

50376  
1994  
285

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

50376  
1994  
285

N° d'ordre: 1395

THESE

présentée pour l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

par

**Nathalie DALLERY**

**PURIFICATION ET CARACTERISATION FONCTIONNELLE  
DU DOMAINE DE FIXATION AU LIGAND  
DU RECEPTEUR  $\alpha$  DE L'ACIDE RETINOÏQUE**

**Mise en évidence de l'implication de cystéines  
dans l'interaction ligand-récepteur**

Soutenue le 3 novembre 1994 devant la Commission d'Examen:

Président :           Professeur A. VERBERT  
Rapporteurs :       Professeur J. CHAMBAZ  
                          Docteur M. PONS  
Examineurs :       Professeur P. FORMSTECHE  
                          Professeur B. SABLONNIERE



30 706 5

Je tiens à remercier :

- Monsieur le Professeur A. Verbert d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

- Monsieur le Professeur Chambaz et Monsieur le Docteur Pons d'avoir accepté de juger mon travail.

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites.

Je remercie Monsieur le Professeur M. Dautrevaux de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Monsieur le Professeur P. Formstecher,

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour avoir suivi avec intérêt ce travail. Malgré vos nombreuses fonctions, vous restez disponible et attentif à la réussite et à l'épanouissement des membres de votre équipe. Votre enthousiasme et votre opiniâtreté ont été de bons remèdes au doute et au découragement qui menacent une apprentie chercheuse confrontée à une protéine rebelle. Merci encore pour votre soutien et vos encouragements.

Monsieur le Professeur B. Sablonnière,

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir guidé mes premiers pas dans la recherche et m'avoir appris petit à petit à acquérir de l'autonomie dans mon travail.

Les spectres de masse ont été réalisés dans le laboratoire d'application de spectrométrie de masse de la Faculté de Médecine de Lille, dirigé par le Docteur G. Briand. Je remercie les Docteurs Briand et Kouach de m'avoir toujours accueillie dans leur laboratoire avec beaucoup de sympathie.

Ce travail a été réalisé avec l'aide du Docteur D. Belaïche que je remercie vivement pour son soutien et sa disponibilité.

Cette thèse est une étape importante de quatre années passées au sein d'une équipe qui a contribué à mon épanouissement professionnel et personnel, et avec laquelle il a été très agréable de travailler (parfois) et de discuter (souvent). Merci à tous pour votre aide et vos encouragements, en particulier à Claude et Pierre-Marie pour avoir contribué à l'approfondissement de mes connaissances en biochimie culinaire.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur B. SABLONNIERE, au Laboratoire de Biochimie Structurale de la Faculté de Médecine de Lille dirigé par le Professeur P. FORMSTECHEP.

Il a fait l'objet des publications (1-2) et communications par affiches (3-6) suivantes :

1) "Purification and functional characterization of the ligand-binding domain from the retinoic acid receptor  $\alpha$  : evidence that sulfhydryl groups are involved in ligand-receptor interaction".

Dallery, N., Sablonnière, B., Grillier, I., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1993). *Biochemistry* **32** : 12428-12436.

2) "Physicochemical parameters affecting the charcoal adsorption assay for quantitative retinoid-binding measurement".

Sablonnière, B., Dallery, N., Grillier, I., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1994). *Anal. Biochem.* **217** : 110-118.

3) "Expression du domaine de liaison au ligand du récepteur  $\alpha$  de l'acide rétinoïque dans *Escherichia coli*".

Dallery, N., Sablonnière, B., Formstecher, P., et Dautrevaux, M.  
5èmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie. LILLE - Octobre 1991.

4) "Expression, purification et étude fonctionnelle du domaine de liaison au ligand du récepteur  $\alpha$  de l'acide rétinoïque dans *E. coli*".

Dallery, N., Sablonnière, B., Formstecher, P., et Dautrevaux, M.  
12ème Forum de Cancérologie. PARIS - Juin 1992.

5) "Inactivation de la liaison au ligand du récepteur de l'acide rétinoïque (RAR $\alpha$ ) par des réactifs spécifiques des thiols".

Dallery, N., Sablonnière, B., Formstecher, P., et Dautrevaux, M.  
Forum des jeunes chercheurs. CAEN - Juillet 1992.

6) "Expression, purification and characterization of the ligand-binding domain from the retinoic acid receptor  $\alpha$  in *E. coli* : ligand-binding sensitivity to sulfhydryl group modifying agents".

Dallery, N., Sablonnière, B., Formstecher, P., and Dautrevaux, M.  
Faseb Summer Research Conferences on Retinoids. Saxtons River USA - June 1992.

**ABREVIATIONS UTILISEES :**

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AR :	Androgen Receptor
ARE :	Androgen Responsive Element
ARN :	Acide RiboNucléique
BrCN :	Bromure de Cyanogène
CLPH :	Chromatographie Liquide Haute Performance
CRABP :	Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CRBP :	Cellular Retinol Binding Protein
DMF :	DiMéthyl Formamide
DMSO :	DiMéthyl Sulfoxyde
DTNB :	5,5'-DiThio-bis-NitroBenzoate
DTT :	DiThioThréitol
ER :	Estrogen Receptor
ERE :	Estrogen Responsive Element
GR :	Glucocorticoid Receptor
GRE :	Glucocorticoid Responsive Element
GST :	Glutathion-S-Transférase
HRE :	Hormone Responsive Element
hsp :	heat shock protein
MMTS :	Méthyl Méthane Thio Sulfonate
MR :	Mineralocorticoid Receptor
MRE :	Mineralocorticoid Responsive Element
PR :	Progesterone Receptor
RAR :	Retinoic Acid Receptor
RARE :	Retinoic Acid Responsive Element
RBP :	Retinol Binding Protein
RGHT :	Résistance Généralisée aux Hormones Thyroïdiennes
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RXR :	Retinoid X Receptor
RXRE :	Retinoid X Responsive Element
SLN :	Signal de Localisation Nucléaire
SM :	Spectrométrie de Masse
TAF :	Transcription Activation Function
TFA :	acide TriFluoroAcétique
TR :	Thyroid Hormone Receptor
TRE :	Thyroid Responsive Element
u.m.a. :	unité de masse atomique
VDR :	Vitamin D Receptor
VDRE :	Vitamin D Responsive Element

**SOMMAIRE:**

	Page
Introduction	8
Revue générale	9
Chapitre 1: Les rétinoïdes et leurs récepteurs	10
A) Les rétinoïdes	11
1) Les rétinoïdes naturels	11
2) Les rétinoïdes de synthèse	13
3) Les effets biologiques de l'acide rétinoïque tout-trans	15
B) Mécanisme moléculaire d'action des acides rétinoïques	16
1) Les CRABP	18
2) Les récepteurs de l'acide rétinoïque, RAR et RXR	19
a) Généralités sur les récepteurs nucléaires	19
b) Les différents RAR et RXR	21
$\alpha$ ) Les RAR	21
$\beta$ ) Les RXR	23
c) Expression tissulaire des RAR et RXR	26
$\alpha$ ) Expression des RAR	26
$\beta$ ) Expression des RXR	28
C) Organisation fonctionnelle des RAR et RXR	28
1) La translocation nucléaire	28
2) La liaison à l'ADN	29
a) Le domaine C	29
b) Les éléments de réponse	31
$\alpha$ ) Les RARE	32
$\beta$ ) Les RXRE	34
c) Spécificité des éléments de réponse	36
3) La dimérisation	36
4) La transactivation	41
Chapitre 2: Le domaine de fixation au ligand des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens	44
Introduction	45
A) Relation structure-affinité des ligands de synthèse	48
B) Etude de la protéine	51
1) Les réactifs spécifiques d'acides aminés	51
a) Les cystéines	53

α) Le récepteur des glucocorticoïdes	53
β) Les autres récepteurs	55
b) Les autres acides aminés	55
c) Différence agoniste/antagoniste	55
2) Le marquage d'affinité	56
a) Les stéroïdes marqueurs d'affinité	56
b) Le rendement de marquage	58
c) Les résultats	58
α) Détermination de la masse moléculaire	58
β) Etude de formes apparentées et de modifications post-traductionnelles	60
γ) Localisation du marquage et identification de l'acide aminé modifié	61
d) Le marquage d'affinité des RAR	62
3) La mutagenèse dirigée	62
a) Délimitation du domaine E	64
b) Détermination d'acides aminés essentiels à la liaison du ligand	65
c) Détermination des régions indispensables à l'activation transcriptionnelle	66
d) Discrimination agoniste/antagoniste	67
e) La mutagenèse dirigée des RAR et RXR	68
4) Les récepteurs déficients	69
a) Perte plus ou moins complète de l'activité de liaison	70
α) Activité transcriptionnelle nulle	70
β) Activité transcriptionnelle réduite	71
γ) Activité transcriptionnelle constitutive	72
δ) Activité inhibitrice dominante	74
b) Effet des mutations sur la spécificité	77
c) Effets des mutations sur l'activité des antagonistes	77
d) Les RAR mutants	78
Conclusion	78
5) Les études physico-chimiques	83
a) La structure tridimensionnelle du site de liaison des récepteurs nucléaires	83
b) La structure tridimensionnelle du site de liaison des protéines de liaison	84
6) Changement conformationnel induit par le ligand	88

Résultats et discussion	91
Introduction	92
Chapitre 3: Expression, purification et caractérisation du domaine E de RAR $\alpha$	93
A) Introduction	94
1) Les données disponibles au début de notre travail	94
a) <i>Escherichia coli</i>	94
b) Levures	96
c) Cellules CHO	96
4) Cellules d'insectes	96
2) Notre choix	98
B) Résultats	99
C) Discussion	110
Chapitre 4: Caractérisation d'acides aminés impliqués dans la liaison RAR $\alpha$ -ligand	113
A) Introduction	114
B) Résultats et discussion	114
1) Les cystéines	114
a) Principe de notre démarche	116
b) Résultats de la spectrométrie de masse	116
2) Les arginines	132
Chapitre 5: Optimisation de la détermination des paramètres de liaison ligand-récepteur	137
A) Introduction	138
B) Résultats	138
C) Discussion	148
Conclusion et Perspectives	150
Appendice technique	153
Liste des illustrations	157
Bibliographie	160

L'acide rétinoïque tout-trans est un des dérivés actifs de la vitamine A et joue un rôle important de contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaires. Il est également impliqué dans la morphogenèse. Comme il est proposé pour la chimioprévention et le traitement de certains cancers, il suscite un très grand intérêt.

