stimulating effect of RanBPM on TR-transactivation is gradually abolished by increasing amounts of the truncated protein to the point where it induces repression.

DISCUSSION

In the present study, RanBPM was identified as an interacting partner and coactivator for thyroid hormone receptors. This novel interaction was first confirmed in yeast, followed by GST pull-down studies. We demonstrated that the C-terminal portion of RanBPM is able to bind to the DNA-binding domain of TRs. We have also shown that this interaction occurs *in vivo* by co-immunoprecipitation in intact HeLa cells. Since RanBPM was recently found to be a coactivator for AR and GR (Rao *et al.*, 2002), we reconfirmed its interaction with AR. We also found that RanBPM can bind to ER, but only weakly interacts with RAR α and RXR α . The effect of the ligand on the recruitment of RanBPM was tested *in vitro* and *in vivo*, and in both systems, there was no significant modification of the interaction in the presence of T₃. Therefore, RanBPM is a putative protein partner for TRs.

Investigating the transcriptional effect of this interaction, we performed transient transfections with positive response elements coupled to a reporter gene. The overexpression of RanBPM, which is already present in CV-1 cells, increased reporter gene activity up to 190% the fold activation in presence of physiological amounts of T₃. In addition, overexpression of the N-terminal truncated protein, RanBPM55, diminishes by 80% T₃-induced gene activation. This shows that even if RanBPM55 can bind TRs, it is not acting as an enhancer of transactivation; our hypothesis is that the polyglutaminated region and a complete SPRY domain are needed for the activation of transcription. Additionally, the effect of RanBPM on gene transactivation can be abolished by increasing amounts of RanBPM55, suggesting a competition for TR-binding and a dominant-negative effect of the truncated protein. An important point needs to be raised from these results as to the presence of endogenous expression of RanBPM55 in cells. In the literature, since its first description, Western blots of RanBPM from whole cells extracts show some amounts of a 55-kDa protein, depending on the cell origin and the antibody used (Nishitani *et al.*, 2001). Therefore, the effect of RanBPM could depend on the amount of RanBPM55 also present in a specific cell and counteracting its effect. Most interestingly, this

phenomenon is also observed with variants forms of two nuclear receptor corepressors, NCoR/NCOR1 (Hollenberg *et al.*, 1996, Meng *et al.*, 2005) and SMRT1/SMRT2 (Cote *et al.*, 2004, Malartre *et al.*, 2004), which bear opposite effects on NR-transactivation.

In this paper we have also shown that RanBPM is able to significantly enhance TR-dependent transcription. Moreover, the coactivator effect of RanBPM uncovered here on TR-transactivation has the same magnitude than already established nuclear receptor coactivators. SRC-1 is a ligand-dependent coactivator, first isolated following an YTH experiment using the hinge and ligand-binding domain of the human progesterone receptor (PR) and was shown to stimulate PR, ER and TR transcription (Onate *et al.*, 1995). SRC-1 was later identified as a member of the p160 family of nuclear coactivators (Xu & Li, 2003), increasing transactivation of pTREs by 3-5 fold when overexpressed in CV-1 cells. The amplitude of the stimulating effect of SRC-1 on transcriptional activation is dependent on the nuclear receptor and varies among NRs isoforms. Thus, it is able to mediate a stronger activation, of approximately 100 fold, on ER responsive genes (Takeshita *et al.*, 1997, Takeshita *et al.*, 1998). Additionally, like SRC-1, RanBPM can enhance the transactivation of other NRs, suggesting broader implication for this novel coregulator (Rao *et al.*, 2002).

RanBPM, a 90-kDa Ran-binding protein shares great homology between different species (Nishitani *et al.*, 2001). We have shown that RanBPM is ubiquitously expressed in the cell lines and human tissues we tested (Fig. 2B). The cellular localization of RanBPM is perinuclear and nuclear and thus, is compatible with a transcriptional coregulator function (Nishitani *et al.*, 2001). The physiological functions of this protein remains unclear; it was first reported as interacting with Ran, a small G protein implicated in nucleocytoplasmic shuttling of cargo proteins through the nuclear pore complex (Nakamura *et al.*, 1998, Nigg, 1997). Ran has many protein partners like RanBP1 and RanBP2, but unlike these proteins, no specific role is yet associated with RanBPM in nucleocytoplasmic transport (Nigg, 1997). One possible mechanism explaining the increase of transactivation in the presence of RanBPM could thus be the modulation of the nucleocytoplasmic shuttling of TRs which could be further explored in future studies (Li *et al.*, 2003). Recent observations have shown that TRs

are mainly nuclear, but are also found in the cytoplasm and in the perinuclear region (Hager *et al.*, 2000). RanBPM could modify TR distribution by retention or recycling in the nucleus *via* the binding to the Ran protein, allowing increased nuclear localization and transactivation of TRs. Compatible with this hypothesis is the fact that the DBD of TRs interacts with RanBPM; this region was recently shown to be important for TR export and recycling to the nucleus (Black *et al.*, 2001).

An increasing number of coregulatory proteins, like GT198, P/CAF and PSF, are now shown to bind to the DBD of TRs and new functions are described for this region of the receptor (Black *et al.*, 2001, Ko *et al.*, 2002, Nagaya *et al.*, 1996, Wardell *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 1996, Zechel *et al.*, 1994). The DBD is composed of two zinc finger structures formed by four coordinated cysteine residues. The D-box, located between the first and second cysteines of the second zinc finger, forms a dimerization interface responsible of coordinating configuration and spacing of the homodimers and heterodimers (Zechel *et al.*, 1994). Deletion mutants studies have shown that nuclear import and export of NRs is also mediated in part by a specific region of the DBD (Black *et al.*, 2001), therefore influencing gene transactivation. In addition to its important role in the binding and recognition of the HREs, the DBD is now found to be implicated with many new aspects of NR actions, and needs to be more thoroughly studied.

Others have previously demonstrated that RanBPM interacts with ARs and is able to transactivate their response on different androgen response elements (Rao *et al.*, 2002). However, the interaction between RanBPM and AR is different from what we have found for TRs. The complete SPRY domain was required for AR binding *in vitro*. Furthermore, the luciferase assay results show that the AR-mediated gene activation does not require the polyglutaminated region of RanBPM. The findings that we report here thus contribute further to the understanding of the physiological role of RanBPM.

Our results demonstrate that RanBPM is a novel coactivator of TRs. RanBPM could mediate this effect through different pathways. In addition to a participation in nucleocytoplasmic shuttling, it could act either as a classical coactivator, *via* its interaction with the basal transcriptional machinery or

RanBPM, a Novel Coactivator of Thyroid Hormone Receptors

with complexes responsible for chromatin remodeling. Therefore, it would be of great interest to establish whether RanBPM possesses acetyltransferase activity or if it is able to recruit HAT proteins. Furthermore, it is interesting to note that Ran is able to bind to chromatin *in vivo* and interacts with histones H3 and H4 *in vitro* (Hayashi *et al.*, 1995).

In conclusion, we have identified a new coactivator for TRs and established the regions responsible for the interaction. We believe that RanBPM should be added to the list of NR coregulators, and that it contributes to the isoform-specific and tissue-specific responses to thyroid hormone. Moreover, the fact that RanBPM is not interacting in the same fashion with AR and TRs raises an important issue on receptor specificity. Further investigation needs to be pursued to determine the exact mechanism of action of RanBPM as a coregulator of nuclear receptors.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was presented in part at the 2003 Canadian Diabetes Association/Canadian Society of Endocrinology and Metabolism joint annual meeting and at the 2003 American Thyroid Association Meeting.

We would like to thank Dr T. Nishimoto for the RanBPM expression plasmid and antibody, and Drs L. K. Beitel and F. E. Wondisford for plasmids. We are also grateful to Mrs. Julie Beaudin for technical assistance in some experiments.

FUNDING

This work has been supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-15655 and MOP-67203), and Foundation for Research Into Children's Diseases (Montreal) to MFL. MFL is a Junior 2 clinician researcher of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Schematic representation of (A) the domain structure of TR isoforms, including the amino-terminus, DNA-binding (DBD), hinge and ligand-binding domains (LBD) and identification of the bait used in the yeast two-hybrid screen. **(B)** Representation of the TR mutants used in this study: TR β 2 1-120 Δ , TR β 2 NT, and DBD-only **(C)** Structure of RanBPM and RanBPM55 that contain a polyglutaminated, SPRY, LisH and CTLH domains. **(D)** Representation of RanBPM constructions used in the present study: RanBPM 409-730 and 231-409.

Figure 2: Expression pattern of RanBPM mRNAs in cells lines and human tissues. Analysis of the expression pattern of RanBPM in different carcinoma cell lines and human tissues. **(A)** Northern blot was hybridized with a ^{32}P -labelled cDNA probe representing the C-terminal end of RanBPM followed by autoradiography. The membranes were then stripped and rehybridized with hGAPDH probe as a loading control. Relative expression ratios of RanBPM transcripts were calculated as the percentage of hGAPDH binding after analysis of the blot with the GelPro software. **(B)** A commercial dot blot membrane of human tissues mRNA hybridized with a radiolabelled probe. RanBPM is ubiquitously expressed in adult and foetal human tissues and cell lines.

Figure 3: *In vitro* interaction between thyroid hormone receptors and RanBPM. Analysis of the interaction between different TR constructions and RanBPM using GST pull-down assays. Representative pull-down analysis of GST fusion proteins and ^{35}S -labelled *in vitro*-translated proteins. Percentage of input is included for reference (lane 1) and GST alone was used as a negative control (lane 2). **(A)** All ^{35}S -labelled TR isoforms, TR α 1, TR β 1 and TR β 2, interact directly with GST-RanBPM55. **(B)** Determination of the regions responsible for the interaction of TR β 2 with RanBPM.

TR β 2 deletion mutant 1-120 Δ interacts with similar affinity than TR β 2wt with radiolabelled RanBPM. Also, S³⁵-RanBPM interacts with TR β 2 DBD-only, showing that the DBD of TRs is sufficient for the interaction. (C) Study of the regions of RanBPM important for TR-binding. The C-terminal mutant (409-730) binds more strongly to TR β 2 and the LisH/SPRY domains (231-409) are not necessary for the interaction. (D) *In vitro* interaction between GST-RanBPM55 and radiolabelled TR β 2 is not affected by the presence of the ligand: increasing concentrations of T₃ did not significantly affect the binding of the two proteins.

Figure 4: RanBPM interacts with other nuclear receptors. Representative pull-down analysis of GST fusion proteins and ³⁵S-labelled *in vitro*-translated proteins. Percentage of input is included for reference (lane 1) and GST alone was used as a negative control (lane 2). GST Pull-down analysis of the interactions between GST-RanBPM55 and ³⁵S-labelled members of the nuclear receptor superfamily: hER α , hXR α , hRAR α and hAR. Our assays reconfirm the interaction of RanBPM with hAR, and show that RanBPM interacts with hER α and only weakly with hRAR and hXR α .

Figure 5: RanBPM and thyroid hormone receptors interact *in vivo* in mammalian cells. Co-immunoprecipitation of RanBPM with an anti-TR antibody (FL408), showing interaction in intact mammalian cells. Immunoprecipitation with normal rabbit IgG (Pi) was used as negative control and the positive control represents 50 μ g of HeLa whole cell extract. The immunoblot was revealed using the 5M anti-RanBPM antibody. HeLa cells were supplemented with T₃ (10 nM) or the vehicle alone for 24 hours before cell lysis and during the co-immunoprecipitation study. RanBPM co-immunoprecipitates with TR in HeLa cells and this interaction is not influenced by the presence of T₃.

Figure 6: Determination of the effect of RanBPM of TRETk-luciferase gene reporter level of expression in mammalian cells. CV-1 cells were transfected with RanBPM, the different TR isoforms,

TRETK-LUC reporter gene, and their respective empty vectors. Cells were treated for 24 hours with 10 nMT₃ or the vehicle before harvesting for luciferase assays. **(A)** RanBPM can enhance the activity of the reporter gene as represented in relative luciferase units (RLU). **(B)** RanBPM action on TRETK-LUC represented in fold activation (RLU in the presence of T₃/RLU in the absence of T₃). Results are representative of at least three independent experiments performed in triplicate ± SEM.

Figure 7: RanBPM55 inhibits T₃-transactivation. CV-1 cells were transfected with RanBPM55-pTracer, the different TR isoforms, TRETK-LUC reporter gene, and their respective empty vectors. Cells were treated for 24 hours with 10 nMT₃ or the vehicle before harvesting for luciferase assays. **(A)** RanBPM55 inhibits the activity of the reporter gene as represented in relative luciferase units (RLU). **(B)** RanBPM55 action on the TRETK-LUC represented in fold activation (RLU in the presence of T₃/RLU in the absence of T₃). Results are representative of at least three independent experiments performed in triplicate ± SEM.

Figure 8: RanBPM55 has a dominant-negative effect on TR-transactivation. CV-1 cells were transfected with RanBPM-pcDEBA and increasing amounts of RanBPM55-pTracer balanced with its empty vector (500 ng, 1 µg, 2 µg and 3 µg). TRETK-LUC was used as the reporter gene and TRβ1 isoform as the receptor. Cells were treated for 24 hours with 10 nM of T₃ or the vehicle alone before harvesting for luciferase assays. **(A)** Results expressed in relative luciferase units (RLU) show the stimulating effect of RanBPM (second set of bars) compared to TRβ1 alone (first set of bars). Transfection of increasing amounts of RanBPM55 inhibits the activity of the reporter gene in a dose-dependent fashion and produces a dominant-negative effect. **(B)** Results expressed as fold activation (RLU in the presence of T₃/RLU in the absence of T₃) showing the inhibitory dominant-negative effect of RanBPM. Results are representative of at least three independent experiments performed in triplicate ± SEM.

REFERENCES

- Adams JC 2003 Characterization of a drosophila melanogaster orthologue of muskelin. *Gene* **27** 213-214.
- Black BE, Holaska JM, Rastinejad F & Paschal BM 2001 DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Current Biology* **11** 1749-1758.
- Breathnach R & Harris BA 1983 Plasmids for the cloning and expression of full-length double-stranded cDNAs under control of the SV40 early or late gene promoter. *Nucleic Acids Research* **11** 7119-7136.
- Castillo AI, Sánchez-Martínez R, Moreno JL, Martínez-Iglesias OA, Palacios D & Aranda A 2004 Permissive Retinoid X Receptor/Thyroid Hormone Receptor Heterodimer Allows Stimulation of Prolactin Gene Transcription by Thyroid Hormone and 9-cis-Retinoic Acid. *Molecular and Cellular Biology* **24** 502-513.
- Chatterjee VK, Lee JK, Rentoumis A & Jameson JL 1989 Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **86** 9114-9118.
- Chen JD & Evans RM 1995 A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377** 454-457.
- Cote S, McNamara S, Brambilla D, Bianchini A, Rizzo G, del Rincon SV, Grignani F, Nervi C & Miller WHJ 2004 Expression of SMRTbeta promotes ligand-induced activation of mutated and wild-type retinoid receptors. *Blood* **103** 4226-4235.
- Doulabi BZ, Schiphorst MP, Van Beeren HC, Labruyere WT, Lamers WH, Fliers E, Bakker O & Wiersinga WM 2002 TRβ1 Protein Is Preferentially Expressed in the Pericentral Zone of Rat Liver and Exhibits Marked Diurnal Variation. *Endocrinology* **143** 979-984.
- Fondell JD, Guermah M, Malik S & Roeder RG 1999 Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive coactivators mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the

RanBPM, a Novel Coactivator of Thyroid Hormone Receptors

TATA box-binding protein-associated factors of TDFIID. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **96** 1959-1964.

Hager GL, Lim CS, Elbi C & Baumann CT 2000 Trafficking of nuclear receptors in living cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **74** 249-254.

Hayashi N, Yokoyama N, Seki T, Azuma Y, Ohba T & Nishimoto T 1995 RanBP1, a Ras-like nuclear G protein binding to Ran/TC4, inhibits RCC1 via Ran/TC4. *Molecular Gene & Genetics* **247** 661-669.

Hollenberg AN, Monden T, Madura JP, Lee K & Wondisford FE 1996 Function of nuclear co-repressor protein on thyroid hormone response elements is regulated by the receptor A/B domain. *Journal of Biological Chemistry* **271** 28516-28520.

Horlein AJ & Naar AM 1995 Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377** 397-404.

Huang ZQ, Li J, Sachs LM, Cole PA & Wong J 2003 A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and mediator for transcription. *EMBO Journal* **22** 2146-2155.

Ko L, Cardona GR & Chin WW 2001 Nuclear receptor DBD-interacting coactivator GT198 exerts differential coactivation on F2 and DR4 thyroid hormone response elements. *Program and abstract book, Endocrinology* **P1** 516-521.

Ko L, Cardona GR, Henrion-Caude A & Chin WW 2002 Identification and characterization of a tissue-specific coactivator, GT198, that interacts with the DNA-binding domains of nuclear receptors. *Molecular and Cellular Biology* **22** 357-369.

Laflamme L, Hamann G, Messier N, Maltais S & Langlois MF 2002 RXR acts as a coregulator in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis by thyroid hormone receptors. *Journal of Molecular Endocrinology* **29** 61-72.

Langlois MF, Zanger K, Monden T, Safer JD, Hollenberg AN & Wondisford FE 1997 A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *Journal of Biological Chemistry* **272** 24927-24933.

RanBPM, a Novel Coactivator of Thyroid Hormone Receptors

Lee KC, Li J, Cole PA, Wong J & Kraus WL 2003 Transcriptional activation by thyroid hormone receptor-beta involves chromatin remodeling, histone acetylation, and synergistic stimulation by p300 and steroid coactivators. *Molecular Endocrinology* **17** 908-922.

Li HY, Wirtz D & Zheng Y 2003 A mechanism of coupling RCC1 mobility to RanGTP production on the chromatin in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **160** 635-644.

Lin H-Y, Yen PM, Davis FB & Davis PJ 1997 Protein synthesis-dependent potentiation by thyroxine of the antiviral activity of interferon. *American Journal of Physiology* **273** 1222-1232.

Malartre M, Short S & Sharpe C 2004 Alternative splicing generates multiple SMRT transcripts encoding conserved repressor domains linked to variable transcription factor interaction domains. *Nucleic Acids Research* **15** 4676-4686.

Mathur M, Tucker PW & Samuels HH 2001 PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Molecular and Cellular Biology* **21** 2298-2311.

McKenna NJ, Lanz RB & O'Malley BW 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Review* **20** 321-344.

Meng X, Webb P, Yang Y-F, Shuen M, Yousef AF, Baxter JD, Mymryk JS & Walfish PG 2005 E1A and a nuclear receptor corepressor splice variant (N-CoRI) are thyroid hormone receptor coactivators that bind in the corepressor mode. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102** 6267-6272.

Nagaya T, Kopp P, Kitajima K, Jameson JL & Seo H 1996 Second zinc finger mutants of thyroid hormone receptor selectively preserves DNA binding and heterodimerization but eliminate transcriptional activation. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* **222** 524-530.

Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M & Nishimoto T 1998 When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *Journal of Cellular Biology* **143** 1041-1052.

Nigg EA 1997 Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386** 779-787.

RanBPM, a Novel Coactivator of Thyroid Hormone Receptors

Nishitani H, Hirose E, Uchimura Y, Nakamura M, Umeda M, Nishii K, Mori N & Nishimoto T 2001 Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene* **272** 25-33.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW 1995 Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270** 1354-1357.

Pellizas CG, Montesinos MM, Masini-Repiso AM, Torres AI & Coleoni AH 2002 Differential Modulation of Liver and Pituitary Triiodothyronine and 9-cis Retinoid Acid Receptors by Insulin-Like Growth Factor I in Rats. *Thyroid* **12** 1071-1078.

Ponting C, Schultz J & Bork P 1997 SPRY domains in ryanodine receptors (Ca²⁺)-release channels). *Trends in Biochemical Science* **22** 193-204.

Rao MA, Cheng H, Quayle AN, Nishitani H, Nelson CC & Rennie PS 2002 RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry* **277** 48020-48027.

Smith DB & Johnson KS 1988 Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **15;67** 31-40.

Steggerda SM & Paschal BM 2002 Regulation of nuclear import and export by the GTPase Ran. *Int Rev Cytol* **217** 41-91.

Takeshita A, Cardona GR, Koibuchi N, Suen C-S & Chin WW 1997 TRAM-1, a novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *Journal of Biological Chemistry* **272** 27629-27634.

Takeshita A, Yen PM, Ikeda M, Cardona GR, Liu Y, Koibuchi N, Norwitz ER & Chin WW 1998 Thyroid hormone response elements differentially modulate the interactions of thyroid hormone receptors with two receptor binding domains in the steroid receptor coactivator-1. *Journal of Biological Chemistry* **273** 21554-21562.

Wang D, Li Z, Messing EM & Wu G 2002 Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *Journal of Biological Chemistry* **277** 36216-36222.

RanBPM, a Novel Coactivator of Thyroid Hormone Receptors

Wardell SE, Boonyaratanakornkit V, Adelman JS, Aronheim A & Edwards DP 2002 Jun dimerization protein 2 functions as a progesterone receptor N-terminal domain coactivator. *Molecular and Cellular Biology* **22** 5451-5466.

Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ & Evans RM 1986 The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* **324(6098)** 641-646.

Xu J & Li Q 2003 Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Molecular Endocrinology* **17** 1681-1692.

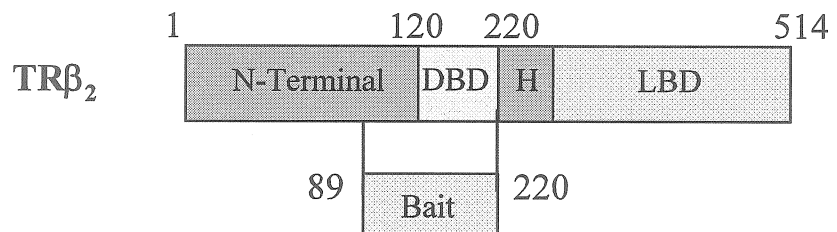
Yang X-J, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH & Nakatani Y 1996 A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382** 319-324.

Yen PM 2001 Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* **81** 1097-1142.

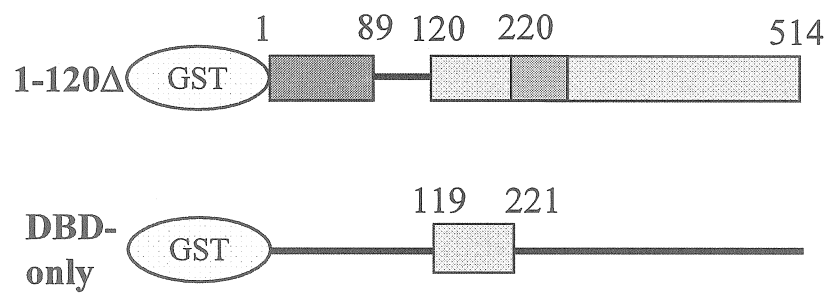
Zechel C, Shen XQ, Chen JY, Chen ZP, Chambon P & Gronemeyer H 1994 The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO Journal* **13** 1425-1433.

Figure 1

A

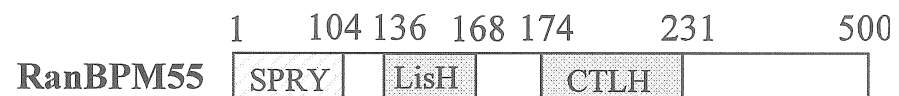


B



C

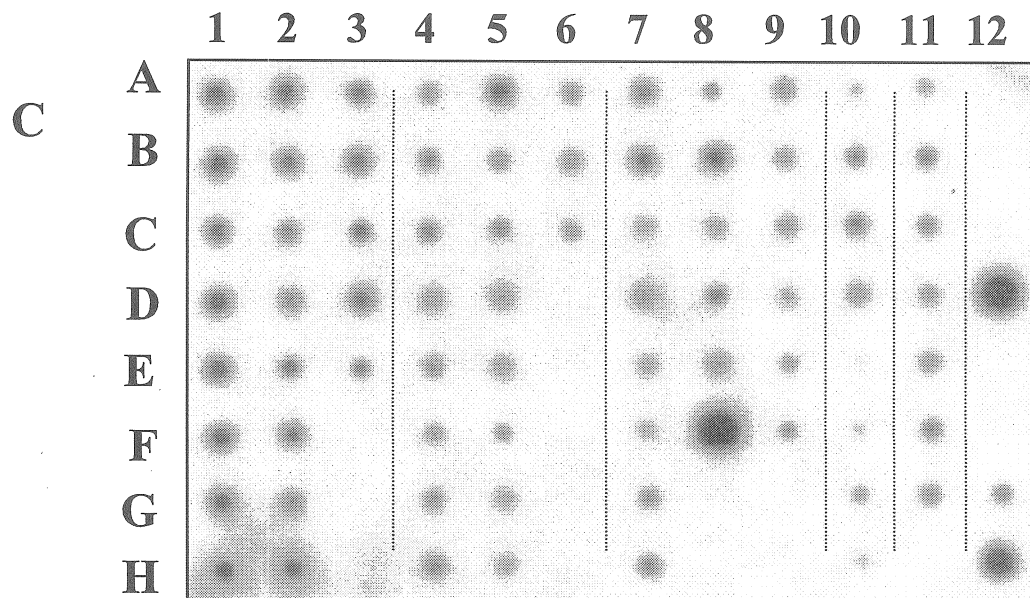
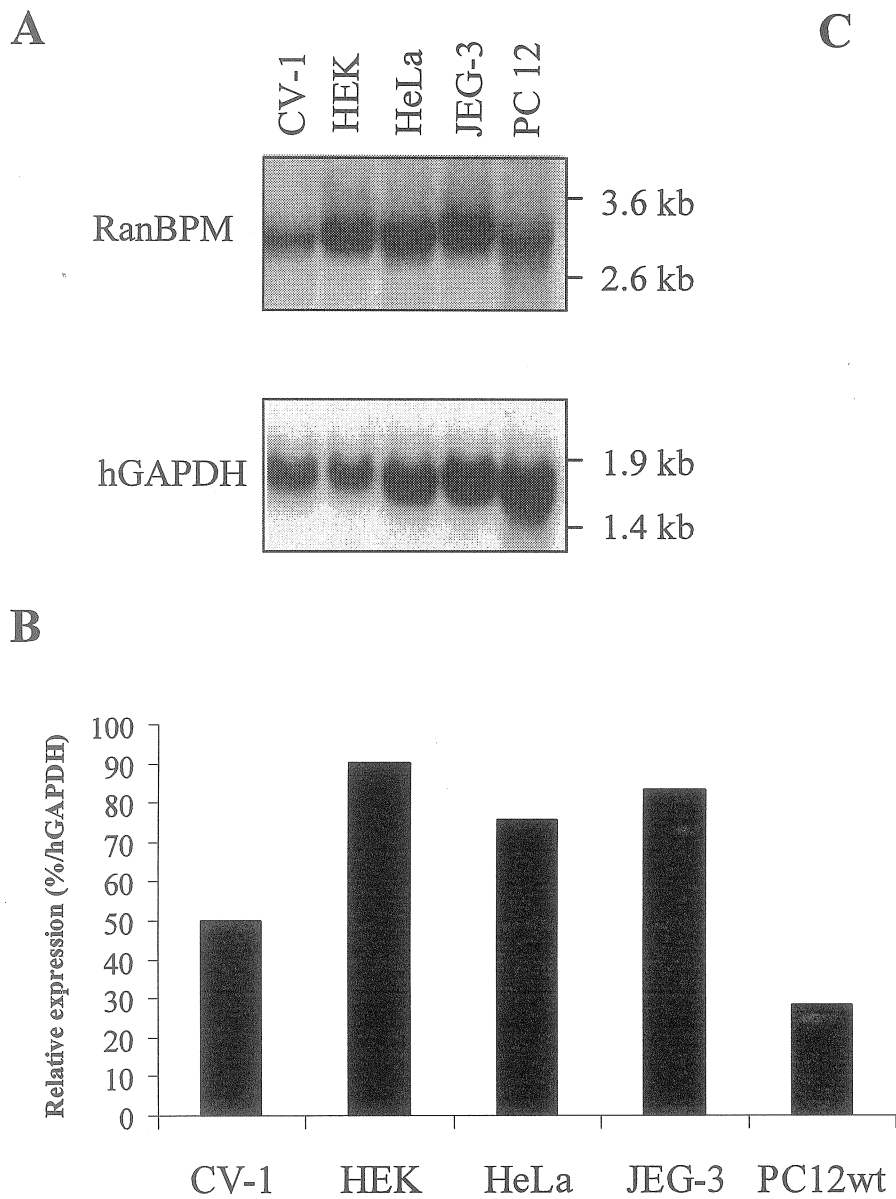
RanBPM



D



Figure 2



A	whole brain	cerebellum, left	substantia nigra	heart	esophagus	colon, transverse	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
B	cerebral cortex	cerebellum, right	nucleus accumbens	aorta	stomach	colon, descending	skeletal muscle	placenta	pancreas	HeLa S3	fetal heart	yeast rRNA
C	frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	<i>E. coli</i> rRNA
D	parietal lobe	amygdala	pituitary gland	atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MGLY-4	fetal liver	<i>E. coli</i> DNA
E	occipital lobe	caudate nucleus	spinal cord	ventricle, left	ileum		peripheral blood leukocyte	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	poly(A)
F	temporal lobe	hippocampus		ventricle, right	ileocecum		lymph node	testis	mammary gland	Burkitt's lymphoma, Daudi	fetal thymus	human G α -T DNA
G	p. g. of cerebral cortex	medulla oblongata		inter-ventricular septum	appendix		bone marrow	ovary		colorectal adenocarcinoma, SW620	fetal lung	human DNA 100 ng
H	pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 100 ng
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Figure 3

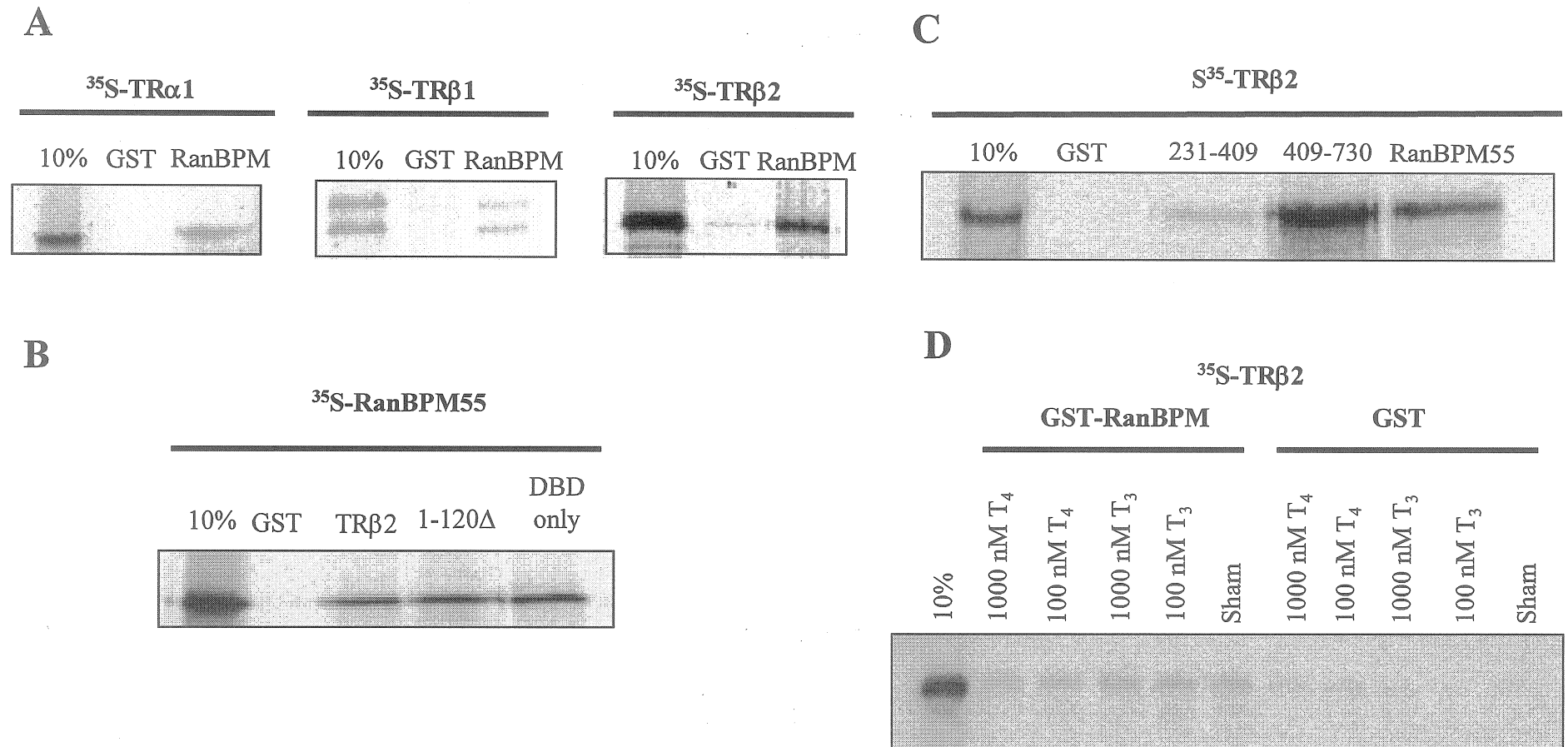


Figure 4

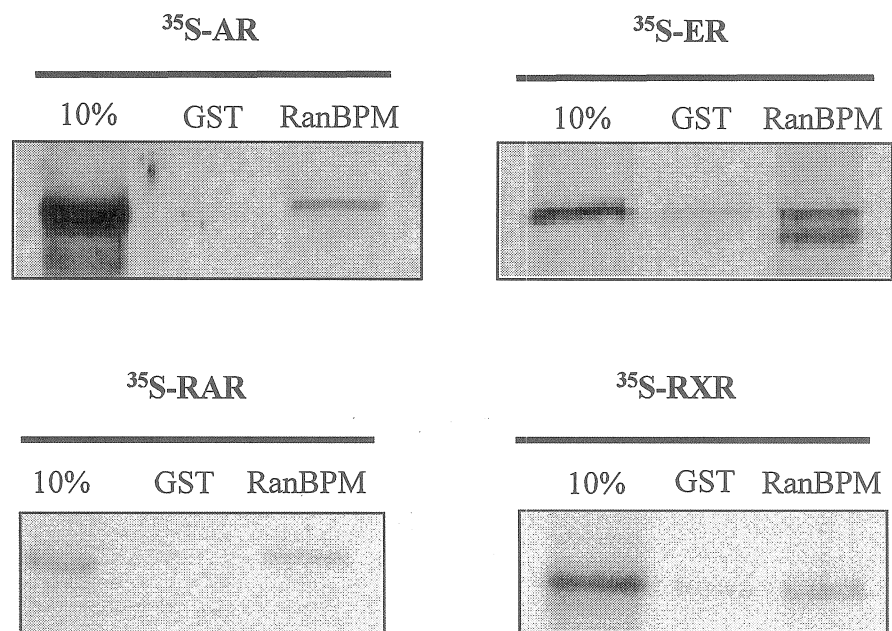


Figure 5

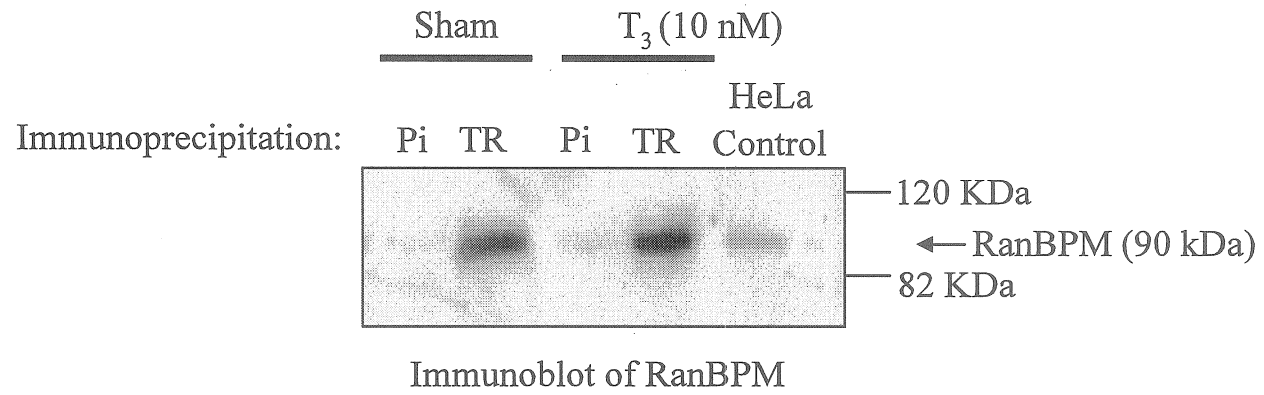


Figure 6

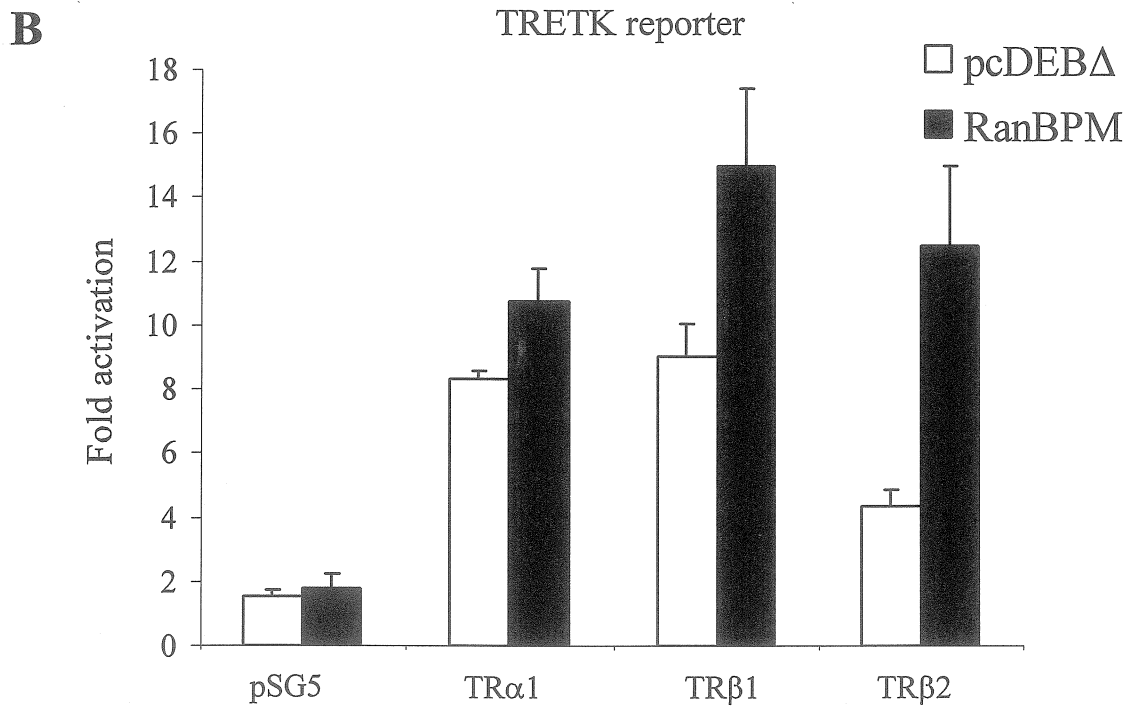
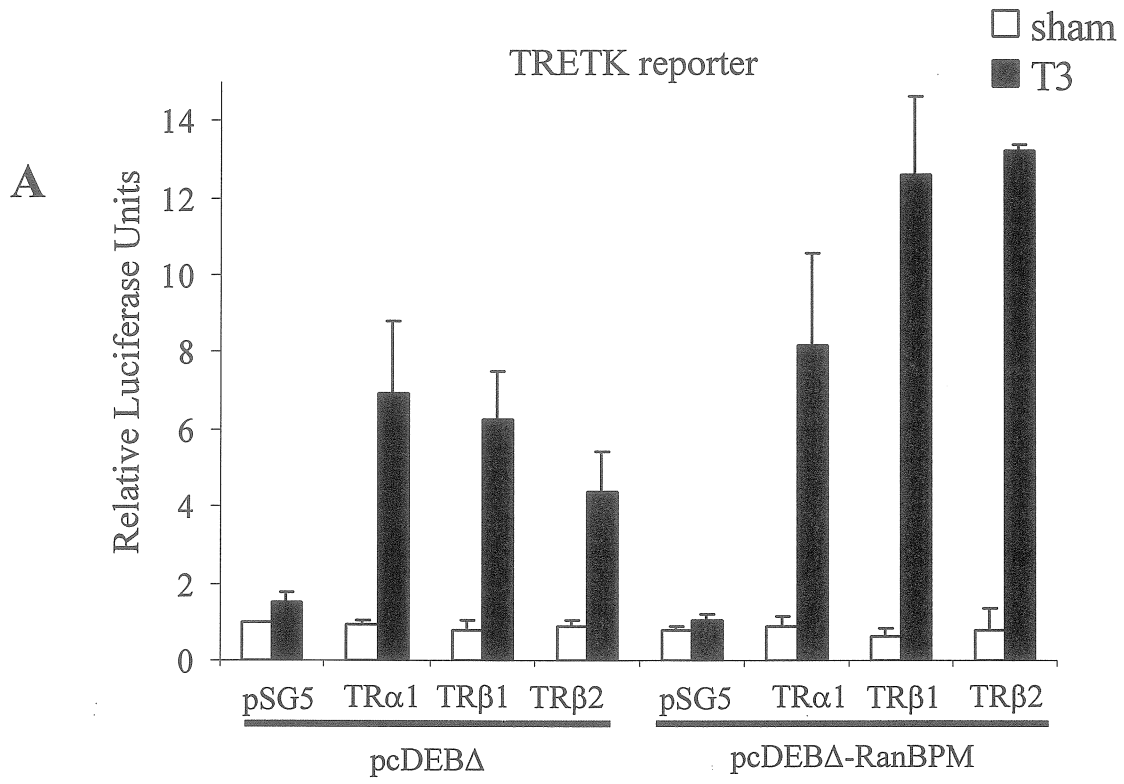


Figure 7

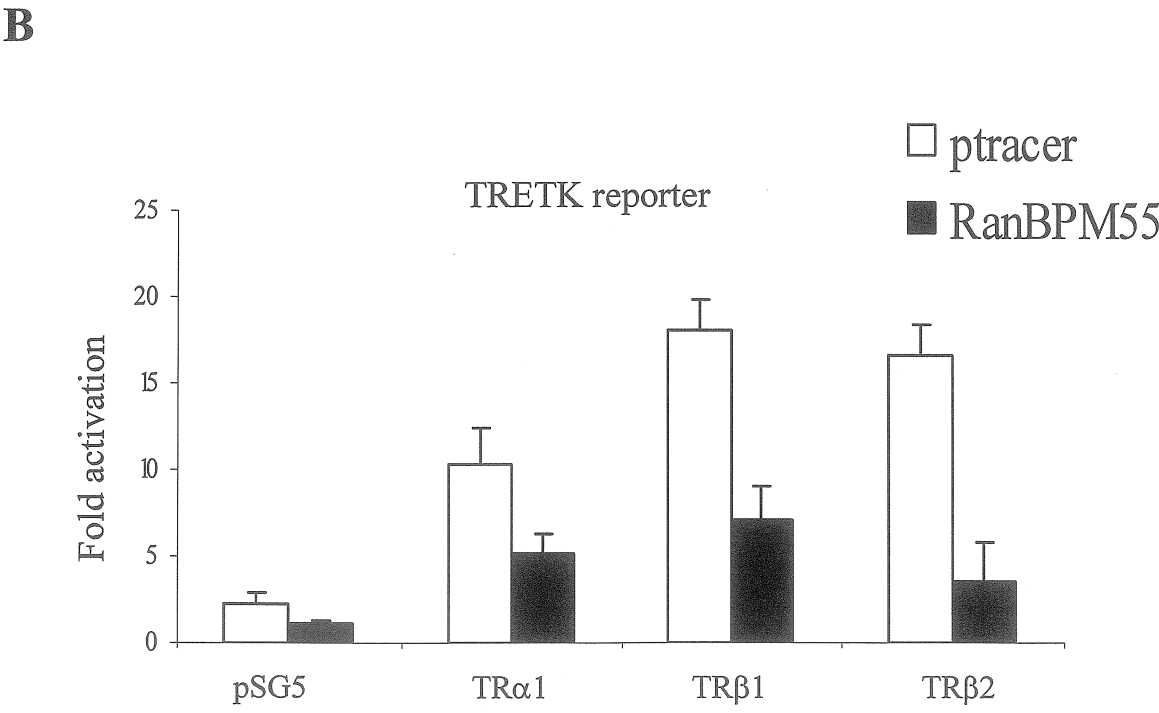
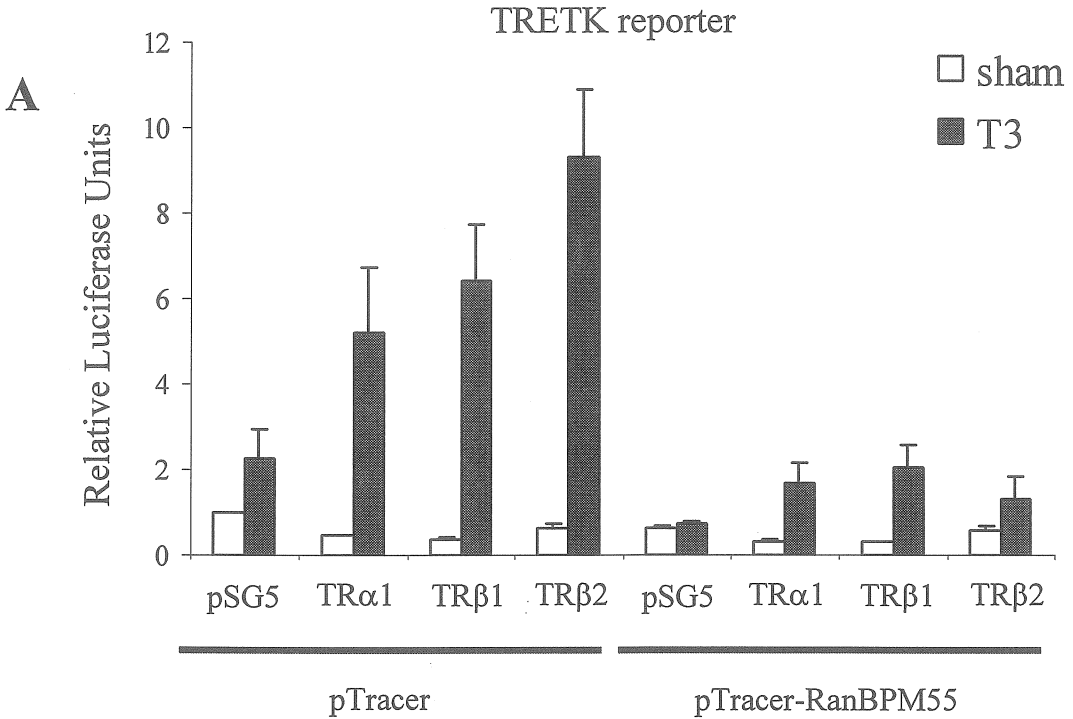
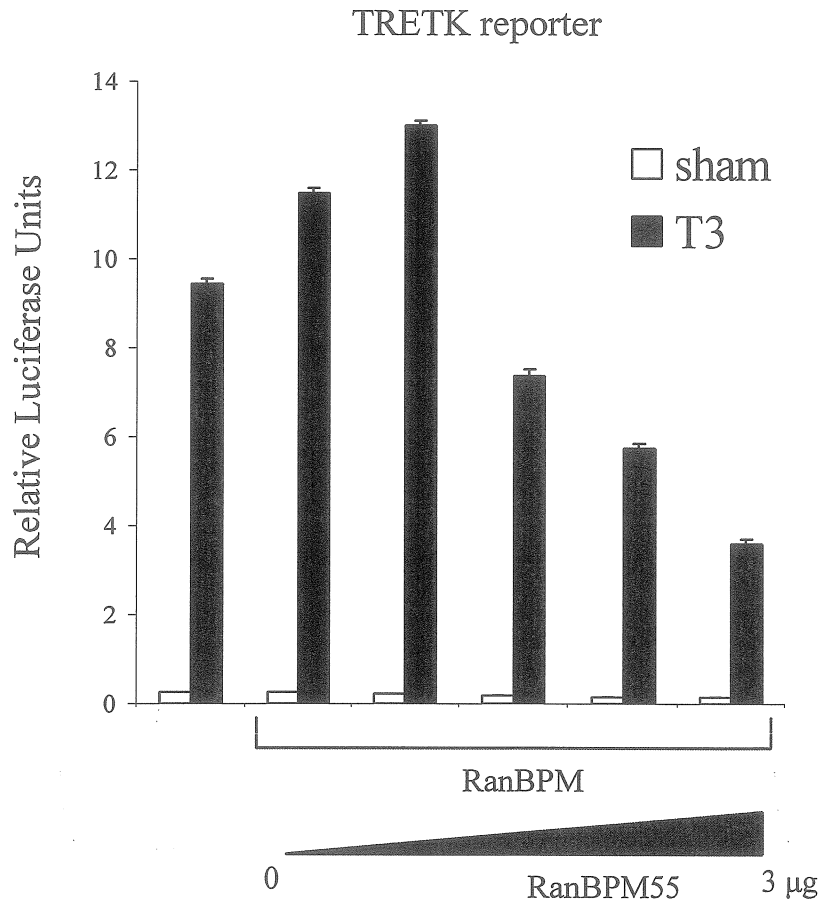
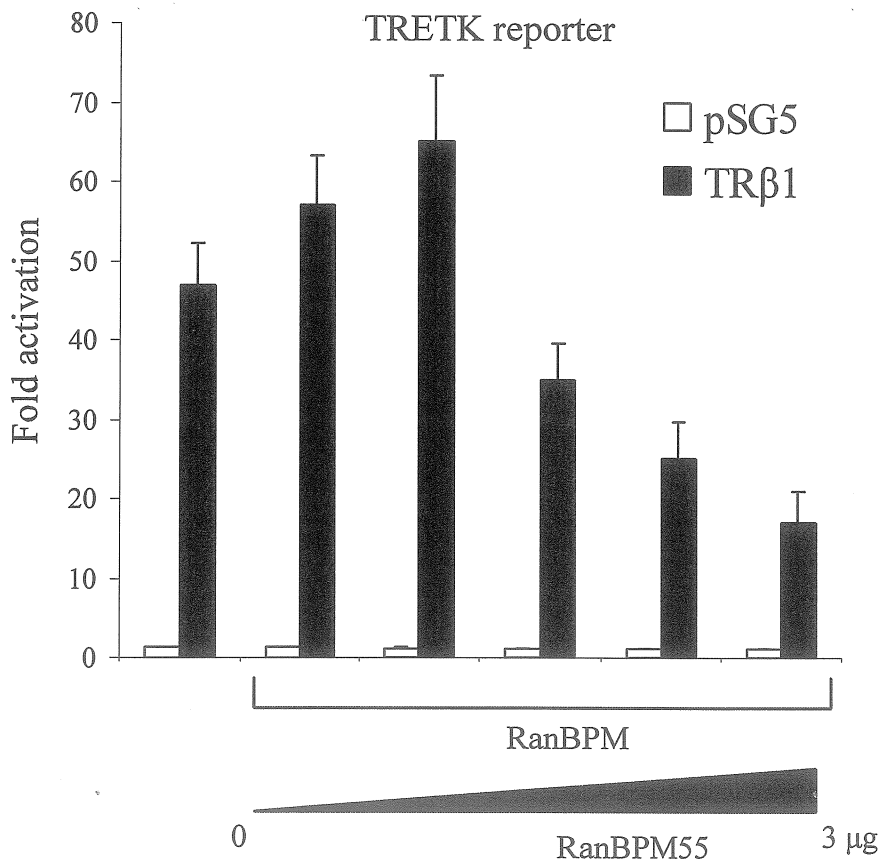


Figure 8

A



B



Article #3

THE IMPLICATION OF RANBPM IN THE REGULATION OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY AXIS BY THYROID HORMONE

Poirier MB, Langlois MF. Soumis à Thyroid, novembre 2006. (Facteur d'impact (2005): 2.175)

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

**The implication of RanBPM in the regulation of the hypothalamic-pituitary axis
by thyroid hormone**

Keywords: thyroid hormone receptors, thyrotropin (TSH), thyrotropin-releasing hormone (TRH), coactivator, RanBPM, nuclear receptors

Abbreviated title: RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

Marie-Belle Poirier; Tel.: (819)820-6868 Ext.: 1-5837 Fax: (819) 564-5292
E-mail address: Marie-Belle.Poirier@USherbrooke.ca

Mylène Brunelle; Tel.: (819)820-6868 Ext.: 1-5837 Fax: (819) 564-5292
E-mail address: Mylène.Brunelle@USherbrooke.ca

Marie-France Langlois; Tel.: (819) 564-5223 Fax: (819) 564-5292
E-mail address: Marie-France.Langlois@USherbrooke.ca

Corresponding Address of all authors:

Marie-France Langlois MD, (to whom reprints should be requested)
Department of Medicine, Division of Endocrinology,
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
C.H.U.S., 3001, 12th Avenue North,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Prior abstract Presentations:

Poirier MB, Langlois MF. The Implication of RanBPM in the Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis by Thyroid Hormones, 6th Scientific Reunion of the Endocrine Physiopathology Axis, Lac Brome, Québec, March 2004.

Poirier MB, Langlois MF. The Implication of RanBPM in the Regulation of the Hypothalamic-pituitary-Thyroid Axis by Thyroid Hormones. 32th Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, Grande-Motte, France, September 2004.

Poirier MB, Langlois MF. The Implication of RanBPM in the Regulation of the Hypothalamic-pituitary-Thyroid Axis by Thyroid Hormones. 76th Annual Meeting of the American Thyroid Association, Vancouver, BC, CANADA, Thyroid, October 2004, abstract #158.

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

Abstract

Background: Thyroid hormones (THs) regulate their own production and secretion by a feedback system involving the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (HPT). Thyroid hormone receptors (TRs) regulate the expression of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) and thyrotropin (TSH) genes. These genes of the HPT axis are negatively regulated by THs and are activated by low levels of THs. Although they are crucial for thyroid hormone homeostasis, the molecular mechanisms responsible for TR-mediated negative regulation of target genes are not completely understood. We have previously identified RanBPM, a ubiquitously expressed 90 kDa polyglutaminated protein, as a coactivator of TRs on positively regulated genes. *Methods:* In order to study the role of RanBPM in the regulation of genes of the HPT axis, we used transient transfections of JEG-3 cells with luciferase reporter constructs of (human TRH and TSH α promoters. *Results:* Using this system, we found that the overexpression of RanBPM increased the transcriptional activity of all TR-isoforms, by a magnitude of 2-fold and 3-fold for the TRH and TSH α promoters respectively. However, since the stimulating effect of RanBPM on TR-transactivation was greater in the absence of ligand, the ligand-dependent repression was statistically diminished for TR β 1 and TR β 2 isoforms on the TRH promoter. Furthermore, the ligand-independent activation of the TR β -isoforms was raised by 180% when they were co-transfected with RanBPM, on both promoters tested. *Conclusions:* RanBPM is thus also able to modulate the transcription nTREs. The effect of RanBPM on stimulating the transcriptional activity of nTREs could reflect an important role of this protein in the regulation of the HPT axis in presence of low levels of THs, which is a crucial step in maintaining TH homeostasis.

Introduction

Thyroid hormone receptors (TRs) are members of the nuclear receptor superfamily (1, for review). They function as ligand-dependent transcription factors through the recognition of thyroid hormone response elements (TREs) generally found in the promoter region of target genes (2, for review). These genes have been reported to be either activated or repressed in the presence of thyroid hormone (TH). The regulation of positive thyroid hormone response elements (pTREs) by TRs has been more extensively studied. The established model refers to the formation of specific coregulator complexes dependent on conformational changes of TRs as the result of TH binding (3). TR interaction surfaces modification results in the selective recruitment of corepressors inducing gene silencing in the absence of ligand (4, 5) and their replacement by coactivators in the presence of T_3 (6).

Thyroid hormone homeostasis is carefully regulated by a negative feedback system, the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. The key factors in the HPT axis are the hypothalamic thyrotropin-releasing hormone (TRH) secreted by neurons in the supraoptic and supraventricular nuclei of the hypothalamus (7) and the thyrotropin (TSH) α - and β - subunits secreted by the thyrotrope cells in the anterior pituitary (8, for review). In the promoter region of the TRH and TSH genes, binding sites for TRs have been characterized (9-11). In the absence of ligand, TRs activate the transcription of TRH and TSH subunits and exert repression in the presence of TH (10, 12). As for pTREs, coregulator proteins are involved in the regulation of nTREs but different mechanisms are implicated (13, for review). However, the mechanisms and protein partners of TRs required in order to fully exert the regulation on nTREs are not entirely uncovered, although it has been estimated that nearly equal numbers of genes are repressed in response to T_3 *in vivo* (14, 15).

Two genes encode thyroid hormone receptors to produce TR isoforms: TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2, and TR β 3 (2, 16). In the HPT axis, the TR-isoforms are not equally expressed: studies have shown that although TR α 1 is present, only the β -isoforms are highly expressed in the hypothalamus and anterior pituitary (17-21). Given the particular expression profile of the β -isoforms, cellular models and transgenic

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

mice studies have also shown their unique ability to regulate the TRH and TSH genes compared to the α -isoforms (22-25). KO mice for the β -isoforms show an inadequate repression of TRH (26, 27) and TSH (28) in the presence of high TH levels, but also an impaired activation of the HTP axis in the presence of low TH. Moreover, there is a rescue of the impaired TRH regulation in TR β -null mice by the tissue-specific overexpression of TR β 1, but not of TR α 1 (26, 29).

The functional specificity of the β -isoforms in the regulation of nTREs resides in their specific N-terminal sequence. The N-terminal portion of TR β isoforms is thought to mediate differential interactions with coregulators which result in their potent ability to repress the transcription in the presence of THs (23). Segments located in the A domain of TR β 2 were determined to be essential in order to mediate the correct transcriptional regulation on both positively and negatively regulated genes (24, 26, 30).