Le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque met en jeu des récepteurs nucléaires (les RAR) appartenant à la superfamille des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens. Ces facteurs de transcription ligand-dépendants présentent une organisation en domaines, dont les domaines C de liaison à l'ADN, et E, de fixation au ligand.

Alors que le domaine C est très bien connu, peu de données concernant le domaine E des RAR sont disponibles à ce jour. L'étude de cette région est pourtant indispensable à la conception de nouveaux rétinoïdes spécifiques, agonistes ou antagonistes. Nos travaux ont porté sur la caractérisation biochimique du domaine E de RAR $\alpha$  et l'étude de l'implication de certains groupes d'acides aminés dans l'interaction récepteur-ligand.

Etant donné le très faible taux d'expression naturelle des RAR, et la coexistence intracellulaire de plusieurs formes de RAR, notre travail a nécessité l'utilisation d'un système d'expression de protéines recombinantes. Nous avons donc exprimé le domaine de fixation au ligand de RAR $\alpha$  dans *Escherichia coli* et procédé à la mise au point de la purification et à la caractérisation biochimique de la protéine recombinante. L'étude du rôle de certains acides aminés dans l'interaction récepteur-ligand a été abordée par les méthodes classiques de biochimie, ensuite associées à une technique plus récente : la spectrométrie de masse en mode électrospray.

L'interaction d'un ligand avec son récepteur est indispensable à la transmission du message qu'il porte. C'est pourquoi, dans notre revue de la littérature, après avoir décrit le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque et de certains rétinoïdes, nous avons voulu exposer les connaissances actuelles sur le domaine de fixation au ligand des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens qui partagent de nombreuses analogies avec les récepteurs de l'acide rétinoïque.



## **REVUE GENERALE**

CHAPITRE 1:

*LES RETINOÏDES ET LEURS  
RECEPTEURS.*

## A) LES RETINOÏDES :

### 1) *Les rétinoïdes naturels :*

Les rétinoïdes naturels sont des dérivés de la vitamine A. Cette substance, encore appelée rétinol, est responsable de nombreux effets biologiques. Elle intervient, elle-même ou par l'intermédiaire de ses dérivés, dans la croissance, la reproduction et la vision. Le rétinol tout-trans est métabolisé *via* une série de réactions d'oxydation et d'isomérisation en plusieurs dérivés actifs, dont le rétinaldéhyde impliqué dans le processus de la vision.

Trois au moins des dérivés rétinoïdes présentés dans la figure 1 sont actifs sur les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque, RAR et RXR : l'acide rétinoïque tout-trans, l'acide 9-cis rétinoïque et l'acide 3,4-didéhydrorétinoïque.

Les acides rétinoïques peuvent agir de façon paracrine ou autocrine, en passant directement de la circulation sanguine à l'intérieur de la cellule ou en étant synthétisés à partir du rétinol ou du rétinal dans la cellule cible. L'activation métabolique du rétinol est un processus impliquant deux enzymes : une alcool et une aldéhyde déshydrogénases. Le premier de ces enzymes est régulé de façon négative par l'acide rétinoïque tout-trans (Mangelsdorf *et al.*, 1994).

La synthèse de l'acide 9-cis rétinoïque, dérivé actif caractérisé très récemment, n'est pas encore élucidée. Une isomérisation intracellulaire de l'acide rétinoïque tout-trans, probablement dépendante d'un système enzymatique, est le plus souvent proposée (Levin *et al.*, 1992 ; Heyman *et al.*, 1992). Urbach et Rando (1994) montrent que les microsomes de foie de boeuf sont capables de transformer l'acide rétinoïque tout-trans, et non pas le rétinol ou le rétinal, en acide 9-cis rétinoïque.

L'acide 3,4-didéhydrorétinoïque peut dériver du rétinol par déshydrogénation en 3,4-didéhydrorétinol suivie de réactions d'oxydation similaires à celles impliquées dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque tout-trans (Thaller et Eichele, 1990).

Parmi ces dérivés, l'acide rétinoïque tout-trans présente des effets pléiotropiques ; il se montre capable de réguler la morphogenèse, la croissance ainsi que la différenciation cellulaires (De Luca, 1991). L'acide 3,4-didéhydrorétinoïque semble également jouer un rôle important dans le contrôle du développement des vertébrés (Thaller et Eichele, 1990). Le rôle de l'isomère 9-cis n'est pas encore précisé, il interviendrait dans le contrôle de nombreuses voies métaboliques et également dans la morphogenèse (Kraft *et al.*, 1994, Mangelsdorf *et al.*, 1994).

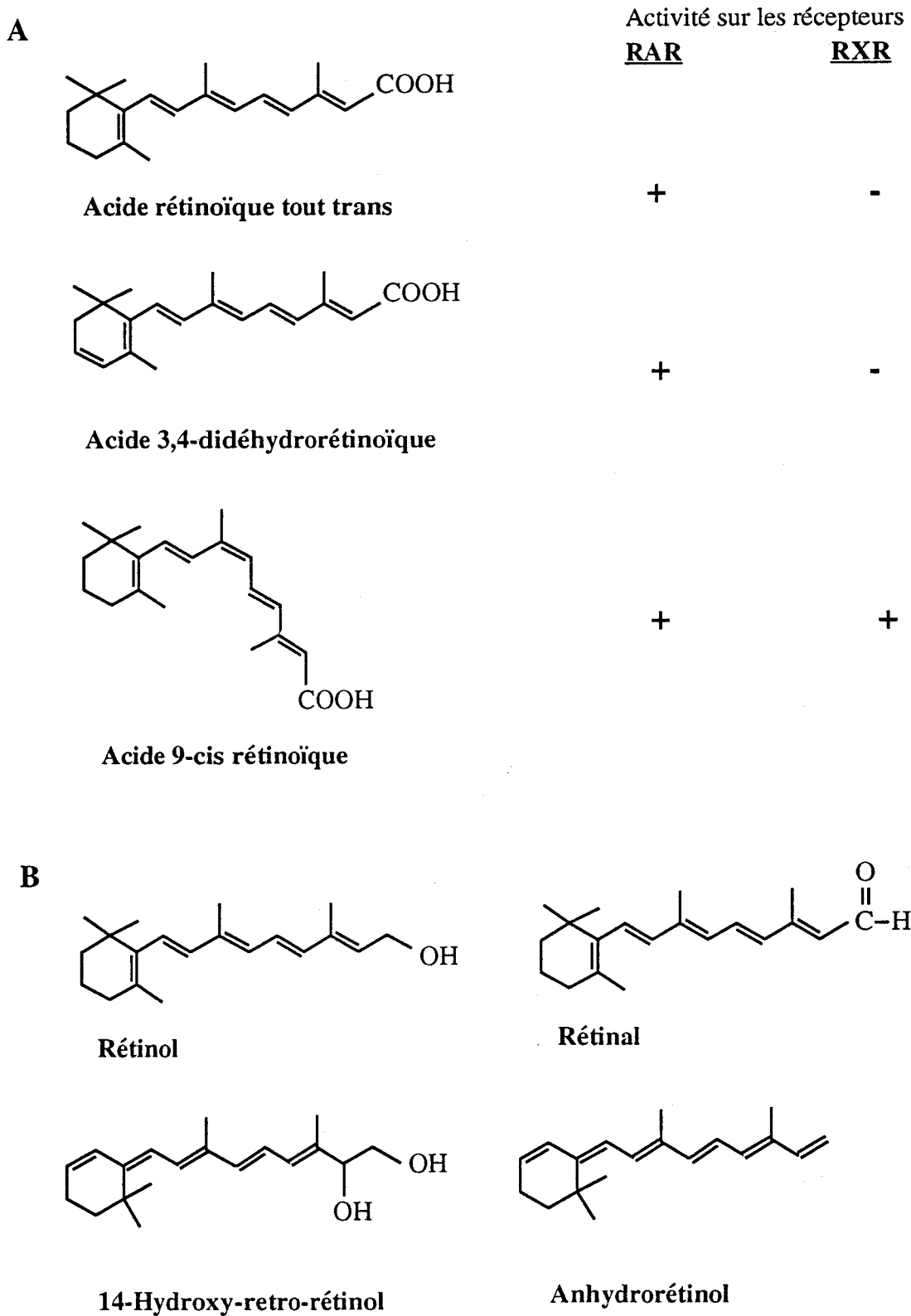


Fig. 1: Rétinoïdes naturels actifs (A) ou non (B) sur RAR et RXR.

## 2) Les rétinoïdes de synthèse :

L'utilisation de l'acide rétinoïque dans le traitement de certaines affections cutanées (formes sévères de l'acné et du psoriasis) et des affections cancéreuses, tant dans le domaine de la chimiothérapie (traitement de la leucémie à promyélocytes, (Chomienne *et al.*, 1989) que de la chimioprévention, explique les efforts considérables de développement de nouvelles molécules à activité rétinoïde.

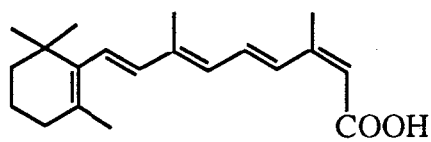
Les rétinoïdes de synthèse actuels présentent des motifs structuraux très éloignés de l'acide rétinoïque (Fig.2) et le terme "rétinoïde" définit en fait toute substance capable d'induire une réponse spécifique *via* sa liaison au récepteur de l'acide rétinoïque (Sporn et Roberts, 1985). Les recherches visent à développer des molécules plus actives et surtout moins toxiques que l'acide rétinoïque, substance fortement tératogène. Les composés synthétisés et parfois utilisés en thérapeutique définissent trois générations de dérivés.

- *Les rétinoïdes de première génération* proviennent de la modification de l'extrémité polaire de la chaîne latérale polyénique de l'acide rétinoïque. Les nombreux rétinoïdes synthétisés se distinguent par la nature de leur groupement fonctionnel (alcools, aldéhydes, acides, esters, amides, amines et éthers), par la longueur de la chaîne latérale, ainsi que par la position et le nombre de doubles liaisons et de substituants méthyles. Ces études ont abouti à l'utilisation thérapeutique de l'acide 13-cis rétinoïque (ou isotrétinoïne) pour le traitement de l'acné. Cette substance est moins active que l'isomère tout-trans mais aussi moins toxique ; elle est inefficace dans le traitement des leucémies promyélocytaires (Chomienne *et al.*, 1989).