RanBPM (Ran Binding Protein in Microtubule) was first identified as a protein partner of Ran, which plays a central role in the assembly of cargo protein addressed for nucleocytoplasmic transport (31). The RanBPM protein is found in different regions of the brain, including the HPT axis (32-37). We have recently identified RanBPM as a novel coactivator of TRs on pTREs (36). RanBPM is able to interact with TR α 1, TR β 1 and TR β 2, but shows stronger binding to the TR β -isoforms *in vitro* (36). Since RanBPM is a ligand-independent partner of TRs which binds strongly to the β -isoforms, the major players in the negative regulation, we hypothesized that RanBPM could play a role in the regulation of the HPT axis. To investigate this possibility, we used transient transfections of luciferase reporter constructs in JEG-3 cell that endogenously express the retinoid X receptor (RXR) which is an essential coregulator for nTREs (38). In this article, we report the effect of RanBPM on the regulation of the human TRH and TSH α promoters. We found that, as for pTREs, RanBPM activates the transactivation of the β -isoforms on the nTREs studied.

Materials and Methods

Plasmid constructions

The expression plasmids used were pcDEBA-RanBPM90 (39), pSG5-TR isoforms (human cDNA) (24) and the corresponding empty vectors as controls.

The negative thyroid response element (nTRE) reporter constructs included the 5'-flanking sequences from the human TRH (-900/+55) (10), or the common glycoprotein α -subunit (TSH α - 846/+26) downstream of a minimal thymidine kinase promoter and fused to the luciferase gene in the PA3 vector (40).

Cell culture and transient transfections

JEG-3 cells (*Homo sapiens*, ATCC HTB-36) were maintained in minimum essential media (MEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), with a mix of antibiotics (Invitrogen, Burlington, On). The day before transfection, cells were seeded in 6-well plates at approximately 10,000 cells per 35mm² well. Cells were transfected as described before using the calcium phosphate precipitate technique (CellPfect Transfection Kit, Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Qc, Canada) (36, 41). Into each plate, 500ng of TR-pSG5, 3 μ g RanBPM-pcDEBA or the corresponding empty vectors, and 10 μ g of the luciferase reporter gene were used. Sixteen hours after transfection, cells were fed with fresh media supplemented with charcoal and resin stripped FBS with the addition of T₃ (10nM) or the corresponding vehicle. Cells were harvested 24-36 hours following the hormonal-treatment and processed for luciferase assays. Luciferase activity was measured using an EG&G Berthold lumat LB 9507 luminometer. Data are from at least three independent experiments performed in triplicate, and are displayed as mean \pm STDEV. Statistical analyses were performed using the SigmaStat program version 2.03.

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

Results

Effect of RanBPM on the regulation of the TRH promoter

Figure 1 depicts the effect of RanBPM on the regulation of the human TRH promoter in the JEG-3 cell line. In Figure 1A, results are represented in relative luciferase units: in the absence and presence of thyroid hormone, the overexpression of RanBPM significantly increases the transcriptional activity all TR-isoforms studied compared to the empty vector (pcDEBΔ). The magnitude of the stimulation of the transcription by RanBPM versus its empty vector is greater in the absence of T₃ representing a 2.21-fold increase for TRα1, 2.44-fold for TRβ1 and 1.71-fold for TRβ2.

In order to demonstrate the extent of RanBPM overexpression effect on the human TRH promoter the results are also represented as ligand-independent activation (LIA: activity of the TR in the absence of ligand/activity of vector alone in the absence of ligand). In Figure 1B we show that only the LIA of TRα1 is not significantly modified by RanBPM (p=0.138) whereas, the LIA of both TRβ-isoforms tested are significantly increased by RanBPM. An increase corresponding to 184% for TRβ1 and 188% for TRβ2 is produced.

Figure 1C represents the ligand-dependent repression (LDR: activity of the TR in the absence of ligand/activity of TR in the presence of T₃). As a result of the enhanced transcriptional activity of TRs by RanBPM in the presence of T₃, the LDR of all the TRs studied are significantly decreased. Although the transcriptional activity of each TR-isoform is different, the reduction of LDR by RanBPM is of equal magnitude for all TR-isoforms tested and represents a lowering of approximately 20%.

Effect of RanBPM on the regulation of the TSH alpha-subunit promoter

We also tested the effect of RanBPM on the regulation of the human TSHα-subunit promoter. Results represented in Figure 2A show that RanBPM is able to increase the transcriptional activity of all TR-isoforms tested. The effect of RanBPM on the transactivation of the reporter gene in the absence of

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

TH is modulated depending on the TR isoform studied: 1.82-fold for TR α 1, 3.25-fold for TR β 1 and 2.26-fold for TR β 2. RanBPM also increases the transcriptional activity of TRs in the presence of ligand.

Figure 2B illustrates the ligand-independent activation and shows a significant effect of RanBPM on the transcriptional activity of the β -isoforms. Overexpression of RanBPM causes a significant increase of the LIA on the β -isoforms corresponding to 158% for TR β 1 and 180% for TR β 2. As established in the literature, TR β 2 is able to achieve significantly greater ligand-independent activation on nTREs than other TR isoforms. The other TR-isoforms tested here require the presence of the heterodimer partner of TRs, the RXR in order to produce the transcriptional repression in the presence of T₃ (38).

Figure 2C illustrates the LDR of the TSH α promoter. Since the overexpression of RanBPM had a stimulating effect on TRs-transactivation both in the presence and absence of T₃, the resulting LDR is only slightly reduced. Contrary to the effect on TRH regulation, no significant change in the LDR is observed on the TSH- α promoter.

Discussion

In this report we have studied the effect of RanBPM on the regulation of the TRH and TSH α promoters, key factors regulating the HPT axis. Our results show that RanBPM is able to increase the transcriptional activity of TRs on both promoters tested. As expected, the stimulation of TR-transactivation by RanBPM was greater for the TR β -isoforms. This can be explained by the greater ability of the β -isoforms to regulate nTREs, but also by the stronger binding of RanBPM to these specific TR-isoforms (36). Furthermore, this is the first report of a ligand-independent TR-partner that has a stimulating effect on both pTREs and nTREs.

RanBPM transcript is present in different lower organisms, proving its evolutionary links and shows great homology between species (42-44). RanBPM was recently established as a coactivator of thyroid, glucocorticoid and androgen receptors (36, 45). *In vitro* interaction studies showed that RanBPM is also able to interact with other NRs (estrogen receptor, retinoic acid receptors RAR and RXR) (36, 45). The RanBPM protein is expressed ubiquitously and is found in different regions of the brain, including the HPT axis (32-37). This makes the effects of RanBPM on the transcriptional regulation of the HPT that we present in this paper physiologically relevant.

Unknown factors still remain in the regulation of negatively regulated genes by TRs. Furthermore, the HPT axis consists in a very unique cellular context with the expression of specific transcription factors and coregulators. Interestingly, on nTREs, classic NR corepressors paradoxically function as coactivators in the absence of T₃. This phenomenon may be explained by a different conformation adopted by TRs on nTREs compared to pTREs therefore creating allosteric changes in the interaction between TRs, coactivators and corepressors and/or yet to be discovered coregulators (46). Accordingly, binding sites for TRs identified for nTREs do not fall into the typical nucleic acid consensus sequences or the promoter environment that are found for pTREs. Essential players in the regulation of the HPT axis are the corepressors: nuclear receptor corepressor (N-CoR) (5, 47) and the silencing mediator for the retinoid and thyroid hormone receptor (SMRT) (1). In the established model of TR-transactivation on pTREs, they interact with TRs in their ligand-

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

free conformation and mediate transcriptional repression (4, 5). However on the TRH gene the overexpression of N-CoR or SMRT abolishes T_3 -dependent repression (48). In addition, SMRT and, to a greater extent, N-CoR markedly enhance T_3 -independent transcriptional activation of TRH and TSH- α/β genes. Disabling the interaction between N-CoR and TRs by the deletion of the interacting region in TR β prevents the basal-level activation of TRH and TSH α/β genes but retains T_3 -independent transactivation (49). In this case, the corepressors activate the basal transcription rather than suppressing it by the recruitment of histone deacetylases (HDACs) (49, 50). An explicative mechanism by which N-CoR mediates transcriptional activation on nTREs could be *via* the sequestration of HDACs away from the transcription initiation start site (51).

The steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) (52) is another player involved in the regulation of the HPT axis. SRC-1 deficient mice show partial resistance to THs at the level of the pituitary thyrotroph cells (53, 54). They thus display an elevated serum TSH despite high serum levels of T_4 and T_3 . Therefore, it was suggested that SRC-1 may also be required to mediate full expression of the genes negatively controlled by TRs (54).

Since the physiological functions of RanBPM are yet to be discovered, various avenues of investigation are possible regarding the stimulating effect of RanBPM on the transcriptional activity of NRs. Since RanBPM was shown to interact with the TFIID subunit of TAF4 (34), one possible mechanism explaining the effects of RanBPM on TREs is that RanBPM could stimulate NRs transcriptional activity by its interaction with components of basal transcriptional machinery, like the TAF4 subunit of TFIID. Moreover, members of the TAFs protein complexes are crucial for the activity of many transcriptional factors and different NRs including TRs, the vitamin D3 receptor and RAR (55, 56). RanBPM could also favour a relaxed DNA-chromatin environment by an intrinsic HAT activity of RanBPM or *via* the recruitment of classic coregulators, known to have HAT activity.

Another avenue of investigation regards the determination of the influence of RanBPM on the ubiquitination and stability of TR proteins. It was shown that TRs are ubiquitinated both in the absence and presence of hormone and that T_3 -binding induces rapid degradation of TRs mediated by the

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

proteasome (57). However, pharmacological inhibition of the proteasome pathway results in a paradoxical decrease in transcriptional activity of TR β 1, despite increased receptor levels (57). These results suggest that like for other NRs, in addition to the regulation of TR protein stability, the proteasome pathway is essential for optimal T₃-dependent transcriptional activity (58, for review). This is consistent with the fact that components of the proteasome, like ATPases TRIP1 and TBP1, are coactivators for TRs (6). RanBPM was shown to be implicated in protein degradation by the proteasome. It was shown to be a partner of a deubiquitination protein, USP11 (59) and acts as a proteasome degradation protector for p73, a transcription factor (60). It is thus possible that it also affects the protein stability of TRs and increases the amount of receptor available for transcriptional regulation or modifies their activity by non-proteolytic pathways.

The transport and retention of TRs in the nucleus are the first step for their transcriptional activity and provide a first line of modulation of TH action. RanBPM was initially discovered because of its interaction with Ran, which is a key player in the regulation of nucleocytoplasmic transport (31). Therefore the effect of RanBPM on TR-transactivation could also be mediated by its influence on the cellular localization of TRs. Nuclear receptors contain a nuclear localization signal (NLS) in their hinge region (61, 62, for review), and it was shown that the 15 amino acids linker between zinc fingers of the DNA-binding domain (DBD) of nuclear receptors contains a major nuclear exportation signal (NES) for TRs (63). Together, these data suggest that although the NLS is crucial for nuclear import of TRs, NES contained in the DBD (region of specific interaction with RanBPM) of the receptor might be implicated in exportation of the receptor.

It is now clear that TRs do not act alone and require a large network of coregulatory proteins and transcription factors to modulate their activity. This is the first report examining the effect of RanBPM in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis that are negatively regulated by THs. The study of the effect of RanBPM on the human TSH- β promoter was not presented here since this negatively regulated promoter requires the expression of specific pituitary transcription factors, rendering difficulties in the experimental design to allow accurate investigation (64-66). Our results suggest that RanBPM may

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

be implicated in increasing the expression of TRH and TSH genes in situations of thyroid hormone deficiency. The mechanisms underlying the effect of RanBPM remain to be further studied.

Acknowledgments

We would like to thank Dr Takeharu Nishimoto for providing the RanBPM90-pcDEBA expression vector and Dr Fredric E. Wondisford for plasmids. We are also grateful to Mrs Tania Fayad for critical reading of the manuscript. This work has been supported in part by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to MFL (CIHR, MOP-67203). Marie-Belle Poirier is the recipient of the Diana Meltzer Abramsky fellowship of the Thyroid Foundation of Canada. Marie-France Langlois is a Junior-2 Clinician-Researcher of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. This work was presented in part at the 2004 Colloque de la Société de Neuroendocrinologie also to the 2004 American Thyroid Association Meeting and at the 2004 Scientific Reunion of the Endocrine Physiopathology Axis.

References

1. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**:835-839.
2. Yen PM 2001 Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* **81**:1097-1142.
3. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ 1995 A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **378**:690-697.
4. Chen JD, Evans RM 1995 A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**:454-457.
5. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, Rosenfeld MG 1995 Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**:397-404.
6. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine rev* **20**:321-344.
7. Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, Lechan RM 1987 Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* **238**:78-80.
8. Shupnik MA, Ridgway EC, Chin WW 1989 Molecular biology of thyrotropin. *Endocrine Rev* **4**:459-475.
9. Carr FE, Wong NC 1994 Characteristics of a negative thyroid hormone response element. *J Biol Chem* **269**:4175-4179.
10. Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE 1995 The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol* **9**:540-550.

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

11. Breen JJ, Hickok NJ, Gurr JA 1997 The rat TSHbeta gene contains distinct response elements for regulation by retinoids and thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* **131**:137-146.
12. Wondisford FE, Farr EA, Radovick S, Steinfelder HJ, Moates JM, McClaskey JH, Weintraub BD 1989 Thyroid hormone inhibition of human thyrotropin beta-subunit gene expression is mediated by a cis-acting element located in the first exon. *J Biol Chem* **264**:14601-14604.
13. Lazar MA 2003 Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest* **112**:497-499.
14. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong NC, Freaque HC 1987 Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocrine Rev* **3**:288-308.
15. Yen PM, Feng X, Flamant F, Chen Y, Walker RL, Weiss RE, Chassande O, Samarut J, Refetoff S, Meltzer PS 2003 Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO Rep* **4**:581-587.
16. Williams GR 2000 Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* **20**:8329-8342.
17. Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW 1989 Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* **244**:76-79.
18. Bradley DJ, Towle HC, Young WS 1992 Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* **12**:2288-2302.
19. Cook CB, Kakucska I, Lechan RM, Koenig RJ 1992 Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. *Endocrinology* **130**:1077-1079.
20. Lechan RM, Qi Y, Jackson IM, Mahdavi V 1994 Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* **135**:92-100.
21. Alkemade A, Vuijst CL, Unmehopa UA, Bakker O, Vennstrom B, Wiersinga WM, Swaab DF, Fliers E 2005 Thyroid hormone receptor expression in the human hypothalamus and anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:904-912.

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

22. Lezoualc'h F, Hassan AH, Giraud P, Loeffler JP, Lee SL, Demeneix BA 1992 Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,3'-triiodothyronine-dependent inhibition of transcription from the thyrotropin-releasing hormone promoter in chick hypothalamic neurons. *Mol Endocrinol* **11**:1797-1804.
23. Hollenberg AN, Monden T, Wondisford FE 1995 Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem* **270**:14274-14280.
24. Langlois MF, Zanger K, Monden T, Safer JD, Hollenberg AN, Wondisford FE 1997 A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *J Biol Chem* **272**:24927-24933.
25. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE 2001 Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest* **107**:1017-1023.
26. Guissouma H, Dupre SM, Becker N, Jeannin E, Seugnet I, Desvergne B, Demeneix BA 2002 Feedback on hypothalamic TRH transcription is dependent on thyroid hormone receptor N terminus. *Mol Endocrinol* **16**:1652-1666.
27. Dupre SM, Guissouma H, Flamant F, Seugnet I, Scanlan TS, Baxter JD, Samarut J, Demeneix BA, Becker N 2004 Both thyroid hormone receptor (TR) beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **145**:2337-2345.
28. Shibusawa N, Hashimoto K, Nikrodhanond AA, Liberman MC, Applebury ML, Liao XH, Robbins JT, Refetoff S, Cohen RN, Wondisford FE 2003 Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. *J Clin Invest* **112**:588-597.
29. Guissouma H, Ghorbel MT, Seugnet I, Ouatas T, Demeneix BA 1998 Physiological regulation of hypothalamic TRH transcription in vivo is T₃ receptor isoform specific. *FASEB J* **12**:1755-1764.

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

30. Oberste-Berghaus C, Zanger K, Hashimoto K, Cohen RN, Hollenberg AN, Wondisford FE 2000 Thyroid hormone-independent interaction between the thyroid hormone receptor beta2 amino terminus and coactivators. *J Biol Chem* **275**:1787-1792.
31. Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T 1998 When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* **143**:1041-1052.
32. Bai D, Chen H, Huang BR 2003 RanBPM is a novel binding protein for p75NTR. *Biochem Biophys Res Commun* **309**:552-557.
33. Menon RP, Gibson TJ, Pastore A 2004 The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising center. *J Mol Biol* **343**:43-53.
34. Brunkhorst A, Karlen M, Shi J, Mikolajczyk M, Nelson MA, Metsis M, Hermanson O 2005 A specific role for the TFIID subunit TAF4 and RanBPM in neural progenitor differentiation. *Mol Cell Neurosci* **29**:250-258.
35. Cheng L, Lemmon S, Lemmon V 2005 RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* **4**:1102-1110.
36. Poirier MB, Laflamme L, Langlois MF 2006 Identification and characterization of RanBPM, a novel coactivator of thyroid hormone receptors. *J Mol Endocrinol* **36**:313-325.
37. Togashi H, Schmidt EF, Strittmatter SM 2006 RanBPM contributes to Semaphorin3A signaling through plexin-A receptors. *J Neurosci* **26**:4961-4969.
38. Laflamme L, Hamann G, Messier N, Maltais S, Langlois MF 2002 RXR acts as a coregulator in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis by thyroid hormone receptors. *J Mol Endocrinol* **29**:61-72.
39. Nishitani H, Hirose E, Uchimura Y, Nakamura M, Umeda M, Nishii K, Mori N, Nishimoto T 2001 Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene* **272**:25-33.

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

40. Chatterjee VK, Lee JK, Rentoumis A, Jameson JL 1989 Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:9114-9118.
41. Poirier MB, Hamann G, Domingue ME, Roy M, Bardati T, Langlois MF 2005 General receptor for phosphoinositides 1, a novel repressor of thyroid hormone receptor action that prevents deoxyribonucleic acid binding. *Mol Endocrinol* **19**:1991-2005.
42. Klink VP, Wolniak SM 2003 Changes in the abundance and distribution of conserved centrosomal, cytoskeletal and ciliary proteins during spermiogenesis in *Marsilea vestita*. *Cell Motil Cytoske* **1**:57-73.
43. Yao X, Wang HL, Shi ZX, Yan XY, Feng EL, Yang BL, Huang LY 2003 Identification of RanBM interacting with *Shigella flexneri* IpaC invasin by two-hybrid system of yeast. *World J Gastroenterol* **6**:1347-1351.
44. Lin SM, Cheng J, Lu YY, Zhang SL, Yang Q, Chen TY, Liu M, Wang L 2006 Screening and identification of interacting proteins with hepatitis B virus core protein in leukocytes and cloning of new gene C1. *World J Gastroenterol* **12**:1043-1048.
45. Rao MA, Cheng H, Quayle AN, Nishitani H, Nelson CC, Rennie PS 2002 RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **277**:48020-48027.
46. Berghagen H, Ragnhildstveit E, Krogsrud K, Thuestad G, Apriletti J, Saatcioglu F 2002 Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor T3Ralpha from a negative hormone response element. *J Biol Chem* **277**:49517-49522.
47. Kurokawa R, Soderstrom M, Horlein A, Halachmi S, Brown M, Rosenfeld MG, Glass CK 1995 Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* **377**:451-454.

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

48. Becker N, Seugnet I, Guissouma H, Dupre SM, Demeneix BA 2001 Nuclear corepressor and silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors corepressor expression is incompatible with T(3)-dependent TRH regulation. *Endocrinology* **142**:5321-5331.
49. Tagami T, Madison LD, Nagaya T, Jameson JL 1997 Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol Cell Biol* **17**:2642-2648.
50. Sasaki S, Lesoon-Wood LA, Dey A, Kuwata T, Weintraub BD, Humphrey G, Yang WM, Seto E, Yen PM, Howard BH, Ozato K 1999 Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *EMBO J* **18**:5389-5398.
51. Muscat GE, Burke LJ, Downes M 1998 The corepressor N-CoR and its variants RIP3 α and RIP3 δ 1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Res* **26**:2899-2807.
52. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW 1995 Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**:1354-1357.
53. Xu J, Qui Y, DeMayo FJ, Tsai M-J, O'Malley BW 1998 Partial hormone resistance in mice disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* **279**:1922-1925.
54. Takeuchi Y, Murata Y, Sadow P, Hayashi Y, Seo H, Xu J, O'Malley BW, Weiss RE, Refetoff S 2002 Steroid receptor coactivator-1 deficiency causes variable alterations in the modulation of T₃-regulated transcription of genes *in vivo*. *Endocrinology* **143**:1346-1352.
55. Mendus G, May M, Carre L, Chambon P, Davidson I 1997 Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes Dev* **11**:1381-1395.
56. Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG 2002 Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab* **13**:55-60.

RanBPM regulates the hypothalamo-pituitary axis

57. Dace A, Zhao L, Park KS, Furuno T, Takamura N, Nakanishi M, West BL, Hanover JA, Cheng SY 2000 Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:8985-8990.
58. Conaway RC, Brower CS, Conaway JW 2002 Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**:1254-1258.
59. Ideguchi H, Ueda A, Tanaka M, Yang J, Tsuji T, Ohno S, Hagiwara E, Aoki A, Ishigatsubo Y 2002 Structural and functional characterization of the USP11 deubiquitinating enzyme, which interacts with the RanGTP-associated protein RanBPM. *Biochem J* **367**:87-95.
60. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A 2005 Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* **24**:938-944.
61. Ribbeck K, Gorlich D 2001 Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J* **20**:1320-1330.
62. Conti E, Izaurralde E 2001 Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* **3**:310-319.
63. Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM 2001 DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* **11**:1749-1758.
64. Yusta B, Alarid ET, Gordon DF, Ridgway EC, Mellon PL 1998 The thyrotropin beta-subunit gene is repressed by thyroid hormone in a novel thyrotrope cell line, mouse alpha T1 cells. *Endocrinology* **139**:4476-4482.
65. Hashimoto K, Zanger K, Hollenberg AN, Cohen LE, Radovick S, Wondisford FE 2000 cAMP response element-binding protein-binding protein mediates thyrotropin-releasing hormone signalling on thyrotropin subunit genes. *J Biol Chem* **275**:33365-33372.
66. Nakano K, Matsushita A, Sasaki S, Misawa H, Nishiyama K, Kashiwabara Y, Nakamura H 2004 Thyroid-hormone-dependent negative regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone receptors: study with a new experimental system using CV1 cells. *Biochem J* **378**:549-557.

Human TRH promoter (-900/+55)

Figure 1A

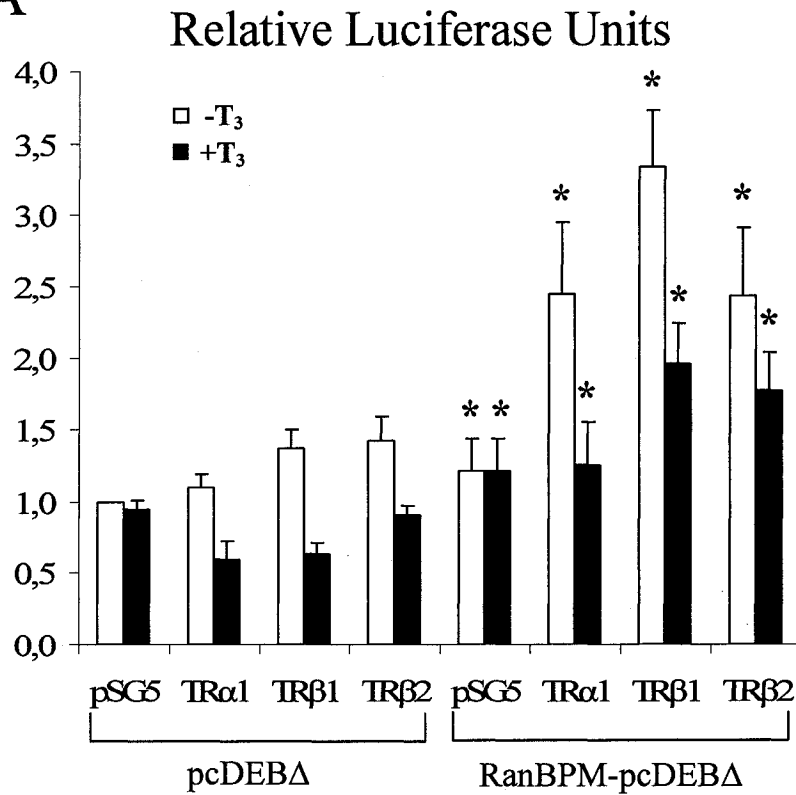
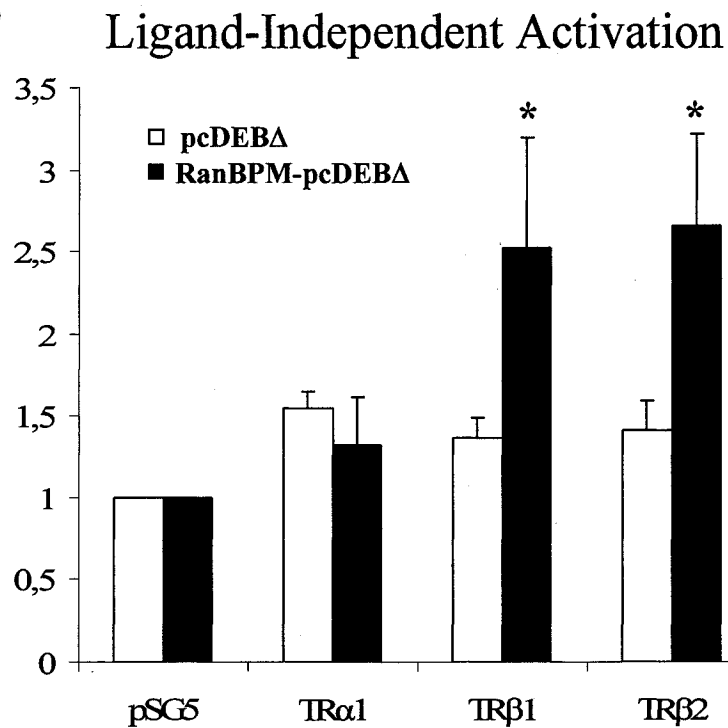
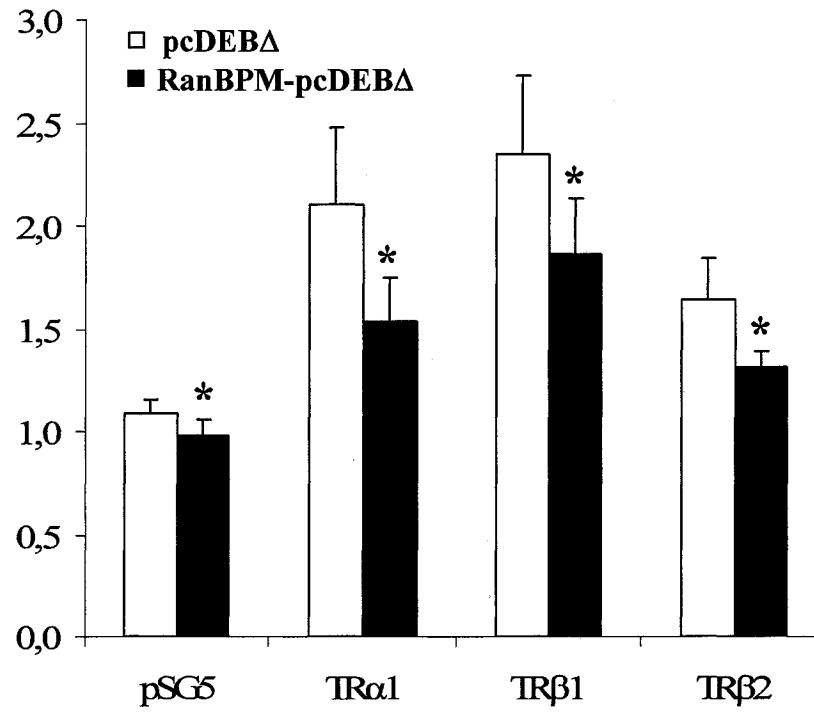


Figure 1B



Human TRH promoter (-900/+55)

Figure 1C Ligand-Dependent Repression



Human TSH- α promoter (-846/+44)

Figure 2A

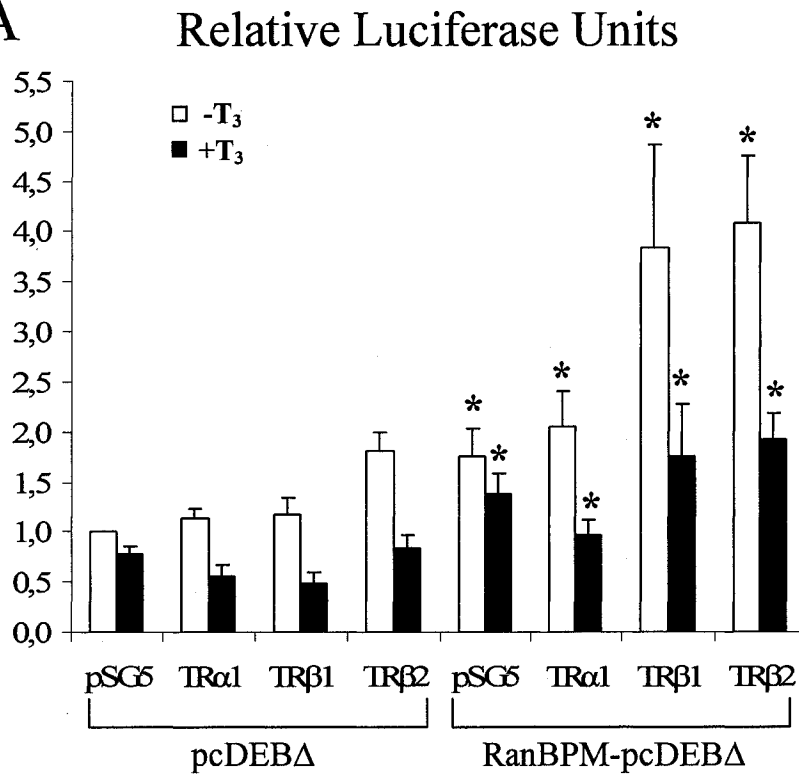
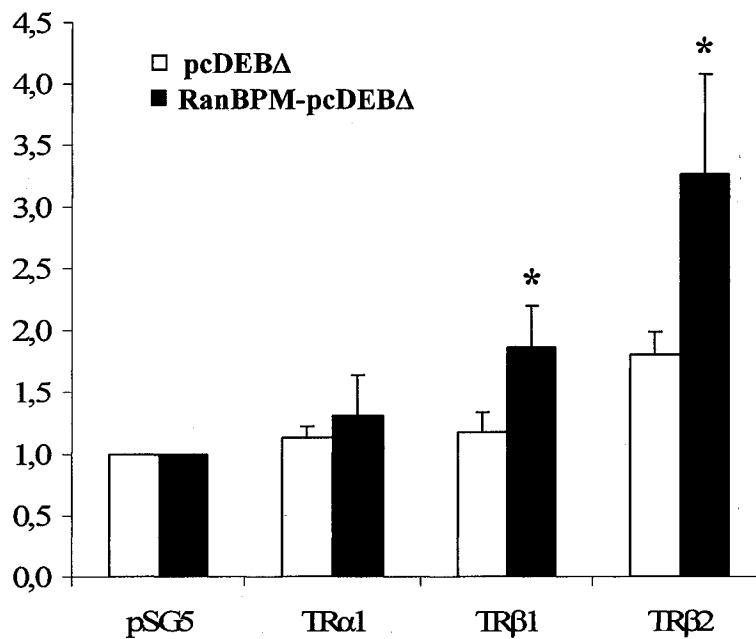


Figure 2B

Ligand-Dependent Activation



Human TSH- α promoter (-846/+44)

Figure 2A Ligand-Dependent Repression

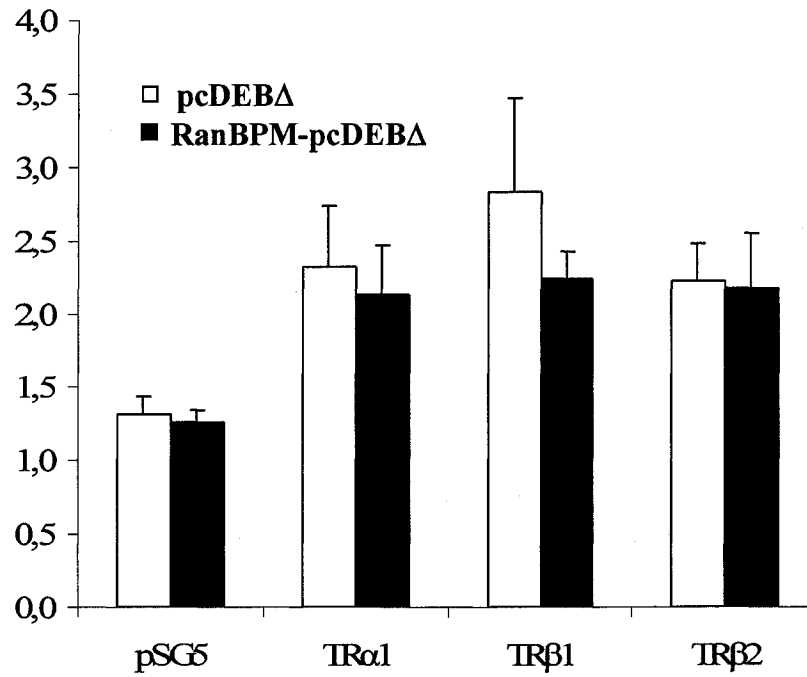


Figure Legends

Figure 1: RanBPM increases the transcriptional activity of TRs on the human TRH promoter. JEG-3 cells were transiently transfected with TRH (-900/+55)-PA3 luciferase reporter gene, TRs-pSG5 and RanBPM-pcDBE Δ or the corresponding empty vectors. **(A)** The results are represented in relative luciferase units (RLU). * $p=0.002$ in the presence of RanBPM-pcDBE Δ compared with the empty vector (pcDBE Δ). **(B)** The effect of RanBPM on TR-transactivation in the absence of T_3 is represented by the ligand-independent activation (RLU TR-pSG5 - T_3 / RLU pSG5 - T_3). * $p=0.005$. **(C)** The ligand-dependent repression (RLU - T_3 / RLU + T_3) * $p=0,047$. Data are from at least three independent experiments performed in triplicate, and are displayed as mean \pm SD.

Figure 2: RanBPM increases the transcriptional activity of TRs on the human TSH- α promoter. JEG-3 cells were transiently transfected with TSH-alpha (-846/+44)-PA3 luciferase reporter gene, TRs-pSG5 and RanBPM-pcDBE Δ or the corresponding empty vectors. **(A)** The results are represented in relative luciferase units (RLU) * $p\leq 0.001$ in the presence of RanBPM-pcDBE Δ compared with the empty vector (pcDBE Δ). **(B)** Ligand-independent activation (RLU TR-pSG5 - T_3 / RLU pSG5 - T_3) * $p=0,005$. **(C)** Ligand-dependent repression (RLU - T_3 / RLU + T_3). Data are from at least three independent experiments performed in triplicate, and are displayed as mean \pm SD.

Partie III

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

10 Résultats complémentaires (1)

10.1 Les *peroxisome proliferator-activated receptors*

Les *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) sont membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (Dendogramme 1 & Tableau 1). Les PPARs possèdent plusieurs isoformes (α , γ et β/δ) (Figure 15) (ISSEMANN et GREEN, 1990, DREYER et al., 1992). Leurs ligands endogènes sont des dérivés lipidiques provenant de la diète comme les acides gras libres et les éicosanoïdes (ROSEN et SPIEGELMAN, 2001). PPAR α est exprimé au niveau de tissus qui effectuent le catabolisme des d'acides gras de manière importante comme le foie, le cœur, le tissu adipeux brun, les reins et l'intestin. Les rôles joués par le PPAR β/δ sont moins connus. On sait qu'il est impliqué dans l'homéostasie des cellules cutanées, du colon et des muscles squelettiques (HARMAN et al., 2004, DI-POI et al., 2004, pour revue). Cette isoforme est aussi impliqué dans l'utilisation des acides gras au niveau musculaire (WANG et al., 2003) et des recherches récentes démontrent qu'il apporte un effet protecteur contre l'obésité en favorisant l'utilisation énergétique par les muscles squelettiques (WANG et al., 2004). Le PPAR γ joue un rôle majeur dans plusieurs phénomènes reliés à l'adipogénèse, dont la distribution et l'oxydation des graisses, le métabolisme du glucose et celui des lipides (DESVERGNE et WAHLI, 1999, FERRE, 2004, SHULMAN et MANGELSDORF, 2005, pour revue). PPAR γ 2 est exprimé de manière exclusive au niveau des adipocytes et PPAR γ 1 est retrouvé dans d'autres tissus comme le foie et les muscles et les cellules immunitaires (RICOTE et al., 1998, SARRAF et al., 1998, MARX et al., 1999, HEVENER et al., 2003, MATSUSUE et al., 2003, NORRIS et al., 2003). Au niveau des adipocytes, PPAR γ est responsable de

l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et des gènes qui régulent la consommation des réserves d'énergie (CHAWLA et al., 1994, TONTONOZ et al., 1994b, TONTONOZ et al., 1994a, HU et al., 1995, BRADLEY et al., 2001). L'état nutritionnel influence l'expression des PPAR γ . On observe une augmentation de leur expression en état post-prandial et en présence d'une diète riche en gras (TONTONOZ et al., 1995, VIDAL-PUIG et al., 1996, SCHOONJANS et al., 1996, MOTOJIMA et al., 1998, GLORIAN et al., 2001, OLSWANG et al., 2002, TORDJMAN J et al., 2003) ainsi qu'une inhibition en état de jeûne (LOPEZ et al., 2003). Des études menées avec des récepteurs hPPAR γ mutants ont démontré leurs rôles dans le développement du syndrome métabolique. Une mutation au niveau du LBD du hPPAR γ qui cause la destruction de l'hélice- α 12, agit comme un dominant négatif au niveau transcriptionnel ce qui résulte en un phénotype de syndrome métabolique sévère (BARROSO et al., 1999, ALTSHULER et al., 2000).

L'élément de réponse des PPAR (PPREs) le plus connu consiste en deux demi-sites de répétitions directes séparés par un nucléotide (DR+1) (KLIEWER et al., 1992b, PALMER et al., 1995). Après la liaison du ligand, les PPAR γ forment un hétérodimère avec le RXR au niveau des PPREs (TONTONOZ et al., 1994b, TONTONOZ et al., 1994a, JUGE-AUBRY et al., 1997). La présence des co-régulateurs est essentielle à l'activité des PPARs (NOLTE et al., 1998, WESTIN et al., 1998). En absence du ligand, les PPAR γ inhibent sous les niveaux de base l'expression des gènes cibles en se liant à des co-répresseurs (HU et LAZAR, 2000, pour revue, SHI et al., 2002). En présence du ligand, ils recrutent des co-activateurs *via* leur AF-2 et stimulent la transcription des gènes cibles (PUIGSERVER et al., 1998, CASTILLO et al., 1999, TOMARU et al., 2006). La famille des thiazolidinédiones (TZDs), des médicaments couramment utilisés dans le traitement du diabète de type II, ont une haute affinité pour les PPAR γ et leur rôle consiste à promouvoir la sensibilité à l'insuline (LEHMANN et al., 1995).

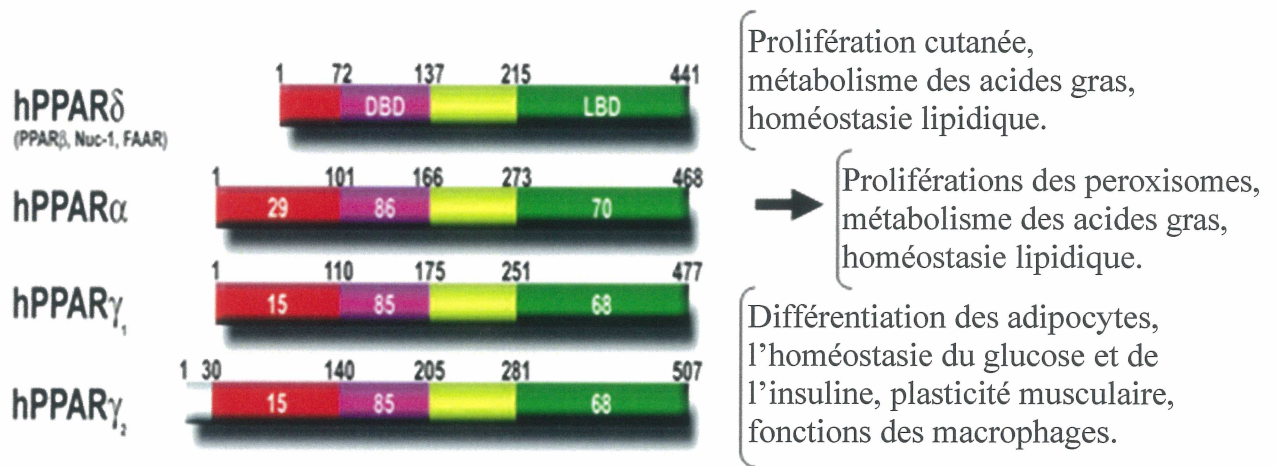


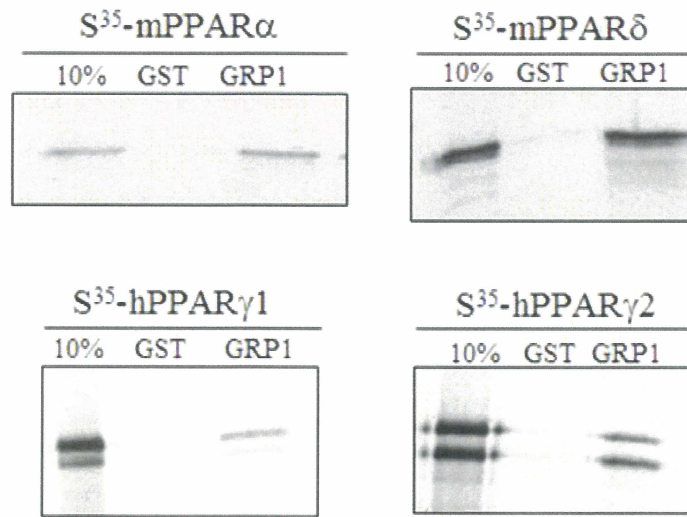
Figure 15. Les différentes isoformes des PPARs et leurs fonctions. Représentation schématique ainsi que les fonctions associées à chacune des isoformes des PPARs (δ/β , α et γ). L'image a été modifiée à partir de : www.endotext.org/male/male3/ch01s04.html.

Les PPARs et les TRs détiennent plusieurs caractéristiques communes. Nos études ont démontré que le DBD constituait un point d'interaction majeur entre GRP1 et RanBPM et les TRs (POIRIER et al., 2005, POIRIER et al., 2006b), nous avons alors voulu déterminer si GRP1 et RanBPM étaient des partenaires d'interaction des PPARs. Les résultats présentés constituent le début d'un projet qui vise à déterminer l'effet des nouveaux co-régulateurs GRP1 et RanBPM sur les rôles joués par les PPARs et plus particulièrement sur les PPAR γ .

10.1.1 GRP1 et RanBPM sont des partenaires des PPARs

Des essais d'interactions *in vitro* effectués selon les protocoles cités dans les articles (POIRIER et al., 2005, POIRIER et al., 2006b) ont permis de déterminer que toutes les isoformes des PPARs interagissent avec GRP1 et RanBPM (Figure 16 A & B). Les domaines importants pour l'interaction ont été étudiés à l'aide de différentes constructions de GRP1 et de RanBPM (Figure 17 & 18). L'analyse des bandes obtenues après autoradiographie démontre que le domaine CC de GRP1 interagit très faiblement avec PPAR γ 1 (Figure 17). Nos résultats antérieurs montraient que le domaine CC de GRP1 était incapable d'interagir avec les TRs (POIRIER et al., 2005). L'interaction entre les PPARs et RanBPM semble également mettre en jeu la même région de RanBPM que nous avons identifiée pour les TRs (POIRIER et al., 2006b). Suite à l'analyse des bandes, la construction C-Ter de RanBPM qui contient le motif CTLH et CRA, interagit plus fortement avec PPAR γ 2 que RanBPM55 (Figure 18).

A



B

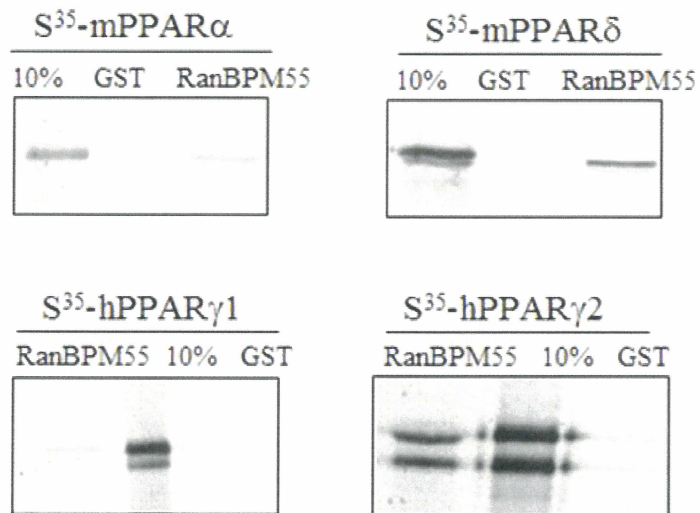


Figure 16 : GRP1 et RanBPM sont des partenaires de toutes les isoformes des PPARs.
Essais de précipitation à la GST représentatifs (n=3). Pour chaque expérience, 5 μ l ou 10 μ l de protéine PPAR radiomarquée ont été incubées avec 5 μ l de GRP1-GST ou 20 μ l RanBPM55-GST.

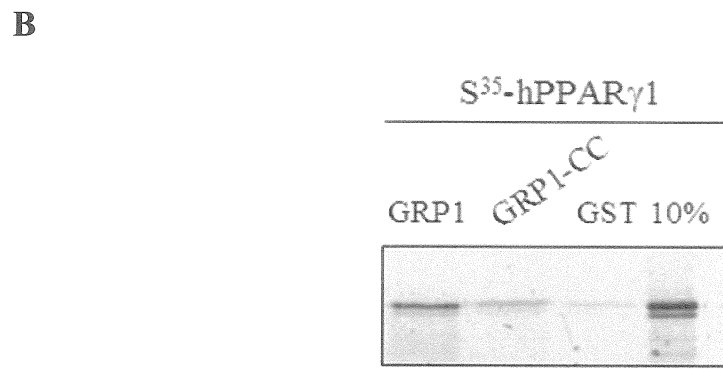
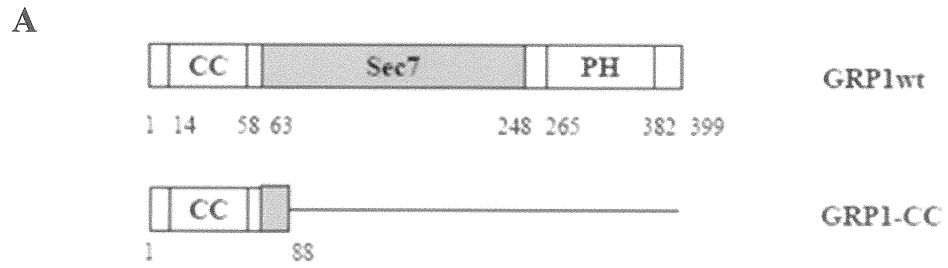
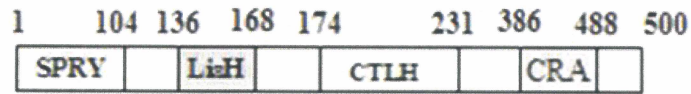
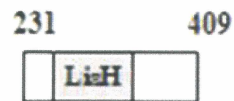


Figure 17 : Le domaine CC de GRP1 interagit très faiblement avec l'isoforme PPAR γ 1. Essai de précipitation à la GST représentatif (n=2). Pour chaque expérience, 5 μ l de l'isoforme PPAR γ 1 radiomarquée a été incubée avec 5 μ l de GRP1-GST ou GRP1-CC-GST.

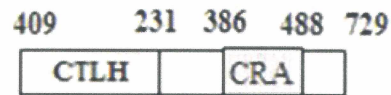
A



RanBPM55



RanBPM N-Ter



RanBPM C-Ter

B

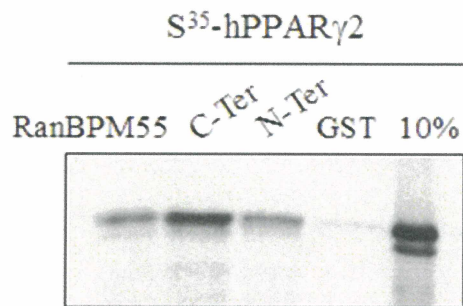
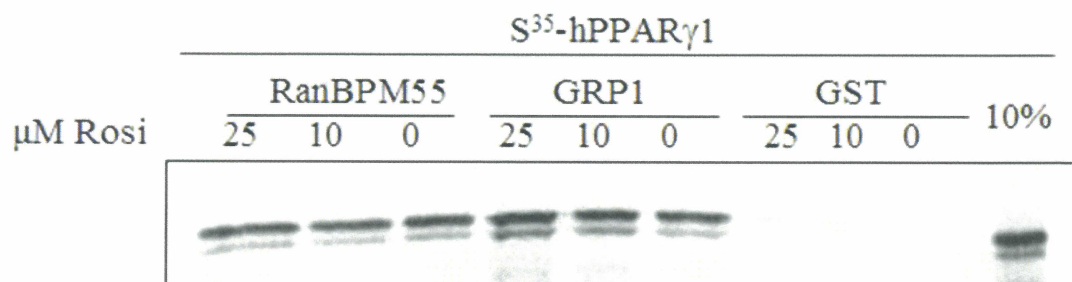


Figure 18 : La région carboxy-terminale de RanBPM interagit fortement avec PPAR γ 2. Essai de précipitation à la GST représentatif (n=2). Pour chaque expérience, 5 μ l de l'isoforme PPAR γ 2 radiomarquée a été incubée avec 20 μ l et 10 μ l de RanBPM55-GST et N-Ter/C-Ter-GST respectivement.

Par la suite, nous avons étudié l'effet d'une dose croissante de rosiglitazone (Rosi) par rapport au véhicule (H₂O) sur l'interaction entre PPAR γ 1 et les nouveaux co-régulateurs des TRs que nous avons identifiés (Figure 19). La Rosiglitazone fait partie de la famille des TZDs, des agonistes des isoformes PPAR γ (Figure 19B). Suite à l'analyse de l'intensité des bandes obtenues après autoradiographie, aucune différence significative n'a été décelée dans l'interaction en présence ou en absence de Rosiglitazone (Figure 19A). Donc, GRP1 et RanBPM semblent être des partenaires d'interaction des PPARs qui ne sont pas sensibles à la Rosi. Ces résultats ont été présentés à la 8^{ième} journée scientifique de l'équipe de physiologie endocrinienne (mai 2006, Canton de Magog, Qc, CANADA) et au Keystone Symposia, Nuclear Receptors: Orphan Brothers (mars 2006, Banff, Alb, CANADA).

A



B

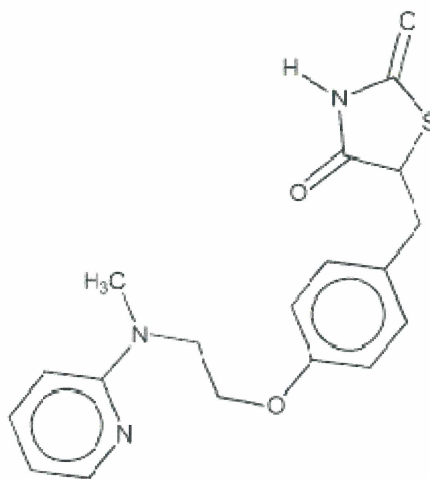


Figure 19 : L'interaction entre GRP1 et RanBPM et PPAR γ 1 n'est pas influencée par la rosiglitazone. (A) Essais de précipitation à la GST représentatifs (n=3). Pour chaque expérience, 5 μ l de l'isoforme PPAR γ 1 radiomarquée a été incubée avec 5 μ l et 20 μ l de GRP1-GST et RanBPM55-GST respectivement avec une dose croissante de rosiglitazone (Rosi). **(B)** Structure moléculaire de la rosiglitazone. L'image provient de : http://www.3dchem.com/more_molecules.asp?ID=265&othername=Avandia.

11 Résultats complémentaires (2)

Dans le but de mieux comprendre par quel(s) mécanisme(s) RanBPM apporte un effet stimulateur sur l'activité transcriptionnelle des TRs, nous avons d'abord étudié si RanBPM était capable d'interagir avec certains co-régulateurs connus des NRs. Par la suite, l'effet de RanBPM en combinaison avec certains co-activateurs a été étudié par des essais transcriptionnels sur l'isoforme TR β 1 avec un pTRE (le palindrome, TRETk) couplé au gène rapporteur de la luciférase.

11.1 RanBPM interagit avec des co-régulateurs des récepteurs nucléaires

RanBPM *via* la construction C-Ter interagit *in vitro* avec tous les co-activateurs membres de la famille p160, soit; SRC-1, SRC-2 et SRC-3 (Figure 20A). Par d'autres essais, nous avons découvert que cette même construction de RanBPM interagit *in vitro* avec SMRT (Figure 20B). Par contre, RanBPM55 ou sa construction C-Term (a.a. 409-729) n'interagissent pas avec le CBP/p300 de source murine (Figure 20C). Les essais de précipitation à la GST, ont été effectués selon le protocole cité dans les articles (POIRIER et al., 2005, POIRIER et al., 2006b).

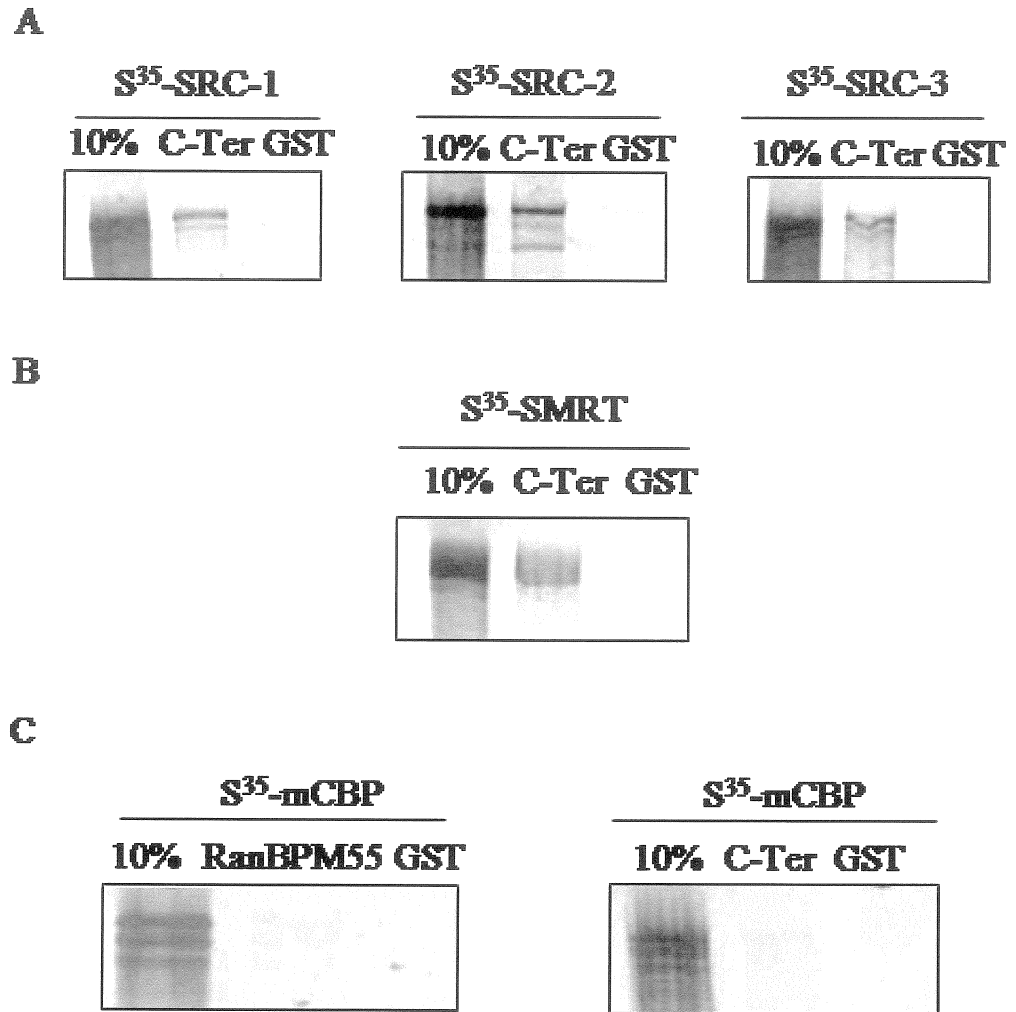


Figure 20 : RanBPM interagit avec plusieurs co-régulateurs des NRs. (A) RanBPM interagit avec tous les co-activateurs membres de la famille SRCs. (B) La construction C-Ter de RanBPM interagit avec le co-répresseur SMRT. Essais de précipitation à la GST représentatifs (n=3). (C) RanBPM55 ou la construction C-Ter n'arrivent pas à précipiter le mCBP. Pour chaque expérience, 5 μ l et 10 μ l de protéines radiomarquées SRCs/mCBP et SMRT respectivement ont été incubées avec 10 μ l de C-Ter-GST ou 20 μ l RanBPM55-GST.

11.2 L'effet de RanBPM en combinaison avec des co-activateurs connus

11.2.1 Introduction

Dans le but de mieux comprendre le rôle de RanBPM en lien avec les co-activateurs classiques comme SRC-1 et CBP, nous avons effectué des essais transcriptionnels avec le gène rapporteur de la luciférase dans les cellules humaines HEK-293 (ATCC# CRL-1573). Les cellules HEK-293 sont un modèle cellulaire couramment utilisé dans les études de l'activité transcriptionnelle des NRs (GUARDIOLA-DIAZ et al., 1999, TAGAMI et al., 1997, HATZIVASSILIOU et al., 2003). La protéine RanBPM y est exprimée de manière endogène (POIRIER et al., 2006b). Cette ligné cellulaire est fréquamment utilisée dans des études concernant l'activité transcriptionnelle des TRs (HATZIVASSILIOU, et al., 2003, LIU et al., 2005a, WEBER et al., 2002).