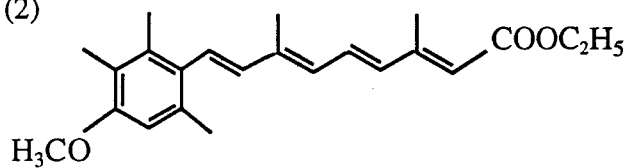
- *Les rétinoïdes de deuxième génération* résultent de la modification de l'extrémité cyclique de la vitamine A par divers cycles ou hétérocycles, substitués ou non. Les dérivés les plus intéressants comportent un cycle aromatique porteur de groupements méthyles, méthoxy ou d'halogènes. A ce groupe appartient l'étrétinate, ester éthylique de l'analogue para-méthoxy-triméthylphényl de l'acide rétinoïque, utilisé dans le traitement du psoriasis et des dermatoses kératinisantes.

- *Les rétinoïdes de troisième génération* continuent à être développés et regroupent les dérivés présentant différentes formes de cyclisation englobant tout ou partie de la chaîne polyénique. La série des arétinoïdes, dont le chef de file est l'acide tétrahydrotétraméthyl-naphtalénylpropénylbenzoïque (TTNPB), s'est révélée très active (Loeliger *et al.*, 1980). L'ester éthylique du TTNPB présente, dans la

(1)

**Acide 13-cis rétinolique (Isotrétinoïne)**

(2)

**Etrétinate**

(3)

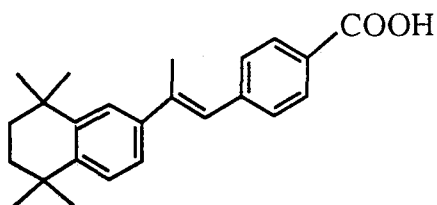
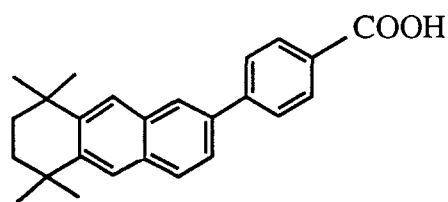
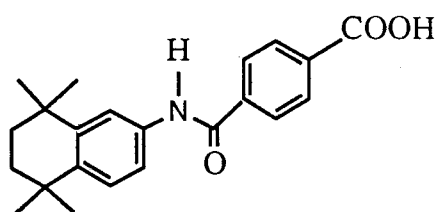
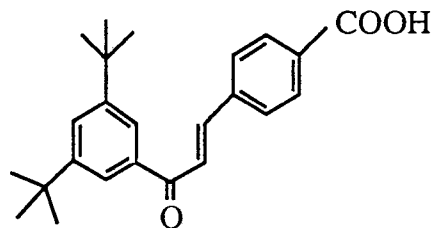
**TTNPB****CD367****Am80****Ch55**

Fig. 2: Rétinoïdes de synthèse de première (1), deuxième (2) et troisième (3) générations.

plupart des réponses testées, une activité beaucoup plus importante que l'acide rétinoïque. Sa toxicité considérable explique qu'il ne soit pas utilisé en thérapeutique (Dawson *et al.*, 1989).

Dans cette série, un noyau aromatique peut être placé à l'extrémité polaire de la molécule pour donner des composés très actifs, à condition que le carboxyle soit disposé en para de la chaîne isoprénique (Dawson *et al.*, 1983). Le connecteur reliant l'extrémité cyclique apolaire au noyau aromatique peut varier légèrement en longueur, et peut même être cyclisé presque entièrement (CD367). La nature et la géométrie de ce connecteur influencent l'activité de la molécule (Dawson *et al.*, 1983, 1989). Dans cette famille, l'acide tétrahydrotétraméthylanthracényl benzoïque, ou CD367, a été développé comme ligand tritié des récepteurs rétinoïques par le groupe de Shroot (Cavey *et al.*, 1990).

Les acides rétinoïques, développés par le groupe de Shudo, forment une classe importante des arétinoïdes (Kagechika *et al.*, 1988, 1989a, b et c ; Yamakawa *et al.*, 1990). Les composés les plus actifs sont ceux qui présentent une structure de type amide (Am80) ou chalcone (Ch55). Ces deux dérivés sont utilisés sous forme tritiée pour caractériser les récepteurs de l'acide rétinoïque (Hashimoto *et al.*, 1989).

### 3) *Les effets biologiques de l'acide rétinoïque tout-trans :*

Les effets biologiques de l'acide rétinoïque sont multiples. Il joue un rôle important de contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaires. Il est un agent freinant et prévenant l'expression tumorale. Il est également clairement impliqué dans le contrôle de la morphogénèse, mais son rôle de morphogène est contesté (Slack, 1987 ; Brockes, 1991).

L'acide rétinoïque intervient dans la régulation de plusieurs systèmes enzymatiques tels que l'ornithine décarboxylase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase, l'alcool déshydrogénase, les transglutaminases ou les protéines kinases (Mangelsdorf *et al.*, 1994).

Ce composé module l'action de certains facteurs de croissance et de leurs récepteurs membranaires. Il augmente la sécrétion du TGF- $\beta$  ("Transforming Growth Factor") dans de nombreuses lignées cellulaires et peut également réguler l'expression de son récepteur. L'expression de l'EGF ("Epidermal Growth Factor") et de son récepteur est aussi modifiée par l'administration d'acide rétinoïque.

Les rétinoïdes sont des immunomodulateurs. La sécrétion de nombreuses cytokines, dont les interleukines IL-1, -2, -3 et -6 et l'interféron  $\gamma$  est régulée par ces dérivés. Il en est de même pour les récepteurs de IL-2, IL-6 et TNF- $\alpha$  ("Tumor Necrosis Factor") (Mangelsdorf *et al.*, 1994).

Nous verrons que l'acide rétinoïque influence l'expression des gènes de ses récepteurs nucléaires (RAR) (Leroy *et al.*, 1991b ; Riaz-ul-haq *et al.*, 1991, Kamei *et al.*, 1993), ainsi que celle des gènes des protéines cytoplasmiques de liaison de l'acide rétinoïque et du rétinol, les CRABP ("Cellular Retinoic Acid Binding Protein") et CRBPI ("Cellular Retinol Binding Protein I") (Wei *et al.*, 1989).

La différenciation embryonnaire, la morphogénèse, l'organogénèse et la migration cellulaire sont des processus dépendant de l'expression de protéines spécifiques de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. L'acide rétinoïque contrôle la synthèse et la distribution de nombreuses protéines de structure telles que la laminine B1, le collagène de type IV, la kératine, la fibronectine. Les gènes de la collagénase et de la stromélysine, qui participent à la dégradation de la matrice extracellulaire, sont régulés de façon négative par l'acide rétinoïque (Plet *et al.*, 1988, Parker et Sherbet, 1992).

## **B) MECANISME MOLECULAIRE D'ACTION DES ACIDES RETINOÏQUES :**

Les effets biologiques des acides 9-cis et tout-trans rétinoïques sont principalement liés à la régulation transcriptionnelle de gènes cibles spécifiques. Une fois l'isomère approprié synthétisé, il doit aller au noyau où il va interagir avec un récepteur nucléaire. Il existe des protéines cytoplasmiques de liaison des rétinoïdes, les CRABPI et II. Quoique le mécanisme de transport ne soit pas démontré, ces protéines ont été proposées pour véhiculer l'acide rétinoïque entre les membranes plasmique et nucléaire. De telles protéines vectrices ne sont pas caractérisées pour les ligands des autres récepteurs nucléaires.

Après liaison du ligand à son récepteur, le complexe formé va réguler la transcription de gènes cibles en se fixant à des séquences spécifiques d'ADN appelées éléments de réponse.

Nous étudierons les différents partenaires repris dans la figure 3 en décrivant leur fonctionnement pour transmettre le message hormonal.



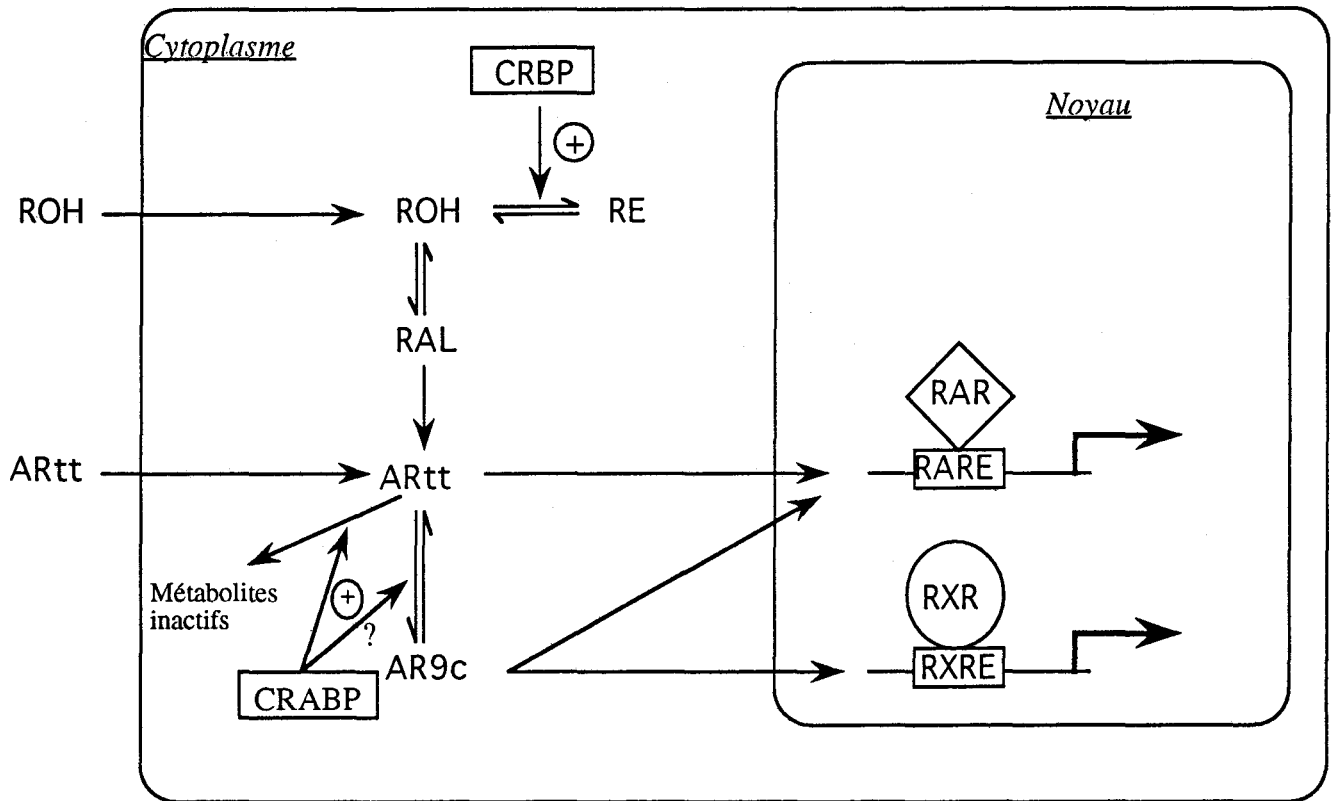


Fig.3: Mécanisme moléculaire d'action des acides 9-cis et tout-trans rétinoliques (d'après Mangelsdorf *et al.*, 1994). ROH: Rétinol; RAH: Rétinal; RE: Rétinyl Esters; AR: Acide Rétinoïque tout-trans (tt) ou 9-cis (9c).