11.2.2 Matériels & Méthodes

Les cellules HEK QBI sont maintenues à 37°C à 5% dioxyde de carbone (CO²) [milieu *Dulbecco minimum essential medium* (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin (FBS) contenant 2 mM de L-glutamine, 1.5g/L de sodium bicarbonate, et 1.0 mM sodium pyruvate]. La veille de la transfection, approximativement 2,500 cellules sontensemencées dans chaque puits de 3,6 mm. Les cellules sont ensuite transfectées par la technique du phosphate de calcium tel que décrit dans (POIRIER et al., 2005, POIRIER et al., 2006b, POIRIER et al., 2006a). Dans chaque plaque de 6 puits (Sham/T₃ en triplicatat) un total 150 ng de TRβ1-pSG5, 250 ng de RanBPM-pcDEBΔ, 1 μg de SRC-1-pCRII ou mCBP-pSG5 et 2 μg de TRETk-pA3 pTRE couplé au gène rapporteur ont été transfectés ainsi que les vecteurs vides correspondants. 16 heures après la transfection, les milieux de culture sont remplacés par du milieu frais contenant du FBS dont les hormones ont été retirées par un traitement au charbon activé et à la

résine échangeuse d'anions (AG® 1X8 Resin, 200-400 Mesh, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules CA), puis, supplémenté avec la T₃ (10 nM) ou le véhicule seul (Sham). Les cellules sont lysées 24-36 heures suivant le traitement hormonal et l'activité luciférase est mesurée à l'aide d'un luminomètre (EG&G Berthold lumat LB 9507).

11.2.3 Résultats

L'isoforme TRβ1 a été choisie pour cette étude car elle produit une activation importante des pTREs en présence de T₃ et qu'elle bénéficie d'un contact supplémentaire avec SRC-1 au niveau de son domaine AF-1 (WEISS et RAMOS, 2004, pour revue). Nous avons d'abord déterminé que RanBPM avait un effet transcriptionnel sur le pTRE TRETk au niveau des cellules HEK-293 aux mêmes concentrations utilisées dans les cellules CV-1 lors de nos travaux antérieurs (LAFLAMME et al., 2002, POIRIER et al., 2005, POIRIER et al., 2006a) (Figures 21 et 22). La concentration d'ADN des co-activateurs à être transfectée fut établie par des essais dose-réponse. Nous avons identifié ainsi des concentrations d'ADN pour lesquelles SRC-1 et CBP provoquaient la stimulation de l'activité transcriptionnelle de TRβ1 à des niveaux médians pour ne pas causer un embourbement transcriptionnel.

Nos résultats démontrent que l'addition de RanBPM et de SRC-1 produit un effet synergique significatif au niveau de l'activité transcriptionnelle des TRs (figure 21). C'est-à-dire que l'activation générée par la présence conjointe de SRC-1 et RanBPM est plus grande que la somme de l'activation provenant de SRC-1 et RanBPM séparément ($\dagger p=0.011$). Par la suite nous avons étudié l'effet de RanBPM en combinaison avec CBP qui n'est pas un partenaire d'interaction de RanBPM *in vitro* (Figure 20B). La co-transfection de RanBPM et CBP crée un effet additif sur l'activité transcriptionnelle de TRβ1. C'est-à-dire que l'effet correspond à la somme du pouvoir stimulant de RanBPM et mCBP sur l'activité transcriptionnelle de TRβ1.

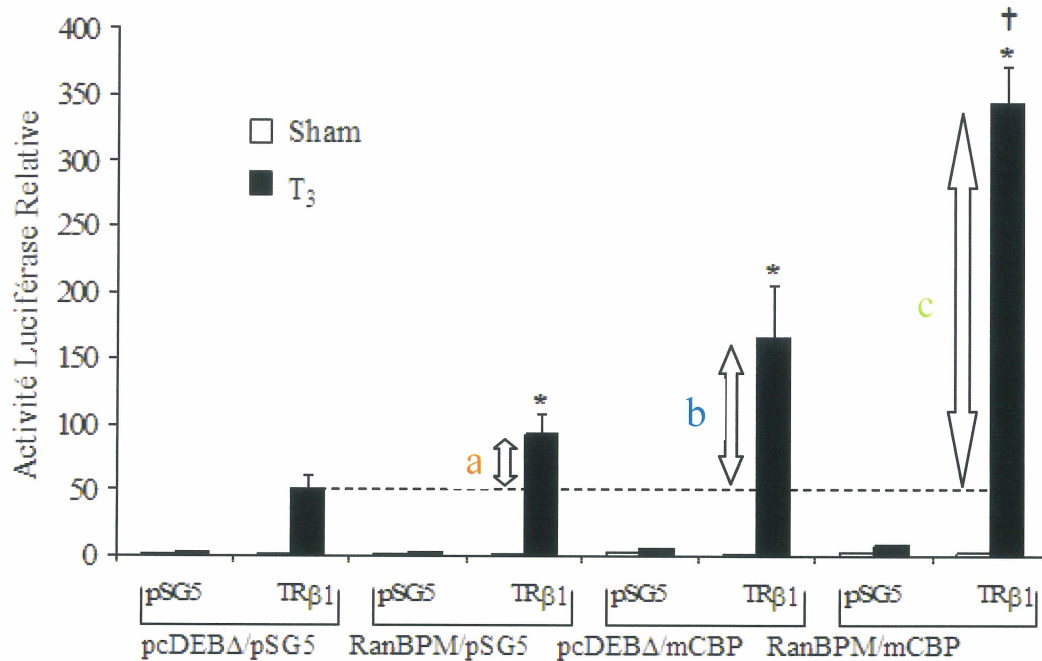


Figure 21 : RanBPM crée un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle de TRβ1 en combinaison avec SRC-1. Des essais luciférase ont été menés dans les cellules HEK QBI co-transfectées avec RanBPM et SRC-1 sur le pTRE TRETk. L'effet co-activateur créé par la co-transfection de RanBPM et SRC-1 (c) est plus grand significativement que l'effet produit par RanBPM (a) et SRC-1 (b) séparément (†p=0.011). Les résultats sont exprimés par la moyenne de l'activité luciférase relative (RLU) ± stdev provenant de trois expériences indépendantes en triplicata. *p=0.001 en comparant le RLU à celui de TRβ1 pcDEBΔ/pSG5.

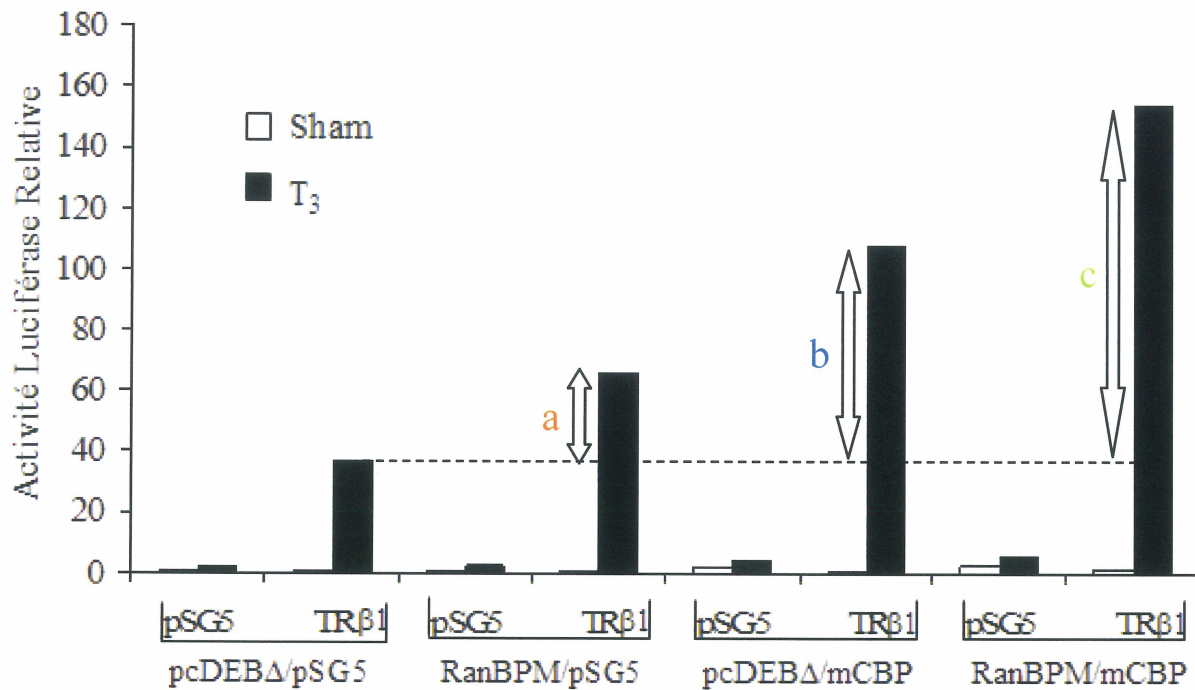


Figure 22 : RanBPM crée un effet additif sur l'activité transcriptionnelle de TRβ1 en combinaison avec CBP. Des essais luciférase ont été menés dans les cellules HEK QBI co-transfectées avec RanBPM et mCBP sur le pTRE TRETK. L'effet co-activateur créé par la co-transfection de RanBPM et mCBP (c) n'est pas plus grand que la somme des effets produits par RanBPM (a) et le mCBP (b) séparément. Les résultats sont exprimés par la moyenne de l'activité luciférase relative (RLU) provenant d'une expérience en triplicata.

PARTIE IV

DISCUSSION

12 Discussion

12.1 Caractérisation de l'interaction entre les nouveaux co-régulateurs identifiés et les TRs

GRP1 et RanBPM sont des nouveaux partenaires d'interaction des TRs. La caractérisation de l'interaction entre GRP1 et RanBPM et les TRs a débuté par l'étude des points de contact en essais de précipitation à la GST. Les résultats démontrent que les TRs semblent interagir au niveau de plusieurs portions de GRP1 et de RanBPM.

Une étude plus approfondie des domaines impliqués confirme que les domaines CC et Sec7 ne sont pas nécessaires à l'interaction entre GRP1 et les TRs. Une portion de GRP1 qui comprend le domaine PH et la queue polybasique en carboxy-terminal constitue un point d'interaction important avec TR β 2. Le domaine PH de GRP1 est impliqué dans la reconnaissance des phospholipides. Par contre, d'autres ligands ont également été décrits, tels la sous-unité β/γ de protéines G hétérodimériques (TOUHARA et al., 1994), l'actine (YAO et al., 1999) et la PKC (YAO et al., 1994). Il est donc possible que le domaine PH de GRP1 puisse reconnaître des molécules protéiques, comme les NRs, en plus des phospholipides. La région polybasique de GRP1 joue un rôle dans le degré d'affinité de GRP1 à différents phospholipides et aux protéines (DIERKS et al., 2001). Une analyse plus poussée de l'interaction entre GRP1 et les TRs à ce niveau pourra orienter les études concernant la fonction physiologique de cette interaction.

La liaison entre la protéine RanBPM et les TRs semble aussi mettre en jeux plusieurs points de contact. Par contre, nous avons noté que l'affinité de RanBPM pour les TRs est plus

importante au niveau de sa région carboxy-terminale qui contient les domaines CTLH et CRA. De plus, cette même région de RanBPM est impliquée dans l'interaction avec les SRCs et SMRT. La région amino-terminale de RanBPM qui contient le domaine SPRY et LisH est également capable d'interagir avec les TRs, mais avec moins d'affinité.

12.1.1 L'importance du DBD dans l'interaction entre les nouveaux co-régulateurs et les NRs

GRP1 et RanBPM sont des nouveaux partenaires du DBD des TRs. Le DBD est suffisant pour permettre l'interaction avec les deux nouveaux co-régulateurs. Par contre, GRP1 est un partenaire d'interaction spécifique au DBD car sa présence est essentielle afin de permettre la liaison aux TRs. Pour sa part, RanBPM semble posséder plus d'un point d'interaction au niveau des TRs. Le DBD seul arrive à interagir avec RanBPM mais la région amino-terminale semble aussi impliquée car son retrait (construction 1-120 Δ) diminue le degré d'affinité à RanBPM. De plus, nos résultats montrent que RanBPM interagit avec plus d'affinité avec les isoformes TR β qui possèdent une région amino-terminale spécifique. RanBPM pourrait donc s'associer aux TRs *via* le DBD, et le domaine amino-terminal pourrait jouer un rôle modulateur sur l'interaction. Les points d'interactions entre RanBPM et le AR a également été situé au niveau du DBD et de son amino-terminus (RAO et al., 2002).

Étant donné le haut degré d'homologie que l'on retrouve au niveau du DBD des membres de la superfamille des NRs, nous avons étudié la possibilité que GRP1 et RanBPM ne seraient pas des partenaires d'interaction uniques aux TRs. Nous avons ainsi pu établir que GRP1 et RanBPM sont capables d'interagir avec les ARs, le ER α , ainsi de toutes les isoformes des PPARs. Cependant, l'interaction avec le RAR et le partenaire d'hétérodimérisation des TRs, le RXR α , était quasi nulle.

Ces résultats suggèrent que les nouveaux co-régulateurs que nous avons identifiés pourraient être impliqués dans les mécanismes de régulation des NRs en général. Il serait pertinent de savoir si la région amino-terminale des NRs joue un rôle modulateur sur la liaison ainsi que de valider par co-immunoprécipitation les interactions identifiées *in vitro* avec les autres NRs. De plus, le fait que GRP1 et RanBPM n'interagissent pas avec le partenaire d'hétérodimérisation des TRs, le RXR, devra être confirmé en co-immunoprécipitation et étudié plus en détails.

Il est clair, pour le moment, que l'étendue des fonctions jouées par le DBD n'est pas encore connue. Le DBD des NRs n'est pas strictement associé à la reconnaissance des HREs et à la formation des dimères. Plusieurs co-régulateurs des NRs se lient au DBD pour ensuite influencer leur activité transcriptionnelle : ANPK, ARIP3, ARIP4, GT198 et de PSF (JANNE et al., 2000, pour revue, MATHUR et al., 2001, KO et al., 2002). De plus, certains co-régulateurs bien décrits qui s'associent aux NRs *via* l'AF-2 possèdent également des points de contacts au DBD, comme le co-activateur PCAF (BLANCO et al., 1998). Le DBD pourrait également influencer l'activité transcriptionnelle des NRs en modifiant leur localisation cellulaire par la présence de signaux d'importation et d'exportation nucléaire (NLS/NES). Comme c'est le cas pour SNURF, un co-activateur des ARs, qui interagit dans leur DBD et favorise leur transport ainsi que la localisation nucléaire (POUKKA et al., 2000b).

12.1.2 L'effet des agonistes sur l'interaction entre les nouveaux co-régulateurs et les NRs

Nos études au niveau de la formation de complexe entre GRP1 et RanBPM et les NRs ont démontré que les agonistes n'influencent pas l'interaction (*in vitro* et par co-ip). De plus, nos études en essais transcriptionnels démontrent que GRP1 et RanBPM ont un effet autant en présence qu'en absence d'HTs (pTREs *versus* nTREs). D'un autre côté, l'équipe qui a décrit

l'interaction entre RanBPM et les ARs a démontré que l'affinité entre RanBPM et le AR était plus importante en présence de l'agoniste R1881 (co-ip) (RAO et al., 2002). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce fait. Tout d'abord, il est important de mentionner qu'il existe plusieurs différences entre les TRs et le AR. Le fait le plus marquant est le phénomène d'autodimérisation du AR en présence d'agoniste. En effet, l'AF-1 de la région amino-terminale du AR interagit avec l'AF-2 du LBD (BERREVOETS et al., 1998) et l'autodimérisation du AR est essentielle afin d'atteindre l'activité transcriptionnelle maximale ainsi que le recrutement des co-activateurs (SAITOH et al., 2002, QUIGLEY et al., 2004, JAASKELAINEN et al., 2006). La conformation spéciale adoptée par le AR en présence d'agoniste semble donc favoriser l'interaction avec RanBPM.

Dans le même ordre d'idée, étant donné que nos essais d'interaction concernant les PPARs ont été effectués seulement *in vitro* et en présence d'un seul type d'agoniste des PPARs, il est envisageable de croire que GRP1 et RanBPM pourraient être des partenaires d'interaction sensibles aux ligands dans un contexte différent. Comme on le sait, les expériences *in vitro* constituent le début d'une investigation, non pas des absolus. Un exemple de ce phénomène provient de la première description du co-activateur *PPAR gamma coactivator-1* (PGC-1). L'interaction entre les PPAR γ et PGC-1 se produisait de manière indépendante à la présence de Rosi *in vitro* mais dépendante du ligand *in vivo* (PUIGSERVER et al., 1998). De plus, certains nouveaux co-régulateurs s'associent de manière dépendante ou indépendante au ligand en fonction du type de NRs. Un bon exemple est le *forkhead homologue in rhabdomyosarcoma* (FHR) : il interagit en absence du ligand avec les TRs et le RXR et en présence du ligand avec le ER (ZHAO et al., 2001). L'implication du ligand au niveau de l'interaction entre GRP1 et RanBPM et les autres NRs devra être confirmée dans un contexte cellulaire. De plus, il serait

possible que l'interaction entre GRP1, RanBPM et les PPARs soit sensible à d'autres ligands parmi la vaste gamme des ligands possibles des PPARs.

La plupart des interactions avec les co-régulateurs des NRs sont influencées par la présence et/ou absence des agonistes. Cependant, il est également important de noter que la nature des essais effectués pour isoler de nouveaux co-régulateurs des NRs est souvent elle-même spécifique à l'addition ou au retrait du ligand. C'est-à-dire que l'on cible souvent les recherches sur l'AF-2 ou le LBD, soient les régions où l'on retrouve les changements de conformation les plus importants dépendamment de la présence du ligand. La littérature fait maintenant état de plusieurs co-régulateurs qui interagissent avec les NRs peu importe leur association au ligand.

12.2 GRP1, un nouveau co-répresseur des TRs

Afin d'explorer le rôle physiologique de l'interaction entre GRP1 et les TRs, nous avons effectué des essais transcriptionnels. GRP1 provoque une diminution globale de tous les taux transcriptionnels observés pour les trois isoformes actives des TRs sur les pTREs (TRETk, LYSX2). La répression en absence du ligand n'a pas été modifiée en présence de GRP1. L'effet de GRP1 sur l'activité transcriptionnelle des TRs est dose-dépendante. De plus, GRP1 inhibe l'activation transcriptionnelle en absence d'HTs au niveau des promoteurs endogènes humains de la thyrolibérine et de la sous-unité alpha de la thyroestimuline. GRP1 n'influençait pas l'activité transcriptionnelle des TRs au niveau des nTREs en présence de T₃.

12.2.1 GRP1, un compétiteur pour la liaison des TRs aux TREs

Le DBD est essentiel à l'interaction du TR avec GRP1. Comme mentionné plus tôt, le DBD est associé à plusieurs fonctions des NRs. D'une part, la boîte P est requise pour la reconnaissance des TREs sur l'ADN. D'autre part, la boîte D est impliquée dans la dimérisation des TRs et la stabilisation de la liaison à l'ADN. L'effet co-répresseur de GRP1 sur l'activité

transcriptionnelle des TRs implique donc une inhibition de la liaison des TRs à leur TRE ou de la formation des dimères.

Pour valider la première hypothèse, nous avons étudié l'effet de GRP1 sur la liaison des dimères au niveau de différents pTREs. Nous avons démontré, en essais EMSA, que la présence de GRP1 diminue la formation des homodimères TR/TR de 25-35% et la formation des hétérodimères TR/RXR de 45-50% sur les pTREs (DR+4 et le palindrome inversé). Par contre, lorsque GRP1 est ajouté on n'observe pas la formation d'un complexe de poids moléculaire supérieur, ce qui suggère que GRP1 n'est pas présent dans les dimères formés par les TRs sur les pTREs. Il reste tout de même qu'il s'agit d'expériences *in vitro* et qu'elles ne prennent pas en ligne de compte tous les facteurs qui pourraient être impliqués au niveau cellulaire. Des essais de précipitation à la chromatine (ChIPs) devront être menés afin d'établir la présence de GRP1 dans l'environnement des promoteurs régulés par les TRs.

Par la suite, nous avons déterminé que GRP1 n'avait pas d'effet sur la formation de complexes protéiques TR/TR ou TR/RXR par des essais de précipitation à la GST. Par contre, l'ajout d'une dose croissante d'oligo double-brin de DR+4 inhibe l'interaction entre GRP1 et les TRs (diminution de 75% par rapport à l'oligo double-brin contrôle). GRP1 agirait donc comme un compétiteur des TRs vis-à-vis leur liaison à l'ADN.

12.2.2 Conclusion et perspectives sur GRP1

GRP1 agit donc comme compétiteur pour la liaison des TRs à l'ADN. Ce mécanisme par lequel GRP1 agit comme co-répresseur n'a pas été identifié pour d'autres co-répresseurs à ce jour. Dans la littérature actuelle, un mécanisme semblable a été mentionné pour le *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor* (COUP-TF). Il s'agit d'un récepteur orphelin qui a la capacité de se lier aux HREs. COUP-TF diminue l'activité transcriptionnelle des TRs en associant aux TREs. Ce phénomène cause une diminution de la reconnaissance des TREs par les

TRs et réduit leur activité transcriptionnelle (COONEY et al., 1993, LENG et al., 1996). Par contre, GRP1 ne s'associe pas aux TREs comme l'a démontré nos essais EMSA.

Étant donné la localisation membranaire de GRP1 ainsi que ses implications dans des voies de signalisation, son interaction avec les TRs au niveau cytoplasmique pourrait aussi faire un lien avec certaines actions rapides des HTs. De plus, les ERs semblent également être une cible pour GRP1. Les oestrogènes possèdent des actions génomiques bien décrites (MORIARTY et al., 2006, pour revue). GRP1 pourrait être impliqué de manière à mettre en lien les effets non-génomiques et les effets génomiques de ces hormones.

12.3 RanBPM, un nouveau co-activateur des TRs

RanBPM stimule l'activité transcriptionnelle des TRs de 30, 70 et 190% de TR α 1, TR β 1 et TR β 2 respectivement au niveau de pTREs (TRETk et DR+4) en présence de T₃. RanBPM augmente de 2 à 3-fois l'activité transcriptionnelle des TRs au niveau des promoteurs humains endogènes du TRH et TSH-alpha en absence d'HTs. En général, l'effet stimulant de RanBPM sur l'activité transcriptionnelle des TRs est plus puissant pour les isoformes TR β .

Dans le but de mieux comprendre par quel(s) mécanisme(s) d'action RanBPM stimule l'activité transcriptionnelle des TRs j'ai débuté l'étude concernant RanBPM en lien avec des co-régulateurs connus. Dans cette optique, j'ai démontré que RanBPM était un partenaire d'interaction *in vitro* des différents SRCs et de SMRT, mais pas de mCBP. Les essais transcriptionnels ont montré que la co-transfection de RanBPM et SRC-1 produit un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle des TRs. Par contre, la co-transfection de RanBPM et du mCBP produit seulement un effet additif.

12.4 Les hypothèses sur le mécanisme d'action de RanBPM

Il existe plusieurs hypothèses sur le(s) mécanisme(s) de RanBPM en lien avec les TRs. Elles sont résumées également à l'aide d'un schéma (Schéma 1). Le projet de mon doctorat était concentré au niveau des études sur RanBPM comme un co-activateur classique des NRs. Les autres hypothèses sur le mécanisme d'action de RanBPM sont des projets d'études en cours dans notre laboratoire.

12.4.1 RanBPM, co-activateur classique des NRs

Nos résultats ont démontré que RanBPM stimule l'activité transcriptionnelle des TRs au niveau de pTREs et nTREs. De plus, RanBPM a été identifié comme un partenaire d'interaction de la sous-unité TAF4 du TFIID, un des composants de la machinerie transcriptionnelle de base (BRUNKHORST et al., 2005). Il est donc possible que RanBPM agisse comme un co-activateur classique des NRs. Les résultats obtenus dans le cadre de mes études doctorales sont intéressants, mais il reste beaucoup à faire dans la poursuite du projet afin de déterminer la fonction de RanBPM sur l'activité transcriptionnelle des NRs. Il faudra d'abord valider les interactions entre RanBPM et les SRCs par des co-ip ainsi que vérifier si l'ajout du ligand apporte des changements à ces interactions. Nous désirons également étudier l'interaction entre RanBPM et SMRT dans un contexte cellulaire ainsi que la possibilité que RanBPM soit également un partenaire de NCoR. Ces résultats pourront déterminer si RanBPM stimule l'activité transcriptionnelle des TRs en absence de T_3 sur les nTREs en recrutant ces co-répresseurs. De plus, nous désirons démontrer la présence de RanBPM dans l'environnement d'un promoteur endogène contenant un TRE (Ex; SERCA et l'hormone de croissance). Pour ce faire, des essais d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIPs) sont présentement en mise au point.

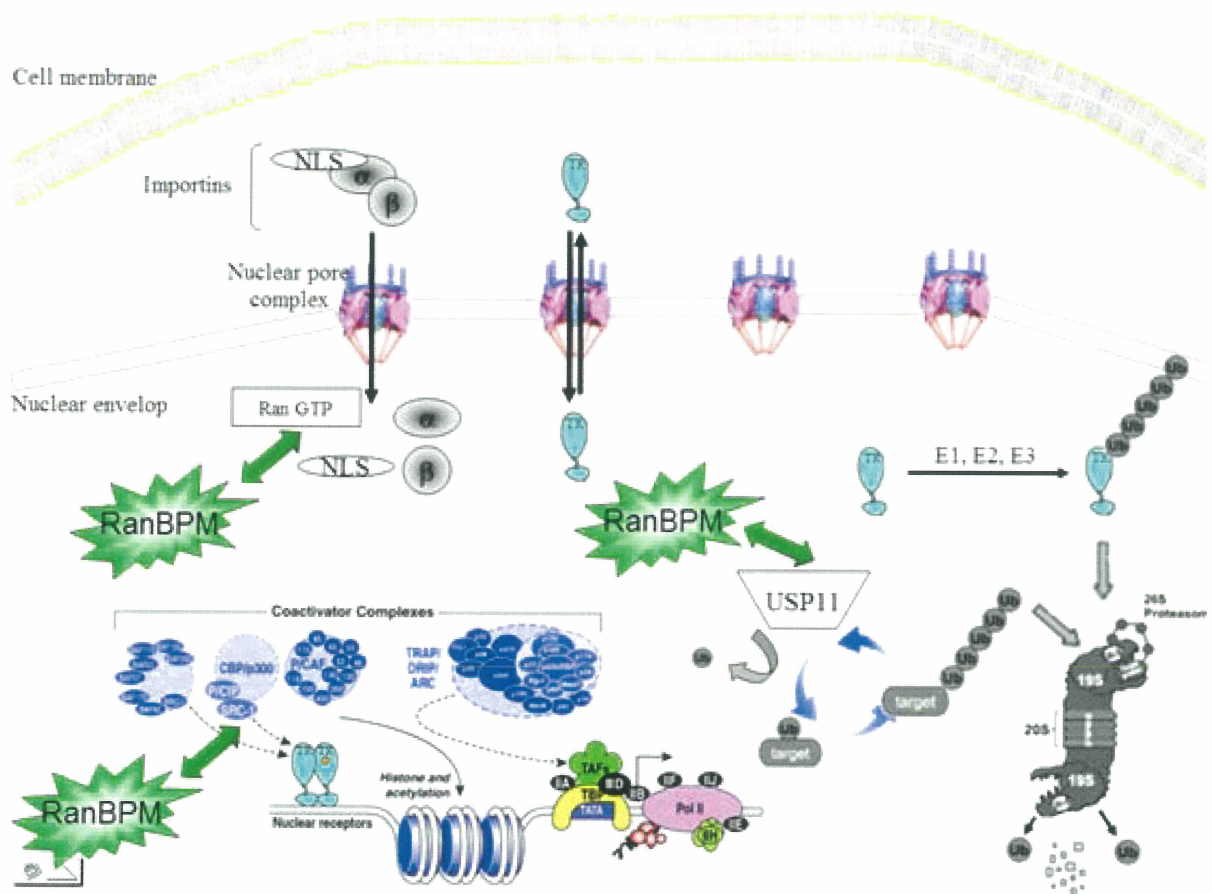


Schéma 1. Les hypothèses concernant les mécanismes d'action de RanBPM comme co-activateurs des TRs. Représentation schématique des trois hypothèses concernant le mécanisme d'action de RanBPM, soit : i) comme co-activateur faisant partie des complexes co-activateurs recrutés par les TRs ou en lien avec la machinerie transcriptionnelle de base, ii) un effet protecteur sur la dégradation des TRs par le protéasome par son interaction avec une déubiquitineuse, la protéine USP11, iii) influence sur le transport des TRs en lien avec la protéine Ran. L'image de la membrane plasmique a été modifiée à partir de: library.thinkquest.org/27819/ch3_2.shtml et l'image du complexe du pore nucléaire provient de: www.scripps.edu/~stoffler/proj/NPC/npc.html. L'image du protéasome a été modifiée à partir de: (KINYAMU et al., 2005). Le complexe des NRs avec les co-activateurs et l'ARN polymérase II a été modifiée à partir de : (GLASS et ROSENFELD, 2000).

Comme mentionné plutôt, SRC-1 et CBP sont des partenaires d'interaction de RanBPM et les actions des SRCs sont généralement en liens étroits avec celles de CBP (voir à la section 3.5.1-2). Pour certains NRs, comme les ERs et les PRs ainsi que les isoformes TR β , la surexpression conjointe de SRC-1 et de CBP crée un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle (SMITH et al., 1996, LEE et al., 2003). Toutefois, le contexte cellulaire, la présence d'un promoteur transfecté comparativement à un promoteur intégré dans les chromosomes, le profil d'expression des co-activateurs et des NRs sont des facteurs à prendre en considération dans l'interprétation des résultats (Lee et al., 2002). Dans notre modèle cellulaire, la surexpression de RanBPM en combinaison avec SRC-1, provoque un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle de TR β 1 et la présence conjointe de RanBPM et CBP n'a créé qu'un effet additif. Ce phénomène pourrait signifier que le mode d'action de RanBPM soit relié à celui des co-activateurs de première vague des TRs, comme les SRCs. Le mécanisme d'action de CBP, qui fait partie de la deuxième vague de co-activateurs, ne serait pas associé à celui de RanBPM. Une autre conclusion que nous pouvons tirer d'après nos résultats est que RanBPM n'influencerait pas l'activité HAT de CBP comme c'est le cas de certains co-régulateurs (PERISSI et al., 1999).

Étant donné la complexité entourant la formation des complexes co-activateurs des NRs, plusieurs phénomènes devront être étudiés avant de conclure sur la nature des liens entre RanBPM et les co-activateurs connus. Premièrement, l'interdépendance de SRC-1 et CBP n'est pas un absolu. Dans certains modèles cellulaires des cellules HEK QBI, l'effet synergique des SRCs en combinaison avec le CBP était dépendant de la présence de CARM1, une HMT (LEE et al., 2002). Deuxièmement, les isoformes des TRs possèdent des niveaux d'affinité différents pour chacun des SRCs et CBP. Les isoformes TR β , par exemples, possèdent un second point de contact pour SRC-1 dans leur domaine AF-1 (TIAN et al., 2006). En conséquence, il serait donc

pertinent d'étudier les effets de différentes combinaisons de co-activateurs connus avec RanBPM sur l'ensemble des isoformes des TRs en essais transcriptionnels. Ces études devront également être menées sur différents promoteurs et dans plus d'un modèle cellulaire afin de tirer des conclusions sur l'effet de RanBPM en combinaison avec des co-activateurs. Nous devons également appliquer ces mêmes essais au niveau de promoteurs contenant des nTREs en combinaison avec SMRT que nous avons identifié comme partenaire de RanBPM. Dépendamment, des résultats complémentaires obtenus dans la poursuite de ce projet, il serait également pertinent de vérifier si RanBPM possède une activité HAT intrinsèque.

12.4.2 Effet protecteur de RanBPM sur la dégradation des NRs

La voie de dégradation par le protéasome joue un rôle crucial et permet notamment la dégradation sélective de protéines qui ont une courte demi-vie comme les régulateurs du cycle cellulaire, ou des protéines qui pourraient provoquer des états cellulaires prolifératifs comme les facteurs de croissance (CIECHANOVER, 1998). L'activité protéolytique du protéasome permet également le recyclage des acides aminés et l'élimination de protéines portant de nombreuses modifications post-traductionnelles. En plus de son rôle dans la dégradation des protéines, on reconnaît aussi des activités non-protéolytiques au protéasome. Il influence notamment l'activité de plusieurs facteurs de transcription, leurs co-régulateurs ainsi que sur la chromatine et la machinerie transcriptionnelle de base (SALGHETTI et al., 2000, KINYAMU et al., 2005, pour revue). Certains composants du protéasome ont aussi été identifiés comme des co-activateurs des TRs (MCKENNA et al., 1999, pour revue).

Les TRs font partie des cibles de la voie de l'ubiquitine et leur dégradation met en jeu le protéasome (DACE et al., 2000). La présence de T₃ induit d'ailleurs une dégradation rapide des TRs par les voies protéolytiques du protéasome. L'inactivation des activités protéolytiques du protéasome par différents composants chimiques, diminue l'activité transcriptionnelle malgré le

fait que la quantité de TRs dans les cellules soit plus importante (CHEN et al., 2003). D'autres facteurs influencent la stabilité des TRs, comme par exemple, la phosphorylation causée par la voie des MAPKs qui favorisent une meilleure stabilité (JONES et al., 1994, LEITMAN et al., 1996, TING et al., 1997).

RanBPM pourrait faire partie des protéines qui influencent les activités du protéasome sur les TRs. La protéine RanBPM régule son propre niveau d'ubiquitination, par son association à USP11 (IDEGUCHI et al., 2002). Il serait donc possible que RanBPM influence l'ubiquitination des TRs par le recrutement de USP11. D'ailleurs, RanBPM influence la stabilité et l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription p73 α (KRAMER et al., 2005). RanBPM pourrait donc apporter un effet stimulant sur l'activité transcriptionnelle des TRs en favorisant leur stabilité.

12.4.3 RanBPM et le transport nucléocytoplasmique des NRs

RanBPM fut d'abord identifié comme une protéine partenaire de Ran-GTP (NISHITANI et al., 2001), une petite protéine G de la famille de Ras. Ran est impliqué dans la formation des complexes à être transportés de part et d'autre de l'enveloppe nucléaire (NISHIMOTO, 1999). Les études sur la cinétique du transport et de la localisation nucléaire des TRs sont peu nombreuses (ZHU et al., 1998, BUNN et al., 2001, MARUVADA et al., 2003). De plus, plusieurs de ces études démontrent que les TRs n'utilisent pas la voie classique de l'exportation nucléaire et les importines impliquées dans l'importation ne sont pas encore décrites (BLACK et al., 2001).

Il serait possible que RanBPM ait un effet co-activateur sur l'activité transcriptionnelle des TRs en influençant la localisation cellulaire des TRs. La protéine RanBPM favoriserait le transport nucléaire des TRs *via* son association avec la protéine Ran. RanBPM pourrait également influencer la localisation nucléaire des TRs en favorisant leur rétention au noyau, car

la surexpression de SRC-1 augmente la période de résidence des TRs au noyau ainsi que leur activité transcriptionnelle (MARUVADA et al., 2003). Ce mécanisme d'action a également été décrit pour la protéine SNURF, un co-activateur des ARs (POUKKA et al., 2000b). Par sa liaison au DBD des ARs, SNURF favorise leur transport au noyau et leur activité transcriptionnelle.

PARTIE V
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

13 Conclusion générale et perspectives

Le domaine de recherches entourant les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle des NRs s'est considérablement étendu. La découverte et la caractérisation de nouveaux co-régulateurs des NRs amènent de nouveaux questionnements sur l'étendue du réseau qui influence l'activité transcriptionnelle des NRs. Comme par exemple la liaison de GRP1, une protéine membranaire, aux TRs, principalement nucléaire, peut sembler surprenante aux premiers abords. Sans oublier la littérature hétéroclite au sujet de la protéine RanBPM, qui nous force à admettre que ses rôles physiologiques restent à découvrir. Néanmoins, ils font maintenant partie du collectif des protéines qui influencent plusieurs processus cellulaires dont la régulation transcriptionnelle des NRs.

Comme il existe un lien important entre la régulation transcriptionnelle et le ratio NRs/co-régulateurs présents, la poursuite de nos recherches sur le mécanisme d'action de ces deux nouveaux co-régulateurs s'inscrit dans la génération de modèles *KO* d'abord au niveau de cellules puis d'animaux. Nous pourrions ainsi étudier les effets causés par l'absence de GRP1 et de RanBPM sur l'activité transcriptionnelle des NRs, un élément manquant pour le moment dans nos études car leur expression est ubiquitaire.

Dans le projet concernant les PPARs, nous désirons d'abord poursuivre l'étude dans le but de déterminer l'effet de GRP1 et RanBPM dans la différenciation adipocytaire. Nous étudions présentement le profil d'expression de GRP1 et RanBPM dans la lignée pré-adipocytaire 3T3-L1 et au niveau des tissus adipeux différenciés. Il sera intéressant de déterminer le rôle de GRP1/RanBPM dans la régulation de gènes impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline et d'autres troubles reliés par des essais transcriptionnels avec un gène rapporteur.

14 Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de recherche; Dr Marie-France Langlois de m'avoir donné la chance de travailler dans son équipe de laboratoire. Cette période a d'abord débuté à titre de stagiaire au baccalauréat et s'est poursuivie. Nos interactions m'ont permis de cheminer dans un contexte enrichissant et stimulant. Finalement, merci de m'avoir offert la possibilité de représenter le laboratoire à divers congrès nationaux et internationaux.

Un merci à Liette, pour l'apprentissage de nombreuses techniques de laboratoires et les nombreuses discussions. Merci aux autres étudiantes présentes à cette époque, à Dan et Marie-Ève, votre présence animait mes journées de travail. Merci aussi à la seconde vague d'étudiants dans le laboratoire, Mylène pour ton travail comme stagiaire, et aux assistantes de recherche Tania et Julie. Je tiens aussi à souligner mes collègues au Département, et les professeurs que j'ai appris à mieux connaître.

Je tiens également à remercier ma famille, Michel, Diane et Maude ainsi que mon copain, Quan-Truong pour leur soutien.

Merci à Thyroid Canada pour le support financier au cours de mes études. Finalement, merci aux Drs Langlois, Frédéric Picard, Nuria Basora et Julie Carrier d'avoir accepté de corriger et d'évaluer cette thèse.

15 Références

- Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. and Flier, J. S. *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature*, **382**, 250-252 (1996).
- Albright, S. R. and Tjian, R. *TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. Gene*, **242**, 1-13 (2000).
- Alkemade, A., Vuijst, C. L., Unmehopa, U. A., Bakker, O., Vennstrom, B., Wiersinga, W. M., Swaab, D. F. and Fliers, E. *Thyroid hormone receptor expression in the human hypothalamus and anterior pituitary. J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 904-912 (2005).
- Allgeier, A., Offermanns, S., Van Sande, J., Spicher, K., Schultz, G. and Dumont, J. E. *The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. J Biol Chem*, **269**, 13733-13735 (1994).
- Altshuler, D., Hirschhorn, J. N., Klannemark, M., Lindgren, C. M., Vohl, M. C., Nemesh, J., Lane, C. R., Schaffner, S. F., Bolk, S., Brewer, C., Tuomi, T., Gaudet, D., Hudson, T. J., Daly, M., Groop, L. and Lander, E. S. *The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. Nat Genet*, **1**, 76-80 (2000).
- Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Trent, J. M. and Meltzer, P. S. *AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. Science*, **277**, 965-968 (1997).
- Apriletti, J. W., Ribeiro, R. C., Wagner, R. L., Feng, W., Webb, P., Kushner, P. J., West, B. L., Nilsson, S., Scanlan, T. S., Fletterick, R. J. and Baxter, J. D. *Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, **25**, S2-11 (1998).
- Bai, D., Chen, H. and Huang, B. R. *RanBPM is a novel binding protein for p75NTR. Biochem Biophys Res Commun*, **309**, 552-557 (2003).
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. *The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. Nature*, **384**, 641-643 (1996).

- Baretino, D., Vivanco Ruiz, M. M. and Stunnenberg, H. G. *Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. EMBO J*, **13**, 3039-3049 (1994).
- Barroso, I., Gurnell, M., Crowley, V. E., Agostini, M., Schwabe, J. W., Soos, M. A., Maslen, G. L., Williams, T. D., Lewis, H., Schafer, A. J., Chatterjee, V. K. and O'Rahilly, S. *Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. Nature*, **402**, 880-883 (1999).
- Bassett, J. H., Harvey, C. B. and Williams, G. R. *Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. Mol Cell Endocrinol*, **213**, 1-11 (2003).
- Bassett, J. H. and Williams, G. R. *The molecular actions of thyroid hormone in bone. Trends Endocrinol Metab*, **8**, 356-364 (2003).
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L., Studholme, D. J., Yeats, C. and Eddy, S. R. *The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res*, **32**, D138-141 (2004).
- Baumann, C. T., Maruvada, P., Hager, G. L. and Yen, P. M. *Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. J Biol Chem*, **276**, 11237-11245 (2001).
- Beato, M., Herrlich, P. and Schutz, G. *Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. Cell*, **83**, 851-857 (1995).
- Becker, P. B., Gloss, B., Schmid, W., Strahle, U. and Schutz, G. *In vivo protein-DNA interactions in a glucocorticoid response element require the presence of the hormone. Nature*, **324**, 686-688 (1986).
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M. and Reinberg, D. *FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. Science*, **301**, 1090-1093 (2003).
- Bergh, J. J., Lin, H. Y., Lansing, L., Mohamed, S. N., Davis, F. B., Mousa, S. and Davis, P. J. *Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. Endocrinology*, **146**, 2864-2871 (2005).
- Berrevoets, C. A., Doesburg, P., Stekete, K., Trapman, J. and Brinkmann, A. O. *Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2). Mol Endocrinol*, **8**, 1172-1183 (1998).

- Bjornstrom, L. and Sjoberg, M. *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol Endocrinol*, **4**, 833-842 (2005).
- Black, B. E., Holaska, J. M., Rastinejad, F. and Paschal, B. M. *DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. Curr Biol*, **11**, 1749-1758 (2001).
- Blake, N. G., Eckland, D. J., Foster, O. J. and Lightman, S. L. *Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. Endocrinology*, **129**, 2714-2718 (1991).
- Blanco, J. C., Minucci, S. and Faivre, C. *The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. GENES & Development*, **12**, 1638-51. (1998).
- Bodenner, D. L., Mroczynski, M. A., Weintraub, B. D., Radovick, S. and Wondisford, F. E. *A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. J Biol Chem*, **266**, 21666-21673 (1991).
- Bookout, A. L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R. T., Evans, R. M. and Mangelsdorf, D. J. *Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. Cell*, **126**, 789-799 (2006).
- Bradley, D. J., Towle, H. C. and Young, W. S. *Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. J Neurosci*, **12**, 2288-2302 (1992).
- Bradley, R. L., Cleveland, K. A. and Cheatham, B. *The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways. Recent Prog Horm Res*, **56** (2001).
- Breen, J. J., Hickok, N. J. and Gurr, J. A. *The rat TSHbeta gene contains distinct response elements for regulation by retinoids and thyroid hormone. Mol Cell Endocrinol*, **131**, 137-146 (1997).
- Brent, G. A., Harney, J. W., Chen, Y., Warne, R. L., Moore, D. D. and Larsen, P. R. *Mutations of the rat growth hormone promoter which increase and decrease response to thyroid hormone define a consensus thyroid hormone response element. Mol Endocrinol*, **12**, 1996-2004 (1989).
- Brent, G. A., Williams, G. R., Harney, J. W., Forman, B. M., Samuels, H. H., Moore, D. D. and Larsen, P. R. *Effects of varying the position of thyroid hormone response elements within the rat growth hormone promoter: implications for positive and negative regulation by 3,5,3'-triiodothyronine. Mol Endocrinol*, **4**, 542-548 (1991).

- Briggs, S. D., Xiao, T., Sun, Z. W., Caldwell, J. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Allis, C. D. and Strahl, B. D. *Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin* *Nature*, **418**, 498 (2002).
- Brunkhorst, A., Karlen, M., Shi, J., Mikolajczyk, M., Nelson, M. A., Metsis, M. and Hermanson, O. *A specific role for the TFIID subunit TAF4 and RanBPM in neural progenitor differentiation*. *Mol Cell Neurosci*, **29**, 250-258 (2005).
- Bunn, C. F., Neidig, J. A., Freidinger, K. E., Stankiewicz, T. A., Weaver, B. S., McGrew, J. and Allison, L. A. *Nucleocytoplasmic shuttling of the thyroid hormone receptor alpha*. *Mol Endocrinol*, **4**, 512-533 (2001).
- Burgus, R., Dunn, T. F., Desiderio, D., Ward, D. N., Vale, W. and Guillemin, R. *Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor*. *Nature*, **226**, 321-325 (1970).
- Buyukgebiz, A. *Congenital hypothyroidism clinical aspects and late consequences*. *Pediatr Endocrinol Rev*, **2**, 185-190 (2003).
- Caira, F., Antonson, P., Pelto-Huikko, M., Treuter, E. and Gustafsson, J. A. *Cloning and characterization of RAP250, a novel nuclear receptor coactivator*. *J Biol Chem*, **275**, 5308-5317 (2000).
- Canaris, G. J., Manowitz, N. R., Mayor, G. and Ridgway, E. C. *The Colorado thyroid disease prevalence study*. *Arch Intern Med*, **160**, 526-534 (2000).
- Cao, J., O'Donnell, D., Vu, H., Payza, K., Pou, C., Godbout, C., Jakob, A., Pelletier, M., Lembo, P., Ahmad, S. and Walker, P. *Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor*. *J Biol Chem*, **273**, 32281-32287 (1998).
- Carr, F. E., Kaseem, L. L. and Wong, N. C. *Thyroid hormone inhibits thyrotropin gene expression via a position-independent negative L-triiodothyronine-responsive element*. *J Biol Chem*, **267**, 18689-18694 (1992).
- Carr, F. E. and Wong, N. C. *Characteristics of a negative thyroid hormone response element*. *J Biol Chem*, **269**, 4175-4179 (1994).
- Casas, F., Daury, L., Grandemange, S., Busson, M., Seyer, P., Hatier, R., Carazo, A., Cabello, G. and Wrutniak-Cabello, C. *Endocrine regulation of mitochondrial activity: involvement of truncated RXRalpha and c-Erb Aalpha1 proteins*. *FASEB J*, **3**, 426-436 (2003).
- Castillo, A. I., Sanchez-Martinez, R., Moreno, J. L., Martinez-Iglesias, O. A., Palacios, D. and Aranda, A. *A permissive retinoid X receptor/thyroid hormone receptor heterodimer*

- allows stimulation of prolactin gene transcription by thyroid hormone and 9-cis-retinoic acid. *Mol Cell Biol*, **2** (2004).
- Castillo, G., Brun, R. P., Rosenfield, J. K., Hauser, S., Park, C. W., Troy, A. E., Wright, M. E. and Spiegelman, B. M. *An adipogenic cofactor bound by the differentiation domain of PPARgamma*. *EMBO J*, **18**, 3676-3687 (1999).
- Cavailles, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P. J. and Parker, M. G. *Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor*. *EMBO J*, **14**, 3741-3751 (1995).
- Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M. and Evans, R. M. *Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling*. *Nature*, **383**, 99-103 (1996).
- Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D. and Lazar, M. A. *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation*. *Endocrinology*, **135**, 798-800 (1994).
- Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y. and Evans, R. M. *Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300*. *Cell*, **90**, 569-580 (1997).
- Chen, J. D. and Evans, R. M. *A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors*. *Nature*, **377**, 454-457 (1995).
- Chen, J. D., Umesono, K. and Evans, R. M. *SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear receptor heterodimers*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 7567-7571 (1996).
- Chen, J. Y., Penco, S., Ostrowski, J., Balaguer, P., Pons, M., Starrett, J. E., Reczek, P., Chambon, P. and Gronemeyer, H. *RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and API transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation*. *EMBO J*, **14**, 1187-1197 (1995).
- Chen, S. L., Chang, Y. J., Wu, Y. H. and Lin, K. H. *Mitogen-activated protein kinases potentiate thyroid hormone receptor transcriptional activity by stabilizing its protein*. *Endocrinology*, **144**, 1407-1419 (2003).
- Cheng, L., Lemmon, S. and Lemmon, V. *RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation*. *J Neurochem*, **4**, 1102-1110 (2005).

- Cheng, S. Y. *Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. Rev Endocr Metab Disord*, **1-2**, 9-18 (2000).
- Chin, W. W. *Nuclear Hormone Receptors*. Parker MG, New York Academy of Press (1991).
- Christensen, L. K. *Free non-proteinbound serum thyroxine. Acta Med Scand*, **166**, 133-140 (1960).
- Ciechanover, A. *The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. EMBO J*, **17**, 7151-7160 (1998).
- Clodi, M., Vollenweider, P., Klarlund, J., Nakashima, N., Martin, S., Czech, M. P. and Olefsky, J. M. *Effects of general receptor for phosphoinositides 1 on insulin and insulin-like growth factor I-induced cytoskeletal rearrangement, glucose transporter-4 translocation, and deoxyribonucleic acid synthesis. Endocrinology*, **139**, 4984-90. (1998).
- Cohen, R. N., Wondisford, F. E. and Hollenberg, A. N. *Two separate NCoR (nuclear receptor corepressor) interaction domains mediate corepressor action on thyroid hormone response elements. Mol Endocrinol*, **10**, 1567-1581 (1998).
- Collingwood, T. N., Butler, A., Tone, Y., Clifton-Bligh, R. J., Parker, M. G. and Chatterjee, V. K. *Thyroid hormone-mediated enhancement of heterodimer formation between thyroid hormone receptor beta and retinoid X receptor. J Biol Chem*, **272**, 13060-13065 (1997).
- Collingwood, T. N., Urnov, F. D., Chatterjee, V. K. and Wolffe, A. P. *Chromatin remodeling by the thyroid hormone receptor in regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha-subunit promoter. J Biol Chem*, **276**, 34227-34234 (2001).
- Committee, N. R. *A unified nomenclature system for the nuclear receptor subfamily. Cell*, **97**, 1-20 (1999).
- Columbano, A. Pibiri, M. Deidda, M. Cossu, C. Scanlan, T. S. Chiellini, G. Muntoni, S. Ledda-Columbano, G. M. *The thyroid hormone receptor-beta agonist GC-1 induces cell proliferation in rat liver and pancreas. Endocrinology*, **147**, 3211-3218 (2006).
- Cook, C. B., Kakucska, I., Lechan, R. M. and Koenig, R. J. *Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. Endocrinology*, **130**, 1077-1079 (1992).
- Cooney, A. J., Leng, X., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. and Tsai, M. J. *Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. J Biol Chem*, **268**, 4152-4160 (1993).

- Cooper, D. S., Klibanski, A. and Ridgway, E. C. *Dopaminergic modulation of TSH and its subunits: in vivo and in vitro studies. Clin Endocrinol (Oxf)*, **3**, 265-275 (1983).
- Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A. and Claing, A. *Endogenous ARF6 Interacts with Rac1 upon Angiotensin II Stimulation to Regulate Membrane Ruffling and Cell Migration. Mol Biol Cell*, (2006).
- Culig, Z., Comuzzi, B., Steiner, H., Bartsch, G. and Hobisch, A. *Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol*, **92**, 265-271 (2004).
- Dace, A., Zhao, L., Park, K. S., Furuno, T., Takamura, N., Nakanishi, M., West, B. L., Hanover, J. A. and Cheng, S. *Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 8985-8990 (2000).
- Dalman, F. C., Koenig, R. J., Perdew, G. H., Massa, E. and Pratt, W. B. *In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90. J Biol Chem*, **265**, 3615-3618 (1990).
- D'Arezzo, S., Incerpi, S., Davis, F. B., Acconcia, F., Marino, M., Farias, R. N. and Davis, P. J. *Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. Endocrinology*, **145**, 5694-56703 (2004).
- Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J. and Yamamoto, K. R. *Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. Genes Dev*, **12**, 3343-3356 (1998).
- Davis, P. J., Davis, F. B. and Lawrence, W. D. *Thyroid hormone regulation of membrane Ca²⁺(+)-ATPase activity. Endocr Res*, **15**, 651-682 (1989).
- Davis, P. J., Shih, A., Lin, H. Y., Martino, L. J. and Davis, F. B. *Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. J Biol Chem*, **275**, 38032-38039 (2000).
- Dennler, S., Pendaries, V., Tacheau, C., Costas, M. A., Mauviel, A. and Verrecchia, F. *The steroid receptor co-activator-1 (SRC-1) potentiates TGF-beta/Smad signaling: role of p300/CBP. Oncogene*, **24**, 1936-1945 (2005).
- Denti, S., Sirri, A., Cheli, A., Rogge, L., Innamorati, G., Putignano, S., Fabbri, M., Pardi, R. and Bianchi, E. *RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. J Biol Chem*, **279**, 13027-13034 (2004).

- Desvergne, B., Petty, K. J. and Nikodem, V. M. *Functional characterization and receptor binding studies of the malic enzyme thyroid hormone response element. J Biol Chem*, **266**, 1008-1013 (1991).
- Desvergne, B. and Wahli, W. *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev*, **5**, 649-688 (1999).
- Dierks, H., Kolanus, J. and Kolanus, W. *Actin cytoskeletal association of cytohesin-1 is regulated by specific phosphorylation of its carboxyl-terminal polybasic domain. J Biol Chem*, **276**, 37472-37481 (2001).
- Di-Poi, N., Michalik, L., Desvergne, B. and Wahli, W. *Functions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in skin homeostasis Lipids*, **39**, 1093-1099 (2004).
- Dressel, U., Thormeyer, D., Altincicek, B., Paululat, A., Eggert, M., Schneider, S., Tenbaum, S. P., Renkawitz, R. and Baniahmad, A. *Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily. Mol Cell Biol*, **5**, 3383-3394 (1999).
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Wahli, W. *Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell*, **68**, 879-887 (1992).
- Dupre, S. M., Guissouma, H., Flamant, F., Seugnet, I., Scanlan, T. S., Baxter, J. D., Samarut, J., Demeneix, B. A. and Becker, N. *Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. Endocrinology*, **145**, 2337-2345 (2004).
- Duthie, S. M., Taylor, P. L., Anderson, L., Cook, J. and Eidne, K. A. *Cloning and functional characterisation of the human TRH receptor Mol Cell Endocrinol*, **95**, R11-15 (1993).
- Emberley, E. D., Gietz, R. D., Campbell, J. D., HayGlass, K. T., Murphy, L. C. and Watson, P. H. *RanBPM interacts with psoriasin in vitro and their expression correlates with specific clinical features in vivo in breast cancer. BMC Cancer*, **2** (2002).
- Enmark, E. and Gustafsson, J. A. *Orphan nuclear receptors- The first eight years. Mol Endocrinol*, **10**, 1293-1307 (1996).
- Enomoto, K. and Gill, D. M. *Cholera toxin activation of adenylate cyclase. Roles of nucleoside triphosphates and a macromolecular factor in the ADP ribosylation of the GTP-dependent regulatory component. J Biol Chem*, **255**, 1252-1258 (1980).
- Evans, R. M. *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily Science*, **240**, 889-895 (1988).

- Everett, A. W. Clark, W. A. Chizzonite, R. A. Zak, R. *Change in synthesis rates of alpha- and beta-myosin heavy chains in rabbit heart after treatment with thyroid hormone.* *J Biol Chem*, **258**, 2421-2425 (1983).
- Fekete, C., Legradi, G., Mihaly, E., Tatro, J. B., Rand, W. M. and Lechan, R. M. *alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus.* *Neurosci Lett*, **289**, 152-156 (2000).
- Felinski, E. A. and Quinn, P. Q. *The coactivator dTAF(II)110/hTAF(II)135 is sufficient to recruit a polymerase complex and activate the basal transcription mediated by CREB.* *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 13078-13083 (2001).
- Feng, W., Ribeiro, R. C., Wagner, R. L., Nguyen, H., Apriletti, J. W., Fletterick, R. J., Baxter, J. D., Kushner, P. J. and West, B. L. *Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors.* *Science*, **280**, 1747-1749 (1998).
- Feng, X., Jiang, Y., Meltzer, P. and Yen, P. M. *Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray.* *Mol Endocrinol*, **7**, 947-955 (2000).
- Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H. S., Eng, F., Bertos, N. R., Pelletier, N., Mader, S., Han, V. K., Yang, X. J. and White, J. H. *Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms.* *Mol Cell*, **1**, 139-150 (2003).
- Ferre, P. *The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity.* *Diabetes*, **53**, S43-S50 (2004).
- Fischle, W., Wang, Y. and Allis, C. D. *Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond.* *Nature*, **425**, 475-459 (2003).
- Fondell, J. D., Ge, H. and Roeder, R. G. *Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex.* *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 8329-8333 (1996).
- Forman, B. M., Yang, C. R., Au, M., Casanova, J., Ghysdael, J. and Samuels, H. H. *A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel in vivo interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors.* *Mol Endocrinol*, **10**, 1610-1626 (1989).
- Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P. and Chavrier, P. *ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9926-31. (1998).

- Freedman, L. P., Luisi, B. F., Korszun, Z. R., Basavappa, R., Sigler, P. B. and Yamamoto, K. R. *The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. Nature*, **334**, 543-546 (1988).
- Fukuda, H. and Greer, M. A. *The effect of basal hypothalamic deafferentation on the nycthemeral rhythm of plasma TSH. Endocrinology*, **97**, 749-752 (1975).
- Gagnon, F., Langlois, M. F., Michaud, I., Gingras, S., Duchesne, J. F. and Levesque, B. *Spatio-temporal distribution of hypothyroidism in Quebec. Chronic Dis Can*, **1**, 1-8 (2006).
- Garstka, H. L., Facke, M., Escribano, J. R. and Wiesner, R. J. *Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. Biochem Biophys Res Commun*, **200**, 619-626 (1994).
- Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J. P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J. and Samarut, J. *Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. EMBO J*, **18**, 623-631 (1999).
- Gerlitz, G., Darhin, E., Giorgio, G., Franco, B. and Reiner, O. *Novel functional features of the Lis-H domain: role in protein dimerization, half-life and cellular localization. Cell Cycle*, **11**, 1632-1640 (2005).
- Gick, G. G. and Ismail-Beigi, F. *Thyroid hormone induction of Na(+)-K(+)-ATPase and its mRNAs in a rat liver cell line. Am J Physiol*, **258**, C544-51 (1990).
- Glass, C. K., Franco, R., Weinberger, C., Albert, V. R., Evans, R. M. and Rosenfeld, M. G. *A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. Nature*, **329**, 738-741 (1987).
- Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. *The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. Genes Dev*, **14**, 121-141 (2000).
- Glorian, M., Duplus, E., Beale, E. G., Scott, D. K., Granner, D. K. and Forest, C. *A single element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene mediates thiazolidinedione action specifically in adipocytes. Biochimie*, **83**, 933-943 (2001).
- Goodman, R. H. and Smolik, S. *CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. Genes Dev*, **14**, 1553-1577 (2000).
- Goodson, M., Jonas, B. A. and Privalsky, M. A. *Corepressors: custom tailoring and alterations while you wait. Nucl Recept Signal*, **3**, 1-8 (2005).