### 1) Les CRABP :

La nature hydrophobe des rétinoïdes limite leur solubilité et donc leur diffusion dans un milieu aqueux. Ces dérivés nécessitent donc l'intervention d'une macromolécule pour faciliter leur transfert de la membrane plasmique à l'intérieur du noyau. Ce rôle de transport est attribué à des protéines cytoplasmiques : les CRABP de type I et II et les CRBP de type I et II. Ces protéines sont de petite taille, environ 135 acides aminés les constituent.

Les CRABP lient l'acide rétinoïque tout-trans avec une bonne affinité mais ne fixent pas l'isomère 9-cis. L'existence de protéines de transport spécifiques de cet isomère reste à déterminer. Les CRBP lient le rétinol tout-trans et le 13-cis rétinol mais pas les isomères 11- ou 9-cis rétinol, ni l'acide rétinoïque (Ong, 1994).

Les distributions tissulaires de ces quatre protéines ne sont pas identiques, ce qui suggère qu'elles possèdent des fonctions différentes. CRBPI est ubiquitaire, alors que l'expression de CRBPII est spécifique des entérocytes de l'intestin grêle. CRABPI est aussi plus largement exprimée que CRABPII, qui est plutôt détectée au niveau de la peau (Ong *et al.*, 1994).

L'une des fonctions de ces protéines serait tout simplement de séquestrer les rétinoïdes sous forme de réserve. Cela permettrait de diminuer le taux de rétinoïdes libres et protégerait ainsi la cellule des propriétés détergentes de ces composés. En même temps, cela éviterait l'oxydation et stabiliserait les rétinoïdes (Ong, 1994).

Ces protéines peuvent donc piéger leur ligand sous forme de réserve rapidement mobilisable et influencer leur métabolisme (Ross, 1993). Ainsi, les CRBP interagiraient avec des enzymes spécifiques et favoriseraient la biosynthèse d'acide rétinoïque. CRABPI est impliquée dans le catabolisme de l'acide rétinoïque en dérivés plus polaires. Comme la concentration intracellulaire de l'acide rétinoïque influence l'activité transcriptionnelle des RAR, il est intéressant de noter que l'expression de CRBPI et CRABPII est induite par l'acide rétinoïque (Ong *et al.*, 1994).

Ces protéines ne semblent cependant pas indispensables à l'activité des rétinoïdes puisque certaines lignées cellulaires répondent parfaitement au traitement par l'acide rétinoïque alors qu'elles sont dépourvues de telles protéines navettes (Libby et Bertram, 1982). D'autre part, certains rétinoïdes sont capables d'induire la différenciation cellulaire alors qu'ils ne présentent aucune affinité pour les protéines de liaison (Jetten *et al.*, 1987 ; Darmon *et al.*, 1988).

## 2) *Les récepteurs de l'acide rétinoïque, RAR et RXR :*

### a) Généralités sur les récepteurs nucléaires :

Au début des années 80, de nombreuses observations permettent de penser, par analogie avec les autres hormones liposolubles, que le contrôle de la transcription par les rétinoïdes est un événement dépendant d'un récepteur nucléaire.

Contrairement aux hormones peptidiques hydrophiles et aux facteurs de croissance, qui se lient à des récepteurs de la membrane externe des cellules, les hormones liposolubles telles que les stéroïdes peuvent traverser la bicouche lipidique membranaire pour ensuite interagir avec des protéines intracellulaires.

Le complexe hormone-récepteur formé provoque une cascade d'événements dont le point culminant est la réponse cellulaire à l'effet hormonal. La liaison de l'hormone au récepteur induit un changement conformationnel de la protéine tel que le complexe devient compétent pour une fixation à des sites spécifiques de la chromatine, appelés éléments de réponse. Le récepteur peut alors moduler la transcription selon un processus non encore clairement établi.

Durant les deux dernières décennies, par une série d'études expérimentales élégantes, plusieurs récepteurs nucléaires ont été biochimiquement identifiés, purifiés, et leur séquence déduite de l'ADN complémentaire. L'analyse structurale comparative de ces protéines a permis d'établir l'existence d'une superfamille de facteurs de transcription ligand-dépendants composée entre autres des récepteurs des hormones stéroïdes (et des ecdystéroïdes chez les invertébrés), des hormones thyroïdiennes (TR) et de la vitamine D (VDR). Les récepteurs des acides 9-cis et tout-trans rétinoïques appartiennent à cette superfamille (Evans, 1988 ; Green et Chambon, 1988).

La comparaison des tout premiers récepteurs clonés a permis de comprendre leur organisation structurale et de mettre en place une terminologie ensuite appliquée à tous les membres de la superfamille (Krust *et al.*, 1986). De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, on note l'existence de six domaines, notés de A à F, présentant des degrés d'homologie divers, le domaine C étant le plus conservé.

L'idée que ces domaines conservés correspondent aux fonctions essentielles des récepteurs nucléaires a pu être confirmée par des expériences de délétion. Celles-ci ont montré que le domaine C est responsable de l'interaction avec l'ADN, tandis que le domaine E fixe l'hormone *via* une hypothétique "poche hydrophobe". Le domaine D est une charnière flexible entre ces deux domaines (Kumar *et al.*, 1987). Comme l'indique la figure 4, certains domaines exercent plusieurs rôles et certaines

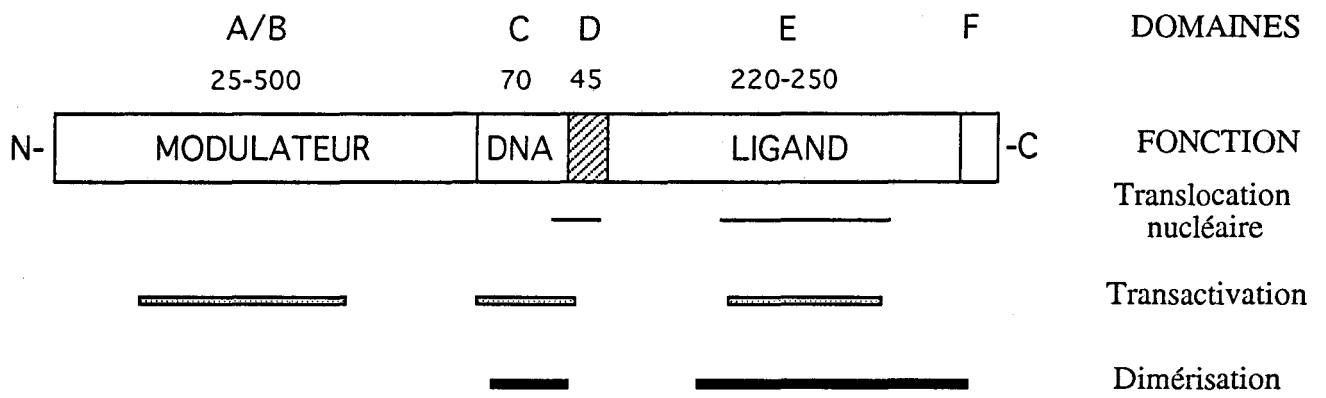


Fig. 4: Structure générale et organisation fonctionnelle des récepteurs nucléaires

fonctions peuvent résulter de l'action de plusieurs sites, éloignés au niveau de la structure primaire mais probablement rapprochés au sein de la structure tertiaire.

Le fait que les récepteurs nucléaires partagent une structure commune suggère un moyen d'isoler de nouveaux membres de cette famille. Les techniques de criblage de banques d'ADN complémentaire par hybridation à faible stringence ont permis de découvrir de nombreux nouveaux récepteurs nucléaires. Plus de 20 nouveaux gènes ont été identifiés chez les vertébrés et invertébrés depuis 1987 ; les récepteurs de l'acide rétinoïque émergent de cette collection (Mangelsdorf *et al.*, 1994).

Après le clonage du gène d'un nouveau récepteur, deux méthodes sont appliquées dans le but de caractériser la spécificité de liaison du ligand et de l'ADN. Ces expériences sont basées sur l'observation que la structure de ces protéines est modulable et qu'un domaine de fonction connue peut être échangé avec un autre de fonction inconnue pour créer un dérivé aux propriétés hybrides prévisibles.

Dans l'une de ces stratégies, le domaine C d'un récepteur "orphelin" (dont le ligand est inconnu) est remplacé par la région correspondante d'un récepteur connu tel que le récepteur des glucocorticoïdes (GR). Le récepteur chimère résultant va stimuler un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) lorsqu'il sera exposé au ligand approprié.

Dans la stratégie réciproque, le criblage des éléments de réponse peut être mené en remplaçant le domaine C de GR par celui du récepteur orphelin. Cette protéine chimère, inductible par les glucocorticoïdes peut être utilisée pour tester l'activité de gènes "reporters" qui contiennent des éléments de réponse candidats (Fig. 5).

Ces deux méthodes ont été exploitées pour la découverte des différents RAR et RXR que nous allons maintenant décrire. Après en avoir précisé la répartition tissulaire, nous pourrions expliquer leur organisation fonctionnelle. Etant donné le caractère commun à l'ensemble des membres de la superfamille de certaines propriétés, nous ferons souvent appel aux observations faites sur d'autres récepteurs nucléaires.

## b) Les différents RAR et RXR :

### $\alpha$ ) *Les RAR :*

En 1987, Petkovich *et al.* et Giguère *et al.*, indépendamment, isolent un ADNc de récepteur humain orphelin. En utilisant la première stratégie décrite auparavant (Fig. 5), ils caractérisent le premier facteur de transcription dépendant de l'acide

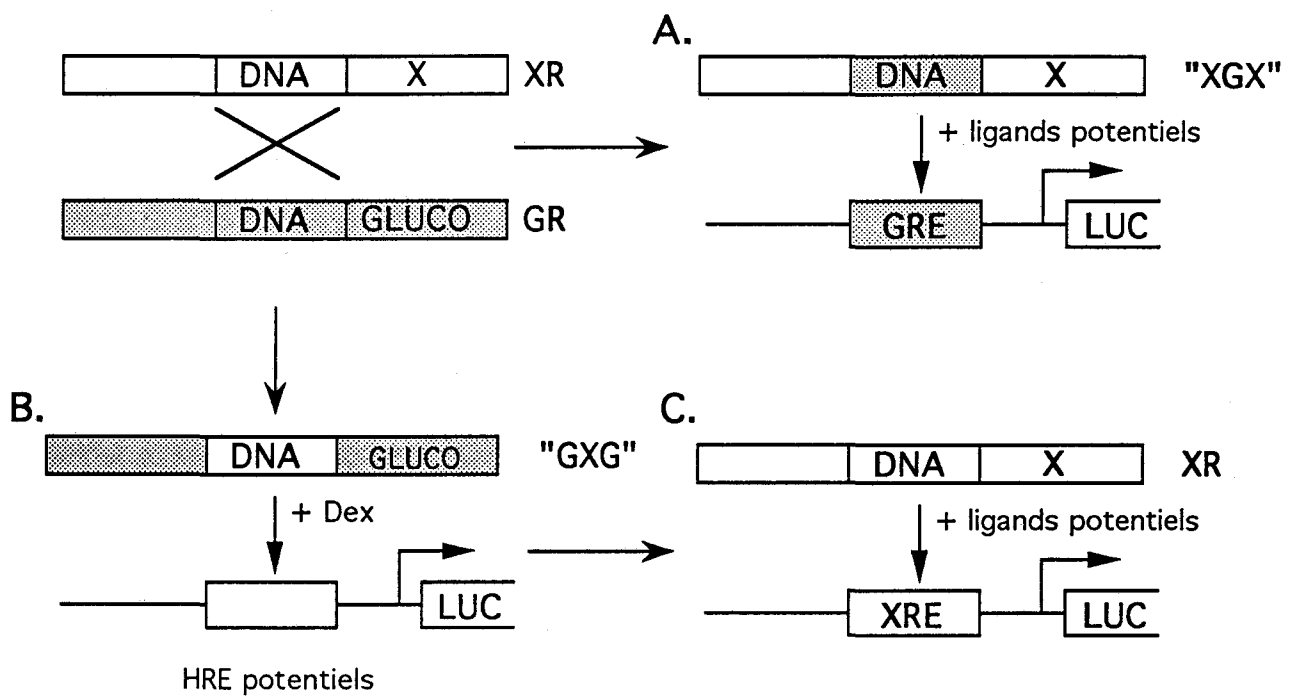


Fig. 5: Stratégies utilisées pour la caractérisation d'un gène nouvellement cloné (d'après Mangelsdorf *et al.*, 1994).

réinoïque tout-trans (RAR $\alpha$ ). Trois types de RAR sont maintenant caractérisés chez l'homme, l'oiseau et les amphibiens : RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  (Tableau 1). Les domaines de liaison au ligand de ces récepteurs sont très conservés et présentent plus de 75 % d'homologie (Fig. 6).

Les profils d'expression différents de chacun des RAR au cours du développement et dans l'organisme adulte suggèrent qu'ils puissent jouer des rôles différents. La diversité de ces protéines est renforcée par l'existence de deux promoteurs pour chaque gène. Les deux transcrits alternatifs génèrent des isoformes différant au niveau de l'extrémité N-terminale qui peuvent être fonctionnellement distincts (Kastner *et al.*, 1990 ; Giguère *et al.*, 1990 ; Blumberg *et al.*, 1992 ; Leroy *et al.*, 1991a ; Zelent *et al.*, 1991). De plus, des variants dérivant d'épissage alternatif peuvent être détectés (Kastner *et al.*, 1990 ; Leroy *et al.*, 1991a ; Zelent *et al.*, 1991 ; Nagpal *et al.*, 1992b). Ainsi, il apparaît que la diversité des effets de l'acide réinoïque peut être en partie expliquée par l'existence de nombreuses isoformes.

#### $\beta$ ) Les RXR :

L'utilisation de la seconde stratégie décrite auparavant (Fig. 5) conduit à la découverte suivante : un nouveau récepteur humain orphelin représente une seconde classe de facteurs de transcription répondant aux réinoïdes, RXR (Mangelsdorf *et al.*, 1990). C'est la démonstration que les RAR, VDR et TR sont associés à des protéines annexes pour augmenter leur affinité pour l'ADN qui est à la base de cette recherche (Burnside *et al.*, 1990 ; Liao *et al.*, 1990).

Les ADNc de trois RXR, appelés RXR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , sont maintenant isolés chez les mammifères, oiseaux et amphibiens (tableau 1). Comme pour la sous-famille RAR, les RXR présentent des degrés d'homologie élevés au niveau des domaines de liaison à l'ADN et au ligand (Fig. 6). Ils sont également codés par des gènes différents localisés en des sites chromosomiques distincts. Le RXR $\beta$  de souris présente deux isoformes dérivant de deux promoteurs différents (Nagata *et al.*, 1994).

RXR $\alpha$  est, à l'origine, identifié par sa capacité à répondre à l'acide réinoïque tout-trans. L'observation initiale que cet isomère est le plus puissant inducteur des RAR et RXR suggère qu'il soit le ligand naturel des deux récepteurs. Cependant, l'incapacité de l'acide réinoïque tout-trans tritié à se lier avec une bonne affinité au RXR a conduit différentes équipes à fournir des efforts intensifs pour caractériser le ligand naturel de ce récepteur. Le résultat de leurs investigations est la découverte de l'acide 9-cis réinoïque, stéréo- et photoisomère de l'acide réinoïque tout-trans (Heyman *et al.*, 1992 ; Levin *et al.*, 1992). L'acide 9-cis réinoïque se lie au RXR

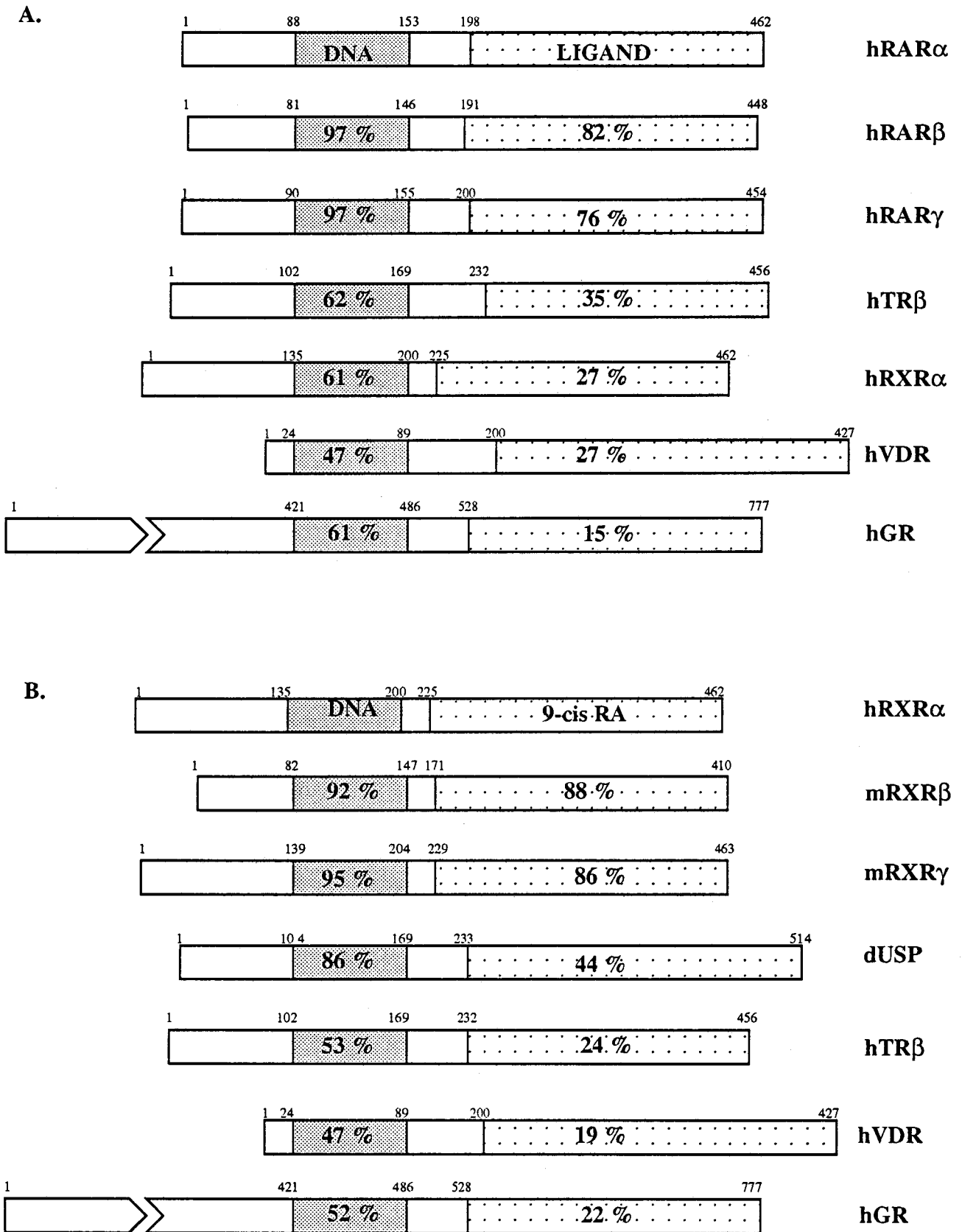


Fig. 6: Homologies de séquence entre les différentes formes de RAR (A) et RXR (B) et d'autres récepteurs nucléaires (d'après Mangelsdorf *et al.*, 1994).



Récepteur	Espèce	Référence
RAR $\alpha$	Homme Souris Triton Grenouille	Giguère <i>et al.</i> , 1987; Petkovich <i>et al.</i> , 1987 Zelent <i>et al.</i> , 1989 Ragsdale <i>et al.</i> , 1989 Blumberg <i>et al.</i> , 1992
RAR $\beta$	Homme Souris Triton Poulet	Brand <i>et al.</i> , 1988; Benbrook <i>et al.</i> , 1988 Zelent <i>et al.</i> , 1989 Giguère <i>et al.</i> , 1989 Smith and Eichele, 1991
RAR $\gamma$	Homme Souris Triton Grenouille	Krust <i>et al.</i> , 1989; Ishikawa <i>et al.</i> , 1990 Zelent <i>et al.</i> , 1989 Ragsdale <i>et al.</i> , 1989 Ellinger-Ziegelbauer and Dreyer, 1991; Blumberg <i>et al.</i> , 1992
RXR $\alpha$	Homme Souris Grenouille	Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1990 Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1992; Leid <i>et al.</i> , 1992b Blumberg <i>et al.</i> , 1992
RXR $\beta$	Homme Rat Souris	Leid <i>et al.</i> , 1992b; Fleischhauer <i>et al.</i> , 1992 Yu <i>et al.</i> , 1991 Hamada <i>et al.</i> , 1989; Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1992; Leid <i>et al.</i> , 1992b
RXR $\gamma$	Homme Souris Grenouille Poulet	ND Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1992; Leid <i>et al.</i> , 1992b Blumberg <i>et al.</i> , 1992 Rowe <i>et al.</i> , 1991

Tableau 1: RAR et RXR caractérisés (d'après Mangelsdorf *et al.*, 1994).

humain avec une grande affinité ( $K_d = 10$  nM) et présente une activité transactivatrice 40 fois plus élevée que l'isomère tout-trans. Il est aussi le ligand naturel des RXR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de souris (Mangelsdorf *et al.*, 1992).

Ce composé, qui est présent dans le foie et les reins à des concentrations élevées, peut également activer les RAR. L'acide 9-cis rétinolique peut servir de ligand commun ou bifonctionnel. L'hypothèse de l'existence d'un ligand plus spécifique des RXR reste posée. Un point surprenant est la faible homologie de séquence des domaines de fixation du ligand des RAR et RXR.

RXR peut interagir avec RAR ou d'autres récepteurs nucléaires comme TR, VDR, le facteur de transcription COUP ("Chicken Ovalbumin Upstream Protein") et le récepteur activé par les agents inducteurs de la prolifération des peroxysomes (PPAR) (Yu *et al.*, 1991 ; Bugge *et al.*, 1992 ; Kliewer *et al.*, 1992a, b et c ; Leid *et al.*, 1992b ; Marks *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 1992a). Il peut également fonctionner indépendamment. En effet, il active la transcription du gène de CRBP II qui n'est pas régulée par les RAR (Mangelsdorf *et al.*, 1991). Les RXR sont donc de nouveaux facteurs de transcription ligand-dépendants et définissent avec l'acide 9-cis rétinolique une seconde voie de contrôle par les rétinoïdes.

### c) Expression tissulaire des RAR et RXR :

Les effets pléiotropiques des rétinoïdes peuvent être en partie expliqués par la répartition très large des RAR et RXR dans l'organisme. Un moyen de préciser le rôle respectif des ligands et des récepteurs est d'examiner leur profil d'expression et leur régulation. Plusieurs études montrent qu'en général les RAR et les RXR sont largement exprimés dans les organismes embryonnaire et adulte.

Ces études suggèrent que RAR et RXR, individuellement ou conjointement, jouent un rôle critique dans divers aspects du développement : de l'implantation de l'embryon à l'organogenèse, dans le développement du membre, la différenciation du système nerveux central, ainsi que dans la physiologie et le métabolisme de l'organisme adulte (Mangelsdorf *et al.*, 1994).

#### $\alpha$ ) Expression des RAR :

Les études de l'expression des RAR par les techniques d'hybridation *in situ* ou de "Northern blot" sont bien avancées et supposent un rôle pour chaque forme de RAR pendant le développement embryonnaire.

Dans l'embryon de souris en développement, RAR $\alpha$  est exprimé ubiquitairement alors que les transcrits RAR  $\beta$  et  $\gamma$  sont restreints de façon spatio-

temporelle. En général, les profils d'expression des formes  $\beta$  et  $\gamma$  s'excluent mutuellement, ce qui suggère qu'elles jouent des rôles distincts lors du développement.

Par exemple, au treizième jour et demi, RAR $\beta$  n'est pas détecté dans les condensations précartilagineuses du membre alors que RAR $\gamma$  y est fortement exprimé (Dollé *et al.*, 1990). Le mésenchyme interdigital, le mésenchyme entourant l'épithélium de l'oreille interne (Dollé *et al.*, 1989), les épithéliums du poumon, de l'intestin et du tractus génital (Dollé *et al.*, 1990) ainsi que le système nerveux en développement (Smith and Eichele, 1991) sont des sites d'expression spécifiques de RAR $\beta$ . L'idée d'un rôle potentiel de RAR $\beta$  dans la neurogenèse est corroborée par la découverte que l'acide rétinoïque tout-trans peut être synthétisé dans le plancher du tube neural en développement (Wagner *et al.*, 1990). Comme RAR $\beta$  est exprimé dans le mésenchyme interdigital au moment de la séparation des doigts, il est proposé que ce récepteur participe à la régulation de la mort cellulaire programmée (Dollé *et al.*, 1989).

Quant à RAR $\gamma$ , son expression est détectée presque exclusivement dans les tissus cutanés et cartilagineux. Au stade embryonnaire ou adulte, RAR $\gamma$  est la forme prédominante présente dans la peau (Kastner *et al.*, 1990).

Le degré élevé d'homologie des différentes isoformes entre les différentes espèces suggère un rôle spécifique pour chacune de ces isoformes. De manière surprenante, des études récentes d'inactivation sélective de gènes de RAR ("knock out") menées sur des souris transgéniques montrent une redondance fonctionnelle des isoformes. Ainsi, le défaut de l'expression de RAR $\alpha$ 1 et RAR $\gamma$ 2 peut être suppléé par les autres isoformes (Li *et al.*, 1993 ; Lohnes *et al.*, 1993). L'inactivation de toutes les isoformes de RAR $\alpha$  entraîne une mortalité postnatale précoce mais, contrairement à ce que l'on pouvait attendre en considérant l'expression ubiquitaire de RAR $\alpha$ , cela ne bloque pas le développement de l'embryon (Lufkin *et al.*, 1993).

L'inactivation du gène de RAR $\gamma$  dans les cellules F9 modifie leur capacité à se différencier normalement après traitement par l'acide rétinoïque. L'expression de plusieurs gènes spécifiques de la différenciation tels que les gènes Hox est en effet altérée (Boylan *et al.*, 1993). L'inactivation de toutes les isoformes de RAR $\gamma$  chez la souris provoque un défaut de croissance, une stérilité chez les mâles et une léthalité précoce (Lohnes *et al.*, 1993).

### β) Expression des RXR :

La répartition des RXR est également très large chez l'embryon et l'adulte (Mangelsdorf *et al.*, 1992). Quoiqu'il n'y ait pas de corrélation absolue entre les expressions des différents types de RAR et RXR, plusieurs données intéressantes émergent de la comparaison de leurs profils d'expression. Par exemple, RXRβ, tout comme RARα, est détecté dans presque tous les tissus.

RXRα est très abondant au niveau du foie, du rein, de la rate (Mangelsdorf *et al.*, 1990, 1992), sites d'expression beaucoup plus faible des trois formes de RAR. Cette observation conduit certains chercheurs à proposer un rôle pour RXR dans le métabolisme des rétinoïdes, idée renforcée par le fait que la régulation du gène de CRBPII est sensible à RXR et non à RAR (Mangelsdorf *et al.*, 1991).

RXRα est également fortement exprimé au niveau de la peau et pourrait être responsable, avec RARγ, des effets dermatologiques des rétinoïdes (Mangelsdorf *et al.*, 1992).

RXRγ semble exprimé de façon plus restreinte. Les sites d'expression majoritaire sont le muscle et le cerveau (Mangelsdorf *et al.*, 1992).

L'inactivation du gène de RXRα entraîne des malformations cardiaques léthales pour l'embryon de souris (Sucov *et al.*, 1994).

## C) ORGANISATION FONCTIONNELLE DES RAR ET RXR :

Les RAR et RXR sont donc des récepteurs nucléaires apparentés aux récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens. Ces récepteurs agissent en se fixant à des sites spécifiques de la chromatine avant d'interagir avec le complexe protéique responsable de la transcription des gènes en ARN messenger.

### 1) La translocation nucléaire :

La translocation des récepteurs des acides 9-cis et tout-trans rétinoïques vers le noyau a lieu sans l'intervention du ligand. Contrairement au récepteur des glucocorticoïdes qui possède deux signaux de localisation nucléaire (SLN), les RAR et les RXR ne possèdent qu'un SLN dont la séquence ressemble aux signaux de localisation nucléaire caractérisés dans d'autres protéines nucléaires, comme l'antigène grand T (Carson-Jurica *et al.*, 1990).

Sur la base de leur homologie de séquence, le domaine D des RAR peut être divisé en trois régions de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale : D1, D2 et D3, avec 93 %, 32 à 50 % et 85 à 90 % d'homologie respectivement entre RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , le SLN est localisé au niveau de la zone D1 (Petkovich, 1992).

## 2) *La liaison à l'ADN :*

L'interaction des récepteurs avec l'ADN met en jeu, au niveau des protéines, une structure en boucles à zinc, localisée dans le domaine C. Au niveau de l'ADN, la spécificité de reconnaissance est déterminée par des séquences oligonucléotidiques particulières, sur lesquelles les récepteurs se fixent sous forme d'homo- ou d'hétérodimères.

### a) Le domaine C :

Le domaine C, directement impliqué dans la fixation à l'ADN, est certainement le mieux connu. Il est le domaine le mieux conservé dans la plupart des espèces pour les différents récepteurs. Vingt acides aminés, sur les 66 à 70 résidus qui le composent, sont invariants.

Ce domaine se caractérise par l'existence de cystéines conservées qui participent à la formation de structures en boucles à zinc. Ces structures sont maintenues en place par l'établissement de liaisons de coordination entre quatre cystéines et un atome de zinc. Elles sont au nombre de deux dans le domaine C des récepteurs nucléaires et diffèrent l'une de l'autre. Alors que la première boucle en N-terminal (C1) possède des acides aminés plutôt hydrophobes, les résidus qui composent la seconde boucle (C2) sont basiques (Green et Chambon, 1988).

Le domaine C est responsable de la spécificité de reconnaissance des gènes cibles régulés par un récepteur donné. Alors que les acides aminés du sommet des boucles à zinc peuvent être mutés sans perte de spécificité, des mutations montrent que l'échange de huit résidus seulement à la base de ces structures permet de convertir un GR en un récepteur capable de se fixer à un TRE ou un ERE. Ces huit acides aminés sont situés dans des zones appelées boîte P (proximale) et boîte D (distale). La boîte P est située en aval de la troisième cystéine dans la région C-terminale de C1. Elle est responsable de la spécificité de reconnaissance de la séquence de l'élément de réponse. Trois des six acides aminés qui la constituent varient entre ER et GR. La boîte D est localisée entre les cinquième et sixième cystéines dans la première articulation de C2 (Fig. 7) (Umesono et Evans, 1989).

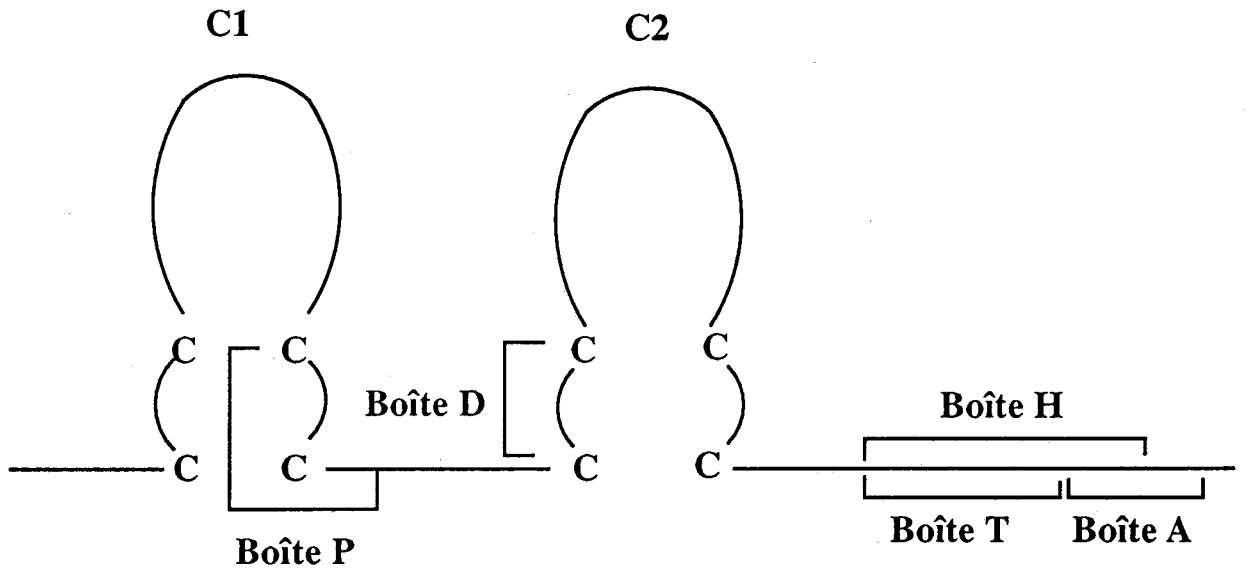


Fig. 7: Localisation des différentes "boîtes" du domaine C.

La boîte D, impliquée dans les phénomènes de dimérisation, est moins conservée que la boîte P. La modification de certains acides aminés dans cette région permet de modifier la spécificité de reconnaissance de l'espace entre les deux demi-éléments de réponse. Des études de cristallographie du récepteur des glucocorticoïdes montrent que la première boucle à zinc, qui se positionne dans le grand sillon de l'hélice d'ADN, adopte une configuration lui permettant d'établir des liaisons spécifiques avec les bases des nucléotides clés de l'élément de réponse et est donc responsable de la sélectivité. La seconde boucle stabilise cette liaison par des interactions spécifiques avec les groupements phosphates de l'hélice d'ADN (Luisi *et al.*, 1991).

Knegtel *et al.* (1993) ont analysé la structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN de RAR $\beta$  en solution par RMN, et rapporté les observations suivantes. Le domaine C peut être séparé en deux modules correspondant aux boucles à zinc. Chaque module est constitué d'une zone de nucléation du zinc et d'une hélice  $\alpha$  amphipatique immédiatement adjacente. Les deux modules s'imbriquent l'un à l'autre pour former un seul domaine globulaire. Les hélices  $\alpha$  de chaque module se disposent perpendiculairement et se stabilisent l'une l'autre par des interactions hydrophobes.

L'analyse de la structure tridimensionnelle du domaine C de RXR $\alpha$  par RMN révèle l'existence d'une troisième hélice  $\alpha$ , située en position C-terminale, jouxtant la seconde hélice (Lee *et al.*, 1993). Cette hélice jouerait un rôle fondamental dans la reconnaissance des séquences cibles d'ADN (Wilson *et al.*, 1992 ; Kurokawa *et al.*, 1993).

#### b) Les éléments de réponse :

Les éléments de réponse sont des séquences nucléotidiques courtes, agissant en cis, indispensables à l'activation hormonale de la transcription. Ces séquences, appelées HRE ("Hormone Responsive Element") fonctionnent indépendamment de leur position ou de leur orientation mais leur activité dépend de la présence de l'hormone. Elles sont généralement localisées en 5' du site d'initiation de la transcription, à une distance plus ou moins grande de celui-ci. Il semble que l'hélice d'ADN se replie pour permettre au complexe hormone-récepteur d'interagir avec le complexe d'initiation de la transcription, soit directement, soit par l'intermédiaire d'autres protéines (Evans, 1988).

En analysant les interactions entre récepteurs et séquences oligonucléotidiques naturelles ou synthétiques, il a été possible de définir des

séquences consensus requises pour la fixation d'un récepteur. Le premier élément de réponse réellement bien caractérisé est le GRE ("Glucocorticoid Response Element"), constitué de 15 paires de bases présentant une structure de palindrome imparfait avec la séquence consensus AG(A/G)ACAnnTGTTCT. Il s'avère que cette séquence est également reconnue par les récepteurs de la progestérone, des minéralocorticoïdes et des androgènes (récepteurs appartenant à la même sous-famille que le GR). Le GRE est donc également un PRE, un MRE et un ARE.

A côté des HRE palindromiques, il existe des HRE constitués de répétitions directes et qui sont en fait le plus souvent rencontrés dans le cas des RARE et RXRE que nous allons voir en détail maintenant.

Les figures 8 et 9 présentent les RARE et RXRE de promoteurs naturels ou synthétiques et les gènes cibles caractérisés. Les RARE et RXRE peuvent être groupés en trois catégories selon l'orientation des demi-séquences consensus AGGTCA :

- répétitions directes,
- palindromes,
- éléments complexes sans séquence consensus évidente.

La meilleure réponse transcriptionnelle est obtenue avec des promoteurs contenant une répétition directe de la demi-séquence consensus séparée de cinq (cas le plus fréquent) ou deux nucléotides pour les RARE et d'un seul nucléotide pour les RXRE.

#### α) Les RARE :

L'un des plus puissants RARE est le motif DR-5 présent dans l'un des promoteurs du gène de RAR $\beta$  (de Thé *et al.*, 1990 ; Sucov *et al.*, 1990). Ce DR-5 existe dans les promoteurs des trois gènes des RAR (Leroy *et al.*, 1991b ; Lehmann *et al.*, 1992b). Le motif DR-2 est moins fréquent et son efficacité est moindre et, au moins pour un promoteur naturel, celui du gène de mCRABP $\text{II}$ , sa sensibilité aux rétinoïdes requiert des facteurs supplémentaires pour une totale activité (Mac Gregor *et al.*, 1992).

Les meilleurs exemples de RARE constitués d'un palindrome sont le TREpal synthétique dérivé du TRE du gène de l'hormone de croissance (Umesono *et al.*, 1988) et une partie du VDRE du promoteur de l'ostéocalcine (Schüle *et al.*, 1990). Ces HRE palindromiques peuvent être stimulés par différents récepteurs hormonaux et en tant que RARE, ils sont moins sensibles à l'acide rétinoïque que le motif en répétition directe. Ils nécessitent la surexpression du RAR.



	<u>Gène</u>	<u>Séquence</u>
DR-5	DR-5	TCAGGTCACCAGGAGGTCAGA
	MHC-R	GGAGGTGAACAGGAGGTCAGC
	DR(+3)	TCAGGTCACTGTCAGGTCACG
	OL-4	CAGGGTCATTTTCAGGTCATT
	mRARβ2	AGGGTTCACCGAAAGTTCACT
	hRARβ2	AGGGTTCACCGAAAGTTCACT
	mRARα2	CGAGTTCAGCAAGAGTTCAGC
	hRARα2	CGAGTTCAGCGAGAGTTCAGC
	hRARγ2	CCGGGTCAGGAGGAGGTGAGC
	mCP-H	GCAGGTCACTGACAGGGCATA
	hADH3	AGGGGTCATTCAGAGTTCAGT
	hGα1	CAAGGGCAGGAGAAGGTCAGA
	hCMV-IEP	TAAGGTCATGTACTGGGCATT
	hMGP	AAGGTTACCTTTTGTTCACC
mHox-1.6	CAGGTTACCGAAAGTTC AAG	
DR-2	DR	TCAGGTCATCAGGTCACG
	mCRBPI	GTAGGTCAAAGGTCAGA
	rCRBPI	GTAGGTCAAAGGTCAGA
	hApoAI	AGGGGTC AAGGGTTCAGT
	mCRABPII-1	CCAGTTCACCAGGTCAGG
palindrome	TREpal	TCAGGTCATGACCTGA
	IR+5	TTAGGTCAACAGTTGACCTAA
	rGH-TRE3	TTAGGT CAGGGACGTGACCTAA
	bGH	GGGGGACATGACCCCA
	hOST	CTAGGTGACTCACC GGG
	xVitA2	TCAGGTCACAGTGACCTGA
Complexe	rGH	AAAGGTAAGATCAGGGACGTGACCCGA
	mLamB1	GAGGTGAGCTAGGTTAA (13) GGGTCAAC
	hOXY	ATTGGTCA (14) GGGTCA (47) GGGTCAAGGTCACC
	hMCAD	ATTGACCTTTCTCTCCGGGTAAAGGTGAAG

Fig. 8: Différents RARE caractérisés (d'après Mangelsdorf *et al.*, 1994)

Enfin, les RARE complexes sont constitués de répétitions multiples de séquences consensus dégénérées orientées au hasard en plusieurs sites du promoteur. Ils se caractérisent en général par une faible affinité et spécificité pour les RAR et nécessitent également la surexpression du récepteur pour être actifs. Un tel RARE est caractérisé dans le promoteur des gènes codant la laminine B1, la phosphoénol pyruvate carboxykinase, une acyl CoA déshydrogénase et l'ocytocine (Vasios *et al.*, 1989 ; Lucas *et al.*, 1991 ; Raisher *et al.*, 1992 ; Richard et Zingg, 1991).

En observant ces trois classes de RARE, il apparaît que l'activité et la spécificité d'un élément de réponse dépendent à la fois de l'orientation des demi-séquences et de l'intervalle qui les sépare. Mais la séquence elle-même influence cette activité. En effet, le RARE du promoteur du gène de RAR $\gamma$  qui est une répétition directe (DR-5) de la séquence AGGTGA répond faiblement à l'acide rétinolique (Lehmann *et al.*, 1992b).

Tous les RARE décrits plus haut ont un effet positif sur la transcription des gènes qu'ils régulent. Il existe également des RARE négatifs, moins bien caractérisés et qui ne présentent pas de motif structural commun. L'acide rétinolique joue alors son effet inhibiteur sur la transcription de ces gènes par interférence avec d'autres facteurs de transcription à activité positive. Dans le cas des gènes de la collagénase et de la stromélysine, le RAR réprime l'activité AP-1 (Schüle *et al.*, 1991 ; Nicholson *et al.*, 1990). La répression du promoteur de CRBP $\text{II}$  est due à une interférence de la fonction de RXR (Mangelsdorf *et al.*, 1991).

#### $\beta$ ) Les RXRE :

Les éléments de réponse des RXR sont beaucoup moins hétérogènes que les RARE. Tous les RXRE sont presque exclusivement de type DR-1 comme celui décrit pour CRBP $\text{II}$  (Mangelsdorf *et al.*, 1991). Le motif DR-1 est également reconnu par d'autres récepteurs. La fixation d'un complexe sur ce motif conduit alors à une régulation positive ou négative de la fonction des RXR.

Le RXRE de CRBP $\text{II}$  est très particulier puisqu'il est activé par RXR mais réprimé par RAR (Mangelsdorf *et al.*, 1991). De façon très intéressante, la plupart des RXRE décrits à ce jour interviennent dans des promoteurs de gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A, des lipides et des acides gras (CRBP $\text{II}$ , Mangelsdorf *et al.*, 1991 ; Apolipoprotéine A1, Rottman *et al.*, 1991 ; Acyl CoA oxydase, Kliewer *et al.*, 1992c).

	<u>Gène</u>	<u>Séquence</u>
DR-1	DR-1	→ → TCAGGTCAGAGGTCAGA
	DR1G	AGGGGTCAGAGGTCACT
	rCRBP11	ACAGGTCACAGGTCACAGGTCACAGTTCATT
	cOVAL	TGGTGTCAAAGGTCAA
	rAOX	CCAGGACAAAGGTCACG
	hApoA1	GCAGGGCAGGGGTCAAGGGTTCAGT
	mCRABP11-2	GAAGGGCAGAGGTCACA
	mMHCI	TGAGGTCAGGGGTGGGG
	rPEPCK	CACGGCCAAAGGTCATG
	hHBV	CGGGGTAAAGGTCAGG
Complexe	TREpal	→ ← TCAGGTCATGACCTGA
	rGH-TRE3	→ ← TTAGGTCAGGGACGTGACCTAA
	hMCAD	→ → → ATTGACCTTCTCTCCGGGTAAAGGTGAAG

Fig. 9: Différents RXRE caractérisés (d'après Mangeldorf *et al.*, 1994)

### c) Spécificité des éléments de réponse :

Comme une même séquence peut être reconnue par différents récepteurs, l'intervalle entre les deux demi-séquences répétées est un critère très important pour la sélectivité. Les groupes d'Evans et de Rosenfeld publient en même temps des études détaillées sur l'effet de l'intervalle entre les deux demi-séquences sur la spécificité de reconnaissance.

En changeant l'espace entre chaque demi-séquence d'une répétition directe d'un TRE, on modifie complètement le comportement de cet élément qui devient selon le cas, un RARE, un VDRE, un TRE, un RXRE. En se basant sur ces résultats, Evans propose ainsi la "règle du 3-4-5" qui permet de prédire l'activité d'une répétition directe de l'élément AGGTCA selon l'espace entre les deux répétitions (Umesono *et al.*, 1991).

Quant à l'équipe de Rosenfeld, elle teste l'effet à la fois de l'intervalle entre les demi-séquences et de leur orientation en palindrome, répétition directe ou palindrome inversé. Elle montre que le TR peut reconnaître des éléments de réponse variés et qu'un TRE peut également répondre à l'acide rétinoïque ou à la vitamine D (Näär *et al.*, 1991).

L'importance de l'espacement des demi-séquences dans la détermination de la spécificité des HRE est bien illustrée par le nombre important de gènes cibles régulés par des HRE qui suivent la règle 1-2-3-4-5 (Fig. 10).

Cette règle est très intéressante car elle permet de simplifier le mécanisme très complexe de la réponse hormonale. Mais elle n'est pas absolue et de plus, elle ne résulte que d'études faites sur des cellules transfectées dans lesquelles le récepteur est surexprimé. Le problème majeur est sans doute celui du contexte du promoteur de chaque gène qui n'est pas pris en compte dans ce genre d'analyses.

### **3) La dimérisation :**

La présence de motifs répétés dans les éléments de réponse à l'acide rétinoïque et le fait que les récepteurs des glucocorticoïdes et des oestrogènes (ER) se lient à leur élément de réponse sous forme de dimères (Green et Chambon, 1988) suggèrent que les RAR se fixent également à l'ADN sous forme de dimères. Cependant, les RAR purifiés se lient très faiblement *in vitro* au RARE du gène de RAR $\beta$ . Dans les mêmes conditions, les préparations brutes de RAR exprimés dans les cellules de mammifères présentent une très bonne activité de liaison à l'ADN. Ces observations supposaient

a) RXRE

	----->	1	----->
DR-1	AGGTCA	G	AGGTCA
rCRBP II	AGGTCA	C	AGGTCA
hApoAI	AGGGCA	A	GGGTCA
cOVAL	GTGTCA	A	AGGTCA

b) RARE II

	----->	2	----->
DR-2	AGGTCA	AG	AGGTCA
mCRBPI	AGGTCA	AA	AGGTCA
mCRABPII	AGTTCA	CC	AGGTCA
hApoAI	GGGTCA	AG	GTTTCA

c) VDRE

	----->	3	----->
DR-3	AGGTCA	AGG	AGGTCA
rOST	GGGTGA	ATG	AGGACA
hOST	GGGTGA	ACG	GGGGCA
mSPP-1	GGTTCA	CGA	GGTTCA

d) TRE

	----->	4	----->
DR-4	AGGTCA	CAGG	AGGTCA
rMH	AGGTGA	CAGG	AGGACA
rME	GGGTTA	GGGG	AGGACA
MLV	GGGTCA	TTTC	AGGTCC

e) RARE I

	----->	5	----->
DR-5	AGGTCA	CCAGG	AGGTCA
mRAR $\beta$	GGTTCA	CCGAA	AGTTCA
mCP-H	AGGTCA	CTGAC	AGGGCA
hADH3	GGGTCA	TTCAG	AGTTCA

Fig. 10: Application de la règle 1-2-3-4-5 à différents HRE caractérisés (d'après Mangelsdorf *et al.*, 1994).

l'existence d'un facteur nécessaire à la formation efficace du complexe RAR/RARE qui est maintenant caractérisé.

En effet, le facteur responsable de l'augmentation de l'activité de liaison a été purifié et son ADNc cloné par plusieurs groupes de recherche. Il s'est avéré être RXR, le facteur de transcription activé par l'acide 9-cis rétinolique (Mangelsdorf *et al.*, 1990 ; Yu *et al.*, 1991 ; Leid *et al.*, 1992b). D'autres équipes ont également montré que RAR et RXR se fixent préférentiellement à leur élément de réponse sous forme d'hétérodimères (Bugge *et al.*, 1992 ; Nagpal *et al.*, 1993). Les domaines C et E sont tous deux impliqués dans le phénomène de dimérisation.

Contrairement aux récepteurs stéroïdiens qui se lient uniquement sous forme d'homodimères à des HRE palindromiques, les hétérodimères peuvent se fixer à des répétitions directes, des palindromes ou des palindromes inversés. Cette différence essentielle implique forcément des modifications dans les processus d'interaction entre les molécules ; et deux questions se posent naturellement : comment les récepteurs interagissent-ils entre eux et comment s'organisent-ils pour se fixer à des HRE constitués d'une répétition directe? Plusieurs équipes de recherche tentent d'y répondre.

Les investigations de l'équipe de Rosenfeld (Yu *et al.*, 1991) ont permis de démontrer, en pratiquant des délétions plus ou moins importantes, que l'extrémité C-terminale des récepteurs nucléaires est impliquée dans le phénomène d'hétérodimérisation.

Forman et Samuels (1990) ont remarqué que la zone centrale du domaine E du TR est riche en acides aminés hydrophobes disposés régulièrement en neuf heptades. Ces heptades contiennent une leucine ou un acide aminé hydrophobe (Ile, Val, Met, Phe) en position 1 et 8 de la répétition. En position 5, on trouve soit un acide aminé hydrophobe, soit un acide aminé chargé portant une chaîne hydrophobe (Arg, Gln). Ces acides aminés sont bien conservés parmi les récepteurs du groupe auquel appartiennent TR, VDR et RAR, ce