- Gordon, D. F., Lewis, S. R., Haugen, B. R., James, R. A., McDermott, M. T., Wood, W. M. and Ridgway, E. C. *Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter. J Biol Chem*, **272**, 24339-24347 (1997).
- Greenbaum, L., Katcoff, D. J., Dou, H., Gozlan, Y. and Malik, Z. *A porphobilinogen deaminase (PBGD) Ran-binding protein interaction is implicated in nuclear trafficking of PBGD in differentiating glioma cells. Oncogene*, **22**, 5221-52218 (2003).
- Greenspan, F. S. and Gardner, D. G. *Basic & Clinical Endocrinology*, New York.(2004).
- Guardiola-Diaz, H. M., Rehnmark, S., Usuda, N., Albrektsen, T., Feltkamp, D., Gustafsson, J. A. and Alexson, S. E. *Rat peroxisome proliferator-activated receptors and brown adipose tissue function during cold acclimatization.. J Biol Chem*, **274**, 23368-23377 (1999).
- Guarguaglini, G., Renzi, L., D'Ottavio, F., Di Fiore, B., Casenghi, M., Cundari, E. and Lavia, P. *Regulated Ran-binding protein 1 activity is required for organization and function of the mitotic spindle in mammalian cells in vivo. Cell Growth Differ*, **8**, 455-465 (2000).
- Guenther, M. G., Barak, O. and Lazar, M. A. *The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. Mol Cell Biol*, **18**, 6091-6101 (2001).
- Guenther, M. G., Lane, W. S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M. A. and Shiekhhattar, R. *A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. Genes Dev*, **14**, 1048-1057 (2000).
- Guissouma, H., Dupre, S. M., Becker, N., Jeannin, E., Seugnet, I., Desvergne, B. and Demeneix, B. A. *Feedback on hypothalamic TRH transcription is dependent on thyroid hormone receptor N terminus. Mol Endocrinol*, **16**, 1652-1666 (2002).
- Gullberg, H., Rudling, M., Salto, C., Forrest, D., Angelin, B. and Vennstrom, B. *Requirement for thyroid hormone receptor beta in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice. Mol Endocrinol*, **8**, 1767-1777 (2002).
- Guo, F., Bakal, K., Minokoshi, Y. and Hollenberg, A. N. *Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. Endocrinology*, **145**, 2221-2227 (2004).
- Hadzic, E., Desai-Yajnik, V., Helmer, E., Guo, S., Wu, S., Koudinova, N., Casanova, J., Raaka, B. M. and Samuels, H. H. *A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB. Mol Cell Biol*. 1995 Aug;15(8):4507-17

- Hafizi, S., Gustafsson, A., Stenhoff, J. and Dahlback, B. *The Ran binding protein RanBPM interacts with Axl and Sky receptor tyrosine kinases. Int J Biochem Cell Biol*, **11**, 2344-2356 (2006).
- Harbers, M., Wahlstrom, G. M. and Vennstrom, B. *Transactivation by the thyroid hormone receptor is dependent on the spacer sequence in hormone response elements containing directly repeated half-sites. Nucleic Acids Res*, **24**, 2252-2259 (1996).
- Harkonen, P. L. and Makela, S. I. *Role of estrogens in development of prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol*, **92**, 297-305 (2004).
- Harman, F. S., Nicol, C. J., Marin, H. E., Ward, J. M., Gonzalez, F. J. and Peters, J. M. *Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. Nat Med*, **5**, 481-483 (2004).
- Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C. F., Chandrankunnel, A., Nilni, E. A., Bjoorbaek, C., Elmquist, J. K., Flier, J. S. and Hollenberg, A. N. *Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signalling. J Clin Invest*, **107**, 111-1120 (2001).
- Hartong, R., Wang, N., Kurokawa, R., Lazar, M. A., Glass, C. K., Apriletti, J. W. and Dillmann, W. H. *Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 5' to thyroid hormone receptor in response element 1. J Biol Chem*, **269**, 13021-13029 (1994).
- Hatzivassiliou, E., Koukos, G., Ribeiro, A., Zannis, V. and Kardassis, D. *Functional specificity of two hormone response elements present on the human apoA-II promoter that bind retinoid X receptor alpha/thyroid receptor beta heterodimers for retinoids and thyroids: synergistic interactions between thyroid receptor beta and upstream stimulatory factor 2a. Biochem J*, **376**, 423-431 (2003).
- Hawadle, M. A., Folarin, N., Martin, R. and Jackson, T. R. *Cytohesins and centaurins control subcellular trafficking of macromolecular signaling complexes: regulation by phosphoinositides and ADP-ribosylation factors. Biol Res*, **35**, 247-265 (2002).
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M. G. *A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. Nature*, **387**, 733-736 (1997).
- Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W.,

- Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. *A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. Nature*, **387**, 43-48 (1997).
- Hermanson, O., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. *Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. Trends Endocrinol Metab*, **13**, 55-60 (2002).
- Hevener, A. L., He, W., Barak, Y., Le, J., Bandyopadhyay, G., Olson, P., Wilkes, J., Evans, R. M. and Olefsky, J. *Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. Nat Med*, **12**, 1491-1497 (2003).
- Hirst, M. A., Hinck, L., Danielsen, M. and Ringold, G. M. *Discrimination of DNA response elements for thyroid hormone and estrogen is dependent on dimerization of receptor DNA binding domains. Proc Natl Acad Sci USA*, **12**, 5527-5531 (1992).
- Hodin, R. A., Lazar, M. A., Wintman, B. I., Darling, D. S., Koenig, R. J., Larsen, P. R., Moore, D. D. and Chin, W. W. *Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. Science*, **244**, 76-79 (1989).
- Hollenberg, A. N., Monden, T., Flynn, T. R., Boers, M. E., Cohen, O. and Wondisford, F. E. *The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. Mol Endocrinol*, **9**, 540-550 (1995a).
- Hollenberg, A. N., Monden, T., Madura, J. P., Lee, K. and Wondisford, F. E. *Function of nuclear co-repressor protein on thyroid hormone response elements is regulated by the receptor A/B domain. J Biol Chem*, **271**, 28516-28520 (1996).
- Hollenberg, A. N., Monden, T. and Wondisford, F. E. *Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. J Biol Chem*, **270**, 14274-14280 (1995b).
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L. and Stallcup, M. R. *GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 4948-4952 (1996).
- Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. *Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature*, **377**, 397-404 (1995).
- Hu, E., Tontonoz, P. and Spiegelman, B. M. *Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 9856-9860 (1995).

- Hu, X. and Lazar, M. A. *Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. Trends Endocrinol Metab*, **1**, 6-10 (2000).
- Huang, Z. Q., Li, J., Sachs, L. M., Cole, P. A. and Wong, J. *A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription.. EMBO J*, **22**, 2146-2155 (2003).
- Ideguchi, H., Ueda, A., Tanaka, M., Yang, J., Tsuji, T., Ohno, S., Hagiwara, E., Aoki, A. and Ishigatsubo, Y. *Structural and functional characterization of the USP11 deubiquitinating enzyme, which interacts with the RanGTP-associated protein RanBPM. Biochem J*, **367**, 87-95 (2002).
- Ikedo, M., Kawaguchi, A., Takeshita, A., Chin, W. W., Endo, T. and Onaya, T. *CBP-dependent and independent enhancing activity of steroid receptor coactivator-1 in thyroid hormone receptor-mediated transactivation. Mol Cell Endocrinol*, **147**, 103-112 (1999).
- Incerpi, S., D'Arezzo, S., Marino, M., Musanti, R., Pallottini, V., Pascolini, A. and Trentalance, A. *Short-term activation by low 17beta-estradiol concentrations of the Na⁺/H⁺ exchanger in rat aortic smooth muscle cells: physiopathological implications. Endocrinology*, **144**, 4315-4324 (2003).
- Incerpi, S., Scapin, S., D'Arezzo, S., Spagnuolo, S. and Leoni, S. *Short-term effects of thyroid hormone in prenatal development and cell differentiation. Steroids*, **70**, 434-443 (2005).
- Inoue, H., Furukawa, T., Giannakopoulos, S., Zhou, S., King, D. S. and Tanese, N. *Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin-remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors. J Biol Chem*, **277**, 41674-41685 (2002).
- Ishizuka, T. and Lazar, M. A. *The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. Mol Cell Biol*, **15**, 5122-5131 (2003).
- Ishizuka, T., Satoh, T., Monden, T., Shibusawa, N., Hashida, T., Yamada, M. and Mori, M. *Human immunodeficiency virus type 1 Tat binding protein-1 is a transcriptional coactivator specific for TR. Mol Endocrinol*, **8**, 1329-1343 (2001).
- Issemann, I. and Green, S. *Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature*, **347**, 645-650 (1990).
- Itadani, H., Nakamura, T., Itoh, J., Iwaasa, H., Kanatani, A., Borkowski, J., Ihara, M. and Ohta, M. *Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors. Biochem Biophys Res Commun*, **250**, 68-71 (1998).
- Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J. and Roeder, R. G. *Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel*

- pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. Mol Cell*, **3**, 361-370 (1999).
- Iwasaki, T., Takeshita, A., Miyazaki, W., Chin, W. W. and Koibuchi, N. *The interaction of TRbeta1-N terminus with steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) serves a full transcriptional activation function of SRC-1. Endocrinology*, **147**, 1452-1457 (2006).
- Izumo, S. and Mahdavi, V. *Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. Nature*, **334**, 539-542 (1988).
- Jaaskelainen, J., Deeb, A., Schwabe, J. W., Mongan, N. P., Martin, H. and Hughes, I. A. *Human androgen receptor gene ligand-binding-domain mutations leading to disrupted interaction between the N- and C-terminal domains. J Mol Endocrinol*, **36**, 361-368 (2006).
- Jackson, I. M. D. *Tryptotropin releasing hormone. N Engl J Med*, **306**, 145-154 (1982).
- Jang, Y. J., Ji, J. H., Ahn, J. H., Hoe, K. L., Won, M., Im, D. S., Chae, S. K., Song, S. and Yoo, H. S. *Polo-box motif targets a centrosome regulator, RanGTPase. Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 257-264 (2004).
- Janne, O. A., Moilanen, A. M., Poukka, H., Rouleau, N., Karvonen, U., Kotaja, N., Hakli, M. and Palvimo, J. J. *Androgen-receptor-interacting nuclear proteins. Biochem Soc Trans*, **28**, 401-405 (2000).
- Jenuwein, T. and Allis, C. D. *Translating the histone code. Science*, **293**, 1074-1080 (2001).
- Jepsen, K. and Rosenfeld, M. G. *Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. J Cell Sci*, **115**, 689-698 (2002).
- Johansson, L., Rudling, M., Scanlan, T. S., Lundasen, T., Webb, P., Baxter, J., Angelin, B. and Parini, P. *Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 10297-10302 (2005).
- Johnson, S. E., Winner, D. G. J. and Wang, X. *Ran binding protein 9 interacts with Raf kinase but does not contribute to downstream ERK1/2 activation in skeletal myoblasts. Biochem Biophys Res Commun*, **340**, 409-416 (2006).
- Jones, K. E., Brubaker, J. H. and Chin, W. W. *Evidence that phosphorylation events participate in thyroid hormone action. Endocrinology*, **134**, 543-538 (1994).
- Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A. G., Wahli, W., Meier, C. A. and Desvergne, B. *DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on*

- various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. J Biol Chem, 272, 25252-25259 (1997).*
- Kabil, O., Zhou, Y. and Banerjee, R. *Human cystathionine β -synthase is a target for somuylation. Biochemistry, 45, 13528-13536 (2006).*
- Kahn, R. A. and Gilman, A. G. *Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. J Biol Chem, 259, 6228-6234 (1984).*
- Kakizawa, T., Miyamoto, T., Kaneko, A., Yajima, H., Ichikawa, K. and Hashizume, K. *Ligand-dependent heterodimerization of thyroid hormone receptor and retinoid X receptor. J Biol Chem, 272, 23799-23804 (1997).*
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E. *A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell, 39, 499-509 (1984).*
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. *A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. Cell, 85, 403-414 (1996).*
- Kassabov, S. R., Zhang, B., Persinger, J. and Bartholomew, B. *SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. Mol Cell, 2, 391-403 (2003).*
- Katz, R. W. and Koenig, R. J. *Nonbiased identification of DNA sequences that bind thyroid hormone receptor alpha 1 with high affinity. J Biol Chem, 268, 19392-19397 (1993).*
- Kavok, N. S., Krasilnikova, O. A. and Babenko, N. A. *Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. BMC Cell Biol, 2 (2001).*
- Kim, C. S., Furuya, F., Ying, H., Kato, Y., Hanover, J. A. and Cheng, S. Y. *Gelsolin: a novel thyroid hormone receptor {beta} interacting protein that modulates tumor progression in a mouse model of follicular thyroid cancer. Endocrinology, Epub ahead of print (2006).*
- Kim, M. S., Small, C. J., Stanley, S. A., Morgan, D. G., Seal, L. J., Kong, W. M., Edwards, C. M., Abusnana, S., Sunter, D., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R. *The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. J Clin Invest, 105, 1005-1011 (2000).*

- Kinyamu, H. K., Chen, J. and Archer, T. K. *Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. J Mol Endocrinol*, **34**, 281-297 (2005).
- Klarlund, J. K., Holik, J., Chawla, A., Park, J. G., Buxton, J. and Czech, M. P. *Signaling complexes of the FERM domain-containing protein GRSP1 bound to ARF exchange factor GRP1. J Biol Chem*, **276**, 40065-40070 (2001).
- Klarlund, J. K., Rameh, L. E., Cantley, L. C., Buxton, J. M., Holik, J. J., Sakelis, C., Patki, V., Corvera, S. and Czech, M. P. *Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem*, **273**, 1859-62. (1998).
- Klarlund, J. K., Tsiaras, W., Holik, J. J., Chawla, A. and Czech, M. P. *Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRP1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs. J Biol Chem*, **275**, 32816-21. (2000).
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. *Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. Nature*, **355**, 446-449 (1992a).
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A. and Evans, R. M. *Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. Nature*, **358**, 771-774 (1992b).
- Klink, V. P. and Wolniak, S. M. *Changes in the abundance and distribution of conserved centrosomal, cytoskeletal and ciliary proteins during spermiogenesis in Marsilea vestita. Cell Motil Cytoskeleton*, **56**, 57-73 (2003).
- Kobori, H. Hayashi, M. Saruta, T. *Thyroid Hormone Stimulates Renin Gene Expression Through the Thyroid Hormone Response Element. Hypertension*, **37**, 99-104 (2001).
- Ko, L., Cardona, G. R., Henrion-Caude, A. and Chin, W. W. *Identification and characterization of a tissue-specific coactivator, GT198, that interacts with the DNA-binding domains of nuclear receptors. Mol Cell Biol*, **22**, 357-369 (2002).
- Koenig, R. J., Brent, G. A. and Warne, R. L. *Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction for induction by thyroid hormone. Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 5670-5674 (1987).

- Koenig, R. J., Lazar, M. A., Hodin, R. A., Brent, G. A., Larsen, P. R., Chin, W. W. and Moore, D. D. *Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. Nature*, **337**, 659-661 (1989).
- Kohrle, J. *Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. Mol Cell Endocrinol*, **151**, 103-119 (1999).
- Korthäuer, U., Nagel, W., Davis, E. M., LeBeau, M. M., Menon, M. L., Mitchell, E. O., Kozak, C. A., Kolanus, W. and Bluestone, J. A. *Anergic T lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family. J Immunol*, **164**, 308-318 (2000).
- Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R. L., Ogryzko, V. V., Howard, T., Swanson, M. J., Vassilev, A., Zhang, H., Yamauchi, J., Howard, B. H., Qin, J. and Nakatani, Y. *TBP-associated factors in the PCAF histone acetylase complex. Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 493-499 (1998).
- Kramer, S., Ozaki, T., Miyazaki, K., Kato, C., Hanamoto, T. and Nakagawara, A. *Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. Oncogene*, **24**, 938-944 (2005).
- Kutay, U., Hartmann, E., Treichel, N., Calado, A., Carmo-Fonseca, M., Prehn, S., Kraft, R., Gorlich, D. and Bischoff, F. R. *Identification of two novel RanGTP-binding proteins belonging to the importin beta superfamily. J Biol Chem*, **275**, 40163-40168 (2000).
- LaCasse, E. C., Lochnan, H. A., Walker, P. and Lefebvre, Y. A. *Identification of binding proteins for nuclear localization signals of the glucocorticoid and thyroid hormone receptors. Endocrinology*, **132**, 1017-1025 (1993).
- Laflamme, L., Hamann, G., Messier, N., Maltais, S. and Langlois, M. F. *RXR acts as a coregulator in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis by thyroid hormone receptors. J Mol Endocrinol*, **29**, 61-72 (2002).
- Langille, S. E., Patki, V., Klarlund, J. K., Buxton, J. M., Holik, J. J., Chawla, A., Corvera, S. and Czech, M. P. *ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. J Biol Chem*, **274**, 27099-104. (1999).
- Langlois, M. F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J. D., Hollenberg, A. N. and Wondisford, F. E. *A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. J Biol Chem*, **272**, 24927-24933 (1997).
- Laudet, V. and Gronemeyer, H. *The nuclear receptors factbooks*, Academic, San Diego, California, USA.(2001).

- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. and Stéhelin, D. *Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. EMBO J*, **11**, 1003-1013 (1992).
- Lazar, M. A. *Thyroid hormone action: a binding contract. J Clin Invest*, **112**, 497-499 (2003).
- Lazar, M. A., Hodin, R. A. and Chin, W. W. *Human carboxyl-terminal variant of alpha-type c-erbA inhibits trans-activation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone. Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 7771-7774 (1989).
- Lechan, R. M., Qi, Y., Jackson, I. M. and Mahdavi, V. *Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. Endocrinology*, **135**, 92-100 (1994).
- Lee, K. C., Li, J., Cole, P. A., Wong, J. and Kraus, W. L. *Transcriptional activation by thyroid hormone receptor-beta involves chromatin remodeling, histone acetylation, and synergistic stimulation by p300 and steroid receptor coactivators. Mol Endocrinol*, **5**, 908-922 (2003).
- Lee, S. K., Anzick, S. L., Choi, J. E., Bubendorf, L., Guan, X. Y., Jung, Y. K., Kallioniemi, O. P., Kononen, J., Trent, J. M., Azorsa, D., Jhun, B. H., Cheong, J. H., Lee, Y. C., Meltzer, P. S. and Lee, J. W. *A nuclear factor, ASC-2, as a cancer-amplified transcriptional coactivator essential for ligand-dependent transactivation by nuclear receptors in vivo. J Biol Chem*, **274**, 34283-34293 (1999).
- Lee, Y. H., Koh, S. S., Zhang, X., Cheng, X. and Stallcup, M. R. *Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. Mol Cell Biol*, **11**, 3621-3632 (2002).
- Legradi, G., Emerson, C. H., Ahima, R. S., Flier, J. S. and Lechan, R. M. *Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. Endocrinology*, **138**, 2569-2576 (1997).
- Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M. and Kliewer, S. A. *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J Biol Chem*, **270**, 12953-12956 (1995).
- Leitman, D. C., Costa, C. H., Graf, H., Baxter, J. D. and Ribeiro, R. C. *Thyroid hormone activation of transcription is potentiated by activators of cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem*, **271**, 21950-21955 (1996).

- Lemon, B., Inouye, C., King, D. S. and Tjian, R. *Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. Nature*, **414**, 924-928 (2001).
- Leng, X., Cooney, A. J., Tsai, S. Y. and Tsai, M. J. *Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression. Mol Cell Biol*, **16**, 2332-2340 (1996).
- Li, D., Li, T., Wang, F., Tian, H. and Samuels, H. H. *Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. Mol Cell Biol*, **16** (2002).
- Li, D., Yamada, T., Wang, F., Vulin, A. I. and Samuels, H. H. *Novel roles of retinoid X receptor (RXR) and RXR ligand in dynamically modulating the activity of the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. J Biol Chem*, **279**, 7427-7437 (2004).
- Li, J., Lin, Q., Wang, W., Wade, P. and Wong, J. *Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. Genes Dev*, **16**, 687-692 (2002).
- Li, J., O'Malley, B. W. and Wong, J. *p300 requires its histone acetyltransferase activity and SRC-1 interaction domain to facilitate thyroid hormone receptor activation in chromatin. Mol Cell Biol*, **6**, 2031-2042 (2000a).
- Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J. M., Qin, J. and Wong, J. *Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. EMBO J*, **19**, 4342-4350 (2000b).
- Lin, H. Y., Davis, F. B., Gordinier, J. K., Martino, L. J. and Davis, P. J. *Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. Am J Physiol*, **276**, C1014-C1024 (1999).
- Lin, H. Y., Zhang, S., West, B. L., Tang, H. Y., Passaretti, T., Davis, F. B. and Davis, P. J. *Identification of the putative MAP kinase docking site in the thyroid hormone receptor-beta1 DNA-binding domain: functional consequences of mutations at the docking site. Biochemistry*, **42**, 7571-7579 (2003).
- Lin, S. M., Cheng, J., Lu, Y. Y., Zhang, S. L., Yang, Q., Chen, T. Y., Liu, M. and Wang, L. *Screening and identification of interacting proteins with hepatitis B virus core protein in leukocytes and cloning of new gene C1. World J Gastroenterol*, **12**, 1043-1048 (2006).
- Liu, Y., Shinichiro, A., Xia, X., Yao, R., Kim, M., Fondell, J. D., Joseph, Y., Yen, P. M. *p62, A TFIIF Subunit, Directly Interacts with Thyroid Hormone Receptor and Enhances T₃-Mediated Transcription. Mol Endocrinol*, **19**, 879-884, (2005a).

- Liu, Y., Xia, X., Fondell, J. D. and Yen, P. M. *Thyroid hormone-regulated target genes have distinct patterns of coactivator recruitment and histone acetylation. Mol Endocrinol*, **20**, 483-490 (2006b).
- Lopez, I. P., Marti, A., Milagro, F. I., Zulet, L., Moreno-Aliaga, M. J., Martinez, J. A. and De Miguel, C. *DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. Obes Res*, **11**, 188-194 (2003).
- Lou, Y. R., Qiao, S., Talonpoika, R., Syvala, H. and Tuohimaa, P. *The role of Vitamin D3 metabolism in prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol*, **92**, 317-325 (2004).
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. Nature*, **389**, 251-260 (1997).
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. and Sigler, P. B. *Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. Nature*, **352**, 497-505 (1991).
- Lutz, W., Frank, E. M., Craig, T. A., Thompson, R., Venters, R. A., Kojetin, D., Cavanagh, J. and Kumar, R. *Calbindin D28K interacts with Ran-binding protein M: identification of interacting domains by NMR spectroscopy. Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 1186-1192 (2003).
- Madison, L. D., Ahlquist, J. A., Rogers, S. D. and Jameson, J. L. *Negative regulation of the glycoprotein hormone alpha gene promoter by thyroid hormone: mutagenesis of a proximal receptor binding site preserves transcriptional repression. Mol Cell Endocrinol*, **94**, 129-136 (1993).
- Magner, J. A. *Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity. Endocr Rev*, **2**, 354-385 (1990).
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R. M. *The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell*, **83**, 835-839 (1995).
- Mansen, A., Yu, F., Forrest, D., Larsson, L. and Vennstrom, B. *TRs have common and isoform-specific functions in regulation of the cardiac myosin heavy chain genes. Mol Endocrinol*, **15**, 2106-2114 (2001).
- Marimuthu, A., Feng, W., Tagami, T., Nguyen, H., Jameson, J. L., Fletterick, R. J., Baxter, J. D. and West, B. L. *TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. Mol Endocrinol*, **2**, 271-286 (2002).
- Marmorstein, R. *Structure of histone acetyltransferases. J Mol Biol*, **311**, 433-444 (2001).

- Maruvada, P., Baumann, C. T., Hager, G. L. and Yen, P. M. *Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. J Biol Chem*, **278**, 12425-12432 (2003).
- Marx, N., Bourcier, T., Sukhova, G. K., Libby, P. and Plutzky, J. *PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, **3**, 546-551 (1999).
- Mathur, M., Tucker, P. W. and Samuels, H. H. *PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. Mol Cell Biol*, **21**, 2298-311. (2001).
- Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S. H., Gavrilova, O., Ward, J. M., Brewer, B., Reitman, M. L. and Gonzalez, F. J. *Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. J Clin Invest*, **111**, 737-747 (2003).
- McInerney, E. M., Rose, D. W., Flynn, S. E., Westin, S., Mullen, T. M., Kronen, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R. T., Assa-Munt, N., Milburn, M. V., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. *Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. Genes Dev*, **12**, 3357-3368 (1998).
- McKenna, N. J., Lanz, R. B. and O'Malley, B. W. *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. Endocrine rev*, **20**, 321-344 (1999).
- Mendus, G., May, M., Carre, L., Chambon, P. and Davidson, I. *Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. Genes Dev*, **11**, 1381-1395 (1997).
- Menon, R. P., Gibson, T. J. and Pastore, A. *The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising center. J Mol Biol*, **343**, 43-53 (2004).
- Metzger, D., Ali, S., Bornert, J. M. and Chambon, P. *Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. J Biol Chem*, **270**, 9535-9542 (1995).
- Mikolajczyk, M., Shi, J., Vaillancourt, R. R., Sachs, N. A. and Nelson, M. *The cyclin-dependent kinase 11(p46) isoform interacts with RanBPM. Biochem Biophys Res Commun*, **310**, 14-18 (2003).

- Miyamoto, T., Suzuki, S. and DeGroot, L. J. *High affinity and specificity of dimeric binding of thyroid hormone receptors to DNA and their ligand-dependent dissociation. Mol Endocrinol*, **2**, 224-231 (1993).
- Mizuno, T. M., Kleopoulos, S. P., Bergen, H. T., Roberts, J. L., Priest, C. A. and Mobbs, C. V. *Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. Diabetes*, **47**, 294-297 (1998).
- Moilanen, A. M., Poukka, H., Karvonen, U., Hakli, M., Janne, O. A. and Palvimo, J. J. *Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. Mol Cell Biol*, **9**, 5128-5139 (1998).
- Moriarty, K. Kim, K. H. Bender, J. R. Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signalling. *Endocrinology*, **147**, 5557-5563 (2006).
- Morley, J. E. *Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. Endocr Rev*, **2**, 396-436 (1981).
- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T., Vennstrom, B. and Bernal, J. *Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 3985-3989 (2002).
- Motojima, K., Passilly, P., Peters, J. M., Gonzalez, F. J. and Latruffe, N. *Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. J Biol Chem*, **273**, 16710-16714 (1998).
- Naar, A. M., Boutin, J. M., Lipkin, S. M., Yu, V. C., Holloway, J. M., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. *The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. Cell*, **65**, 1267-1279 (1991).
- Nagaya, T., Fujieda, M. and Seo, H. *Requirement of corepressor binding of thyroid hormone receptor mutants for dominant negative inhibition. Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 620-623 (1998).
- Nagayama, Y., Kaufman, K. D., Seto, P. and Rapoport, B. *Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. Biochem Biophys Res Commun*, **165**, 1184-1190 (1989).
- Nagayama, Y., Tanaka, K., Hara, T., Namba, H., Yamashita, S., Taniyama, K. and Niwa, M. *Involvement of G protein-coupled receptor kinase 5 in homologous desensitization of the thyrotropin receptor. J Biol Chem*, **271**, 10143-10148 (1996).

- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L. and Evans, R. M. *Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. Cell*, **89**, 373-380 (1997).
- Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M. and Nishimoto, T. *When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. J Cell Biol*, **143**, 1041-1052 (1998).
- Nakano, K., Matsushita, A., Sasaki, S., Misawa, H., Nishiyama, K., Kashiwabara, Y. and Nakamura, H. *Thyroid-hormone-dependent negative regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone receptors: study with a new experimental system using CV1 cells. Biochem J*, **378**, 549-557 (2004).
- Nascimento, A. S., Dias, S. M., Nunes, F. M., Aparicio, R., Ambrosio, A. L., Bleicher, L., Figueira, A. C., Santos, M. A., de Oliveira Neto, M., Fischer, H., Togashi, M., Craievich, A. F., Garratt, R. C., Baxter, J. D., Webb, P. and Polikarpov, I. *Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in the receptor function. J Mol Biol*, **360**, 586-598 (2006).
- Nevrivy, D. J., Peterson, V. J., Avram, D., Ishmael, J. E., Hansen, S. G., Dowell, P., Hraby, D. E., Dawson, M. I. and Leid, M. *Interaction of GRASP, a protein encoded by a novel retinoic acid- induced gene, with members of the cytohesin family of guanine nucleotide exchange factors. J Biol Chem*, **275**, 16827-16836 (2000).
- Nguyen, N. H., Apriletti, J. W., Baxter, J. D. and Scanlan, T. S. *Hammett analysis of selective thyroid hormone receptor modulators reveals structural and electronic requirements for hormone antagonists. J Am Chem Soc*, **127**, 4599-4 (2005).
- Nguyen, N. H., Apriletti, J. W., Cunha Lima, S. T., Webb, P., Baxter, J. D. and Scanlan, T. S. *Rational design and synthesis of a novel thyroid hormone antagonist that blocks coactivator recruitment. J Med Chem*, **45**, 3310-3320 (2002).
- Nishikawa, J., Kitaura, M., Imagawa, M. and Nishihara, T. *Vitamin D receptor contains multiple dimerization interfaces that are functionally different. Nucleic Acids Res*, **23**, 606-611 (1995).
- Nishimoto, T. *A new role of ran GTPase. Biochem Biophys Res Commun*, **262**, 571-574 (1999).
- Nishitani, H., Hirose, E., Uchimura, Y., Nakamura, M., Umeda, M., Nishii, K., Mori, N. and Nishimoto, T. *Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of*

- proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. Gene, 272, 25-33 (2001).*
- Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K. and Milburn, M. V. *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Nature, 395, 137-143 (1998).*
- Noma, K., Allis, C. D. and Grewal, S. I. *Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. Science, 293, 1150-1155 (2001).*
- Norman, M. F., Lavin, T. N., Baxter, J. D. and West, B. L. *The rat growth hormone gene contains multiple thyroid response elements. J Biol Chem., 264, 12063-12073 (1989).*
- Norris, A. W., Chen, L., Fisher, S. J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A. C., Hirshman, M. F., Rosen, E. D., Goodyear, L. J., Gonzalez, F. J., Spiegelman, B. M. and Kahn, C. R. *Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. J Clin Invest, 112, 608-618 (2003).*
- Nunes, F. M., Aparicio, R., Santos, M. A., Portugal, R. V., Dias, S. M., Neves, F. A., Simeoni, L. A., Baxter, J. D., Webb, P. and Polikarpov, I. *Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of isoform alpha1 of the human thyroid hormone receptor ligand-binding domain. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 60, 1867-1870 (2004).*
- Oatey, P. B., Venkateswarlu, K., Williams, A. G., Fletcher, L. M., Foulstone, E. J., Cullen, P. J. and Tavare, J. M. *Confocal imaging of the subcellular distribution of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in insulin- and PDGF-stimulated 3T3-L1 adipocytes. Biochemical Journal, 344, 511-518 (1999).*
- Oberste-Berghaus, C., Zanger, K., Hashimoto, K., Cohen, R. N., Hollenberg, A. N. and Wondisford, F. E. *Thyroid hormone-independent interaction between the thyroid hormone receptor beta2 amino terminus and coactivators. J Biol Chem, 275, 1787-1792 (2000).*
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. and Nakatani, Y. *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. Cell, 87, 953-959 (1996).*
- Olswang, Y., Cohen, H., Papo, O., Cassuto, H., Croniger, C. M., Hakimi, P., Tilghman, S. M., Hanson, R. W. and Reshef, L. *A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate*

- carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. Proc Natl Acad Sci USA, 99, 625-630 (2002).*
- O'Malley, B. W. *The steroid receptor superfamily : more excitement predicted for the future. Mol Endocrinol, 125, 1119-1120 (1990).*
- Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. Science, 270, 1354-1357 (1995).*
- Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Mariash, C. N., Kinlaw, W. B., Wong, N. C. and Freaque, H. C. *Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. Endocrine Rev, 3, 288-308 (1987).*
- Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L. and Strait, K. A. *Molecular Basis of thyroid hormone action, Lippincott-Raven, New York.(1996).*
- Palmer, C. N., Hsu, M. H., Griffin, H. J. and Johnson, E. F. *Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signalling. J Biol Chem, 270, 16114-1621 (1995).*
- Park, H. Y., Davidson, D., Raaka, B. M. and Samuels, H. H. *The herpes simplex virus thymidine kinase gene promoter contains a novel thyroid hormone response element. Mol Endocrinol, 3, 319-330 (1993).*
- Perissi, V., Dasen, J. S., Kurokawa, R., Wang, Z., Korzus, E., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. *Factor-specific modulation of CREB-binding protein acetyltransferase activity. Proc Natl Acad Sci USA, 96, 3652-3657 (1999).*
- Petty, K. J., Desvergne, B., Mitsushashi, T. and Nikodem, V. M. *Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene. J Biol Chem, 265, 7395-7400 (1990).*
- Pillar, T. M. and Seitz, H. J. *Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function. Eur J Endocrinol, 136, 231-239 (1997).*
- Plateroti, M., Gauthier, K., Domon-Dell, C., Freund, J. N., Samarut, J. and Chassande, O. *Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. Mol Cell Biol, 14, 4761-4772 (2001).*
- Poirier, M. B., Brunelle, M. and Langlois, M. F. *The implication of RanBPM in the regulation of the hypothalamic-pituitary axis by thyroid hormone Thyroid, Soumis à Thyroid, novembre (2006a).*

- Poirier, M. B., Hamann, G., Domingue, M. E., Roy, M., Bardati, T. and Langlois, M. F. *General receptor for phosphoinositides 1, a novel repressor of thyroid hormone receptor action that prevents deoxyribonucleic acid binding, Mol Endocrinol*, **19**, 1991-2005 (2005).
- Poirier, M. B., Laflamme, L. and Langlois, M. F. *Identification and characterization of RanBPM, a novel coactivator of thyroid hormone receptors, J Mol Endocrinol*, **36**, 313-325 (2006b).
- Ponting, C., Schultz, J. and Bork, P. *SPRY domains in ryanodine receptors (Ca²⁺)-release channels) Trends in Biochemical, Science*, **22**, 193-4 (1997).
- Potter, G. B., Beaudoin, G. M., DeRenzo, C. L., Zarach, J. M., Chen, S. H. and Thompson, C. C. *The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor, Genes Dev*, **15**, 2687-26701 (2001).
- Poukka, H., Aarnisalo, P., Santti, H., Janne, O. A. and Palvimo, J. J. *Coregulator small nuclear RING finger protein (SNURF) enhances Sp1- and steroid receptor-mediated transcription by different mechanisms, J Biol Chem*, **275**, 571-579 (2000a).
- Poukka, H., Karvonen, U., Yoshikawa, N., Tanaka, H., Palvimo, J. J. and Janne, O. A. *The RING finger protein SNURF modulates nuclear trafficking of the androgen receptor, J Cell Sci*, **113**, 2991-3001 (2000b).
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B. M. *A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis, Cell*, **92**, 829-839 (1998).
- Quigley, C. A., Tan, J. A., He, B., Zhou, Z. X., Mebarki, F., Morel, Y., Forest, M. G., Chatelain, P., Ritzen, E. M., French, F. S. and Wilson, E. M. *Partial androgen insensitivity with phenotypic variation caused by androgen receptor mutations that disrupt activation function 2 and the NH(2)- and carboxyl-terminal interaction, Mech Ageing Dev*, **125**, 683-695 (2004).
- Rachez, C., Lemon, B. D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Naar, A. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Freedman, L. P. *Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex, Nature*, **398**, 824-828 (1999).
- Rao, M. A., Cheng, H., Quayle, A. N., Nishitani, H., Nelson, C. C. and Rennie, P. S. *RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor, J Biol Chem*, **277**, 48020-48027 (2002).

- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. and Jenuwein, T. *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*, *Nature*, **406**, 593-599 (2000).
- Ren, Y., Behre, E., Ren, Z., Zhang, J., Wang, Q. and Fondell, J. D. *Specific structural motifs determine TRAP220 interactions with nuclear hormone receptors*, *Mol Cell Biol*, **20**, 5433-5446 (2000).
- Ribeiro, R. C., Apriletti, J. W., Wagner, R. L., Feng, W., Kushner, P. J., Nilsson, S., Scanlan, T. S., West, B. L., Fletterick, R. J. and Baxter, J. D. *X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **65**, 133-41 (1998).
- Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum, J. L., Auwerx, J., Palinski, W. and Glass, C. K. *Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 7614-7619 (1998).
- Rosen, E. D., O'Donnell, A. L. and Koenig, R. J. *Ligand-dependent synergy of thyroid hormone and retinoid X receptors*. *J Biol Chem*, **267**, 22010-22013 (1992).
- Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. *PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth*. *J Biol Chem*, **276**, 37731-37734 (2001).
- Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K. *Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors*. *J Biol Chem*, **276**, 36865-36868 (2001).
- Roth, M. G., Bi, K., Ktistakis, N. T. and Yu, S. *Phospholipase D as an effector for ADP-ribosylation factor in the regulation of vesicular traffic*. *Chem Phys Lipids*, **98**, 141-152 (1999).
- Saitoh, M., Takayanagi, R., Goto, K., Fukamizu, A., Tomura, A., Yanase, T. and Nawata, H. *The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domains in the AR is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors: a three-dimensional imaging study*. *Mol Endocrinol*, **4**, 694-706 (2002).
- Salghetti, S. E., Muratani, M., Wijnen, H., Fitcher, B. and Tansey, W. P. *Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 3118-3123 (2000).
- Salto, C., Kindblom, J. M., Johansson, C., Wang, Z., Gullberg, H., Nordstrom, K., Mansen, A., Ohlsson, C., Thoren, P., Forrest, D. and Vennstrom, B. *Ablation of TRalpha2 and a*

- concomitant overexpression of alpha1 yields a mixed hypo- and hyperthyroid phenotype in mice. Mol Endocrinol*, **12**, 2115-2128 (2001).
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J. and Kouzarides, T. *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. Nature*, **419**, 407-411 (2002).
- Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F. J., DeAngelo, D. J., Partridge, J. B., Holden, S. A., Chen, L. B., Singer, S., Fletcher, C. and Spiegelman, B. M. *Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. Nat Med*, **9**, 1046-1052 (1998).
- Sasaki, S., Lesoon-Wood, L. A., Dey, A., Kuwata, T., Weintraub, B. D., Humphrey, G., Yang, W. M., Seto, E., Yen, P. M., Howard, B. H. and Ozato, K. *Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. EMBO J*, **18**, 5389-5398 (1999).
- Scanlan, T. S., Suchland, K. L., Hart, M. E., Chiellini, G., Huang, Y., Kruzich, P. J., Frascarelli, S., Crossley, D. A., Bunzow, J. R., Ronca-Testoni, S., Lin, E. T., Hatton, D., Zucchi, R. and Grandy, D. K. *3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. Nat Med*, **10**, 638-642 (2004).
- Scanlon, W. F. and Weightman, D. R. *Dopamine is a physiological regulator of thyrotropin secretion in man. J Clin Endocrinol (Oxf)*, **10**, 7 (1970).
- Schapira, M., Raaka, B. M., Das, S., Fan, L., Totrov, M., Zhou, Z., Wilson, S. R., Abagyan, R. and Samuels, H. H. *Discovery of diverse thyroid hormone receptor antagonists by high-throughput docking. Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 7354-7359 (2003).
- Schmidt, B. M., Martin, N., Georgens, A. C., Tillmann, H. C., Feuring, M., Christ, M. and Wehling, M. *Nongenomic cardiovascular effects of triiodothyronine in euthyroid male volunteers J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 1681-1686 (2002).
- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A. M., Heyman, R. A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B. and Auwerx, J. *PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPARE in the lipoprotein lipase gene. EMBO J*, **15**, 5336-5348 (1996).
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C. P. *SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5857-5864 (1998).

- Seelig, S., Liaw, C., Towle, H. C. and Oppenheimer, J. H. *Thyroid hormone attenuates and augments hepatic gene expression at a pretranslational level. Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 4733-4737 (1981).
- Segerson, T. P., Kauer, J., Wolfe, H. C., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, I. M. and Lechan, R. M. *Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. Science*, **238**, 78-80 (1987).
- Seol, W., Mahon, M. J., Lee, Y. K. and Moore, D. D. *Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP13/N-CoR. Mol Endocrinol*, **12**, 1646-1655 (1996).
- Sharma, D. and Fondell, J. D. *Temporal formation of distinct thyroid hormone receptor coactivator complexes in HeLa cells. Mol Endocrinology*, **14**, 2001-2009 (2000).
- Sharma, D. and Fondell, J. D. *Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo. Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 7934-7939 (2002).
- Shi, Y., Hon, M. and Evans, R. M. *The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signalling. Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 2613-2618 (2002).
- Shibata, N., Tsunekawa, N., Okamoto-Ito, S., Akasu, R., Tokumasu, A. and Noce, T. *Mouse RanBPM is a partner gene to a germline specific RNA helicase, mouse vasa homolog protein. Mol Reprod Dev*, **67**, 1-7 (2004).
- Shibusawa, N., Hashimoto, K., Nikrodhanond, A. A., Liberman, M. C., Applebury, M. L., Liao, X. H., Robbins, J. T., Refetoff, S., Cohen, R. N. and Wondisford, F. E. *Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. J Clin Invest*, **112**, 588-597 (2003a).
- Shibusawa, N., Hollenberg, A. N. and Wondisford, F. E. *Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. J Biol Chem*, **278**, 732-738 (2003b).
- Shih, A., Lin, H. Y., Davis, F. B. and Davis, P. J. *Thyroid hormone promotes serine phosphorylation of p53 by mitogen-activated protein kinase. Biochemistry*, **40**, 2870-2878 (2001).
- Shulman, A. I. and Mangelsdorf, D. J. *Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. N Engl J Med*, **353**, 604-615 (2005).

- Shupnik, M. A., Ridgway, E. C. and Chin, W. W. *Molecular biology of thyrotropin. Endocrine Rev*, **4**, 459-475 (1989).
- Silva, J. E. *Thyroid hormone and the energetic cost of keeping body temperature. Biosci Rep*, **25**, 129-48 (2005).
- Simonides, W. S., Brent, G. A., Thelen, M. H., van der Linden, C. G., Larsen, P. R. and van Hardeveld, C. *Characterization of the promoter of the rat sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1 gene and analysis of thyroid hormone responsiveness. J Biol Chem*, **271**, 32048-32056 (1996).
- Sjoberg, M. and Vennstrom, B. *Ligand-dependent and -independent transactivation by thyroid hormone receptor beta 2 is determined by the structure of the hormone response element. Mol Cell Biol*, **9**, 4718-4726 (1995).
- Smith, C. L., Onate, S. A., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. *CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8884-8888 (1996).
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. *Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. Nature*, **389**, 194-198 (1997).
- Sterling, K. and Brenner, M. A. *Thyroid hormone action: effect of triiodothyronine on mitochondrial adenine nucleotide translocase in vivo and in vitro. Metabolism*, **44**, 193-199 (1995).
- Sterner, D. E. and Berger, S. L. *Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 435-459 (2000).
- Suzuki, S., Miyamoto, T., Opsahl, A., Sakurai, A. and DeGroot, L. J. *Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of human thyroid hormone receptor beta 1. Mol Endocrinol. Mar;8(3)*, **3**, 305-314 (1994).
- Tagami, T., Kopp, P., Johnson, W., Arseven, O. K. and Jameson, J. L. *The thyroid hormone receptor variant alpha2 is a weak antagonist because it is deficient in interactions with nuclear receptor corepressors. Endocrinology*, **139**, 2535-2544 (1998).
- Tagami, T., Madison, L. D., Nagaya, T. and Jameson, J. L. *Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. Mol Cell Biol*, **17**, 2642-2648 (1997).

- Tagami, T., Park, Y. and Jameson, J. L. *Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor. J Biol Chem*, **274**, 22345-22353 (1999).
- Takeshita, A., Cardona, G. R., Koibuchi, N., Suen, C. S. and Chin, W. W. *TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. J Biol Chem*, **272**, 27629-27634 (1997).
- Takeuchi, Y., Murata, Y., Sadow, P., Hayashi, Y., Seo, H., Xu, J., O'Malley, B. W., Weiss, R. E. and Refetoff, S. *Steroid receptor coactivator-1 deficiency causes variable alterations in the modulation of T₃-regulated transcription of genes in vivo. Endocrinology*, **143**, 1346-1352 (2002).
- Tang, H. Y., Lin, H. Y., Zhang, S., Davis, F. B. and Davis, P. J. *Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. Endocrinology*, **145**, 3265-3272 (2004).
- Tang, X., Zhang, J., Cai, Y., Miao, S., Zong, S., Koide, S. S. and Wang, L. *Sperm membrane protein (hSMP-1) and RanBPM complex in the microtubule-organizing centre. J Mol Med*, **82**, 383-388 (2004).
- Thornton, J. E., Cheung, C. C., Clifton, D. K. and Steiner, R. A. *Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice Endocrinology*, **138**, 5063-5066 (1997).
- Thummel, C. S. *From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of drosophila nuclear receptor superfamily members. Cell*, **83**, 871-877 (1995).
- Tian, H., Mahajan, M. A., Wong, C. T., Habeos, I. and Samuels, H. H. *The N-Terminal A/B domain of the thyroid hormone receptor-beta2 isoform influences ligand-dependent recruitment of coactivators to the ligand-binding domain. Mol Endocrinol*, **9**, 2036-2051 (2006).
- Ting, Y. T., Bhat, M. K., Wong, R. and Cheng, S. *Tissue-specific stabilization of the thyroid hormone beta1 nuclear receptor by phosphorylation. J Biol Chem*, **272**, 4129-4134 (1997).
- Toft, D. and et al *A receptor molecule for estrogens: studies using a cell-free system Proc Natl Acad Sci USA*, **57**, 1740-1743 (1967).
- Togashi, H., Schmidt, E. F. and Strittmatter, S. M. *RanBPM contributes to Semaphorin3A signaling through plexin-A receptors. J Neurosci*, **26**, 4961-4969 (2006).

- Tomaru, T., Satoh, T., Yoshino, S., Ishizuka, T., Hashimoto, K., Monden, T., Yamada, M. and Mori, M. *Isolation and characterization of a transcriptional cofactor and its novel isoform that bind the deoxyribonucleic acid-binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. *Endocrinology*, **147**, 377-388 (2006).
- Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E. G. and Spiegelman, B. M. *PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene*. *Mol Cell Biol*, **1**, 351-357 (1995).
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I. and Spiegelman, B. M. *mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer*. *Genes Dev*, **8**, 1224-1234 (1994a).
- Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M. *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. *Cell*, **79**, 1147-1156 (1994b).
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. *The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function*. *Nature*, **387**, 677-684 (1997).
- Tordjman, J., Chauvet, G., Quette, J., Beale, E. G., Forest, C. and Antoine, B. *Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells*. *J Biol Chem*, **278**, 18785-18790 (2003).
- Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J. A., Shaw, G. and Lefkowitz, R. J. *Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains*. *J Biol Chem*, **269**, 10217-10220 (1994).
- Umeda, M., Nishitani, H. and Nishimoto, T. *A novel nuclear protein, Twa1, and Muskelin comprise a complex with RanBPM*. *Gene*, **303**, 47-54 (2003).
- Umesono, K. and Evans, R. M. *Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors*. *Cell*, **57**, 1139-1146 (1989).
- Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C. and Evans, R. M. *Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors*. *Cell*, **65**, 1255-1266 (1991).
- Vale, W., Brazeau, P., Rivier, C., Brown, M., Boss, B., Rivier, J., Burgus, R., Ling, N. and Guillemin, R. *Somatostatin*. *Recent Prog Horm Res*, **31**, 365-397 (1975).
- Venkateswarlu, K., Gunn-Moore, F., Oatey, P. B., Tavares, J. M. and Cullen, P. J. *Nerve growth factor- and epidermal growth factor-stimulated translocation of the ADP-ribosylation factor-exchange factor GRP1 to the plasma membrane of PC12 cells requires activation*

- of phosphatidylinositol 3-kinase and the GRP1 pleckstrin homology domain. Biochem J*, **335**, 139-46. (1998).
- Vernet, C., Boretto, J., Mattei, M. G., Takahashi, M., Jack, L. J., Mather, I. H., Rouquier, S. and Pontarotti, P. *Evolutionary study of multigenic families mapping close to the human MHC class I region. J Mol Evol*, **37**, 600-612 (1993).
- Vidal-Puig, A., Jimenez-Linan, M., Lowell, B. B., Hamann, A., Hu, E., Spiegelman, B., Flier, J. S. and Moller, D. E. *Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. J Clin Invest*, **97**, 2553-2561 (1996).
- Villicev, C. M., Freitas, F. R., Aoki, M. S., Taffarel, C., Scanlan, T. S., Moriscot, A. S., Ribeiro, M. O., Bianco, A. C., Gouveia, C. H. *Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. J Endocrinol Invest*, **193**, 21-29 (2007).
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. *TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. EMBO J*, **15**, 3667-3675 (1996).
- Wagner, R. L., Apriletti, J. W., McGrath, M. E., West, B. L., Baxter, J. D. and Fletterick, R. J. *A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. Nature*, **378**, 690-697 (1995).
- Wahlstrom, G. M., Sjoberg, M., Andersson, M., Nordstrom, K. and Vennstrom, B. *Binding characteristics of the thyroid hormone receptor homo- and heterodimers to consensus AGGTCA repeat motifs. Mol Endocrinol*, **7**, 1013-1022 (1992).
- Wang, D., Li, Z., Messing, E. M. and Wu, G. *Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. J Biol Chem*, **277**, 36216-36222 (2002).
- Wang, Y., Schneider, E. M., Li, X., Duttonhofer, I., Debatin, K. and Hug, H. *HIPK2 associates with RanBPM. Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 148-153 (2002).
- Wang, Y. X., Lee, C. H., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H. and Evans, R. M. *Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. Cell*, **113**, 159-170 (2003).
- Wang, Y. X., Zhang, C. L., Yu, R. T., Cho, H. K., Nelson, M. C., Bayuga-Ocampo, C. R., Ham, J., Kang, H. and Evans, R. M. *Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. PLoS Biol*, **10**, e294 (2004).
- Weber, C. H. and Vincenz, C. *The death domain superfamily: a tale of two interfaces? Trends Biochem Sci*, **8**, 475-481 (2001).

- Weber, T. Zimmermann, U. Winter, H. Mack, A. Köpschall, I. Rohbock, K. Zenner, H.-P. Knipper, M. *Thyroid hormone is a critical determinant for the regulation of the cochlear motor protein prestin. Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 2901–2906 (2002).
- Weeke, J., Hansen, A. P. and Lundaek, K. *Inhibition by somatostatin of basal levels of serum thyrotropin (TSH) in normal men. J Clin Endocrinol Metab*, **41**, 168-171 (1975).
- Weinberger, C., Giguere, V., Hollenberg, S., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. *Human steroid receptors and erbA proto-oncogene products: members of a new superfamily of enhancer binding proteins. Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51**, 759-772 (1986).
- Weiss, R. E. and Ramos, H. E. *Thyroid hormone receptor subtypes and their interaction with steroid receptor coactivators. Vitam Horm*, **68**, 185-207 (2004).
- Weiss, R. E. and Refetoff, S. *Resistance to thyroid hormone. Rev Endocr Metab Disord*, **1-2**, 97-108 (2000).
- Westin, S., Kurokawa, R., Nolte, R. T., Wisely, G. B., McInerney, E. M., Rose, D. W., Milburn, M. V., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K. *Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. Nature*, **395**, 199-202 (1998).
- Williams, G. R. and Brent, G. A. *Thyroid hormone response elements*, Raven Press, New York. (1995).
- Wondisford, F. E., Farr, E. A., Radovick, S., Steinfelder, H. J., Moates, J. M., McClaskey, J. H. and Weintraub, B. D. *Thyroid hormone inhibition of human thyrotropin beta-subunit gene expression is mediated by a cis-acting element located in the first exon. J Biol Chem*, **264**, 14601-14604 (1989).
- Woo, J. S., Imm, J. H., Min, C. K., Kim, K. J., Cha, S. S. and Oh, B. H. *Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. EMBO J*, **25**, 1353-1363 (2006).
- Wrutniak, C., Cassar-Malek, I., Marchal, S., Rascle, A., Heusser, S., Keller, J. M., Fléchon, J., Daa, M., Samarut, J., Ghysdael, J. and Cabello, J. *A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. J Biol Chem*, **270**, 16347-16354 (1995).
- Wu, Y., Sun, X., Kaczmarek, E., Dwyer, K. M., Bianchi, E., Usheva, A. and Robson, S. C. *RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. Biochem J*, **396**, 23-30 (2006).
- Xie, J., Sun, M., Guo, L., Liu, W., Jiang, J., Chen, X., Zhou, L. and Gu, J. *Human Dectin-1 isoform E is a cytoplasmic protein and interacts with RanBPM. Biochem Biophys Res Commun*, **347**, 1067-1073 (2006).

- Xu, J. and Li, Q. *Review of the in Vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. Molecular Endocrinology*, **17**, 1681-1692 (2003).
- Xu, J., Qui, Y., DeMayo, F. J., Tsai, M.-J. and O'Malley, B. W. *Partial hormone resistance in mice disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. Science*, **279**, 1922-1925 (1998).
- Yamada, M., Saga, Y., Shibusawa, N., Hirato, J., Murakami, M., Iwasaki, T., Hashimoto, K., Satoh, T., Wakabayashi, K., Taketo, M. M. and Mori, M. *Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 10862-10867 (1997).
- Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. and Nakatani, Y. *A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. Nature*, **382**, 319-324 (1996).
- Yang, Y. Z., Burgos-Trinidad, M., Wu, Y. and Koenig, R. J. *Thyroid hormone receptor variant alpha2. Role of the ninth heptad in dna binding, heterodimerization with retinoid X receptors, and dominant negative activity. J Biol Chem*, **271**, 28235-28242 (1996).
- Yang, Z., Hong, S. H. and Privalsky, M. L. *Transcriptional anti-repression. Thyroid hormone receptor beta-2 recruits SMRT corepressor but interferes with subsequent assembly of a functional corepressor complex. J Biol Chem*, **274**, 37131-37138 (1999).
- Yao, L., Janmey, P., Frigeri, L. G., Han, W., Fujita, J., Kawakami, Y., Apgar, J. R. and Kawakami, T. *Pleckstrin homology domains interact with filamentous actin. J Biol Chem*, **274**, 19752-19761 (1999).
- Yao, L., Kawakami, Y. and Kawakami, T. *The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 9175-9179 (1994).
- Yen, P. M. *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev*, **81**, 1097-1142 (2001).
- Yen, P. M., Darling, D. S., Carter, R. L., Forgione, M., Umeda, P. K. and Chin, W. W. *Triiodothyronine (T3) decreases binding to DNA by T3-receptor homodimers but not receptor-auxiliary protein heterodimers. J Biol Chem*, **267**, 3565-3568 (1992).
- Yen, P. M., Feng, X., Flamant, F., Chen, Y., Walker, R. L., Weiss, R. E., Chassande, O., Samarut, J., Refetoff, S. and Meltzer, P. S. *Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. EMBO Rep*, **4**, 581-587 (2003).

- Yen, P. M., Ikeda, M., Wilcox, E. C., Brubaker, J. H., Spanjaard, R. A., Sugawara, A. and Chin, W. W. *Half-site arrangement of hybrid glucocorticoid and thyroid hormone response elements specifies thyroid hormone receptor complex binding to DNA and transcriptional activity. J Biol Chem*, **269**, 12704-12709 (1994).
- Yokomori, N., Tawata, M., Saito, T., Shimura, H. and Onaya, T. *Regulation of the rat thyrotropin receptor gene by the methylation-sensitive transcription factor GA-binding protein. Mol Endocrinol*, **8**, 1241-1249 (1998).
- Yoon, H. G., Chan, D. W., Huang, Z. Q., Li, J., Fondell, J. D., Qin, J. and Wong, J. *Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. EMBO J*, **22**, 1336-1346 (2003).
- Yuan, Y., Fu, C., Chen, H., Wang, X., Deng, W. and Huang, B. R. *The Ran binding protein RanBPM interacts with TrkA receptor. Neurosci Lett*, **407**, 26-31 (2006).
- Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R. M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. and Lazar, M. A. *Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 14400-14405 (1997).
- Zamir, I., Harding, H. P., Atkins, G. B., Horlein, A., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. and Lazar, M. A. *A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. Mol Cell Biol*, **10**, 5458-5465 (1996).
- Zawel, L., Lu, H., Cisek, L. J., Corden, J. L. and Reinberg, D. *The cycling of RNA polymerase II during transcription. Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 187-198 (1993).
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P. and Gronemeyer, H. *The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. EMBO Journal*, **13**, 1425-33. (1994).
- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B. T. and Roeder, R. G. *The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. Mol Cell*, **3**, 611-623 (2002).
- Zhang, X., Jeyakumar, M. and Bagchi, M. K. *Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptors. Evidence for common transcriptional coactivator(s). J Biol Chem*, **271**, 14825-14833 (1996).
- Zhang, X. K., Hoffmann, B., Tran, P. B., Graupner, G. and Pfahl, M. *Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. Nature*, **355**, 441-446 (1992).

- Zhao, H. H., Herrera, R. E., Coronado-Heinsohn, E., Yang, M. C., Ludes-Meyers, J. H., Seybold-Tilson, K. J., Nawaz, Z., Yee, D., Barr, F. G., Diab, S. G., Brown, P. H., Fuqua, S. A. and Osborne, C. K. *Forkhead homologue in rhabdomyosarcoma functions as a bifunctional nuclear receptor-interacting protein with both coactivator and corepressor functions. J Biol Chem*, **276**, 27907-27912 (2001).
- Zhao, Q., Chasse, S. A., Devarakonda, S., Sierk, M. L., Ahvazi, B. and Rastinejad, F. *Structural basis of RXR-DNA interactions. J Mol Biol*, **296**, 509-520 (2000).
- Zhu, X. G., Hanover, J. A., Hager, G. L. and Cheng, S. Y. *Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. J Biol Chem*, **273**, 27058-27063 (1998).
- Zou, Y., Lim, S., Lee, K., Deng, X. and Friedman, E. *Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M. J Biol Chem*, **276**, 49573-49581 (2003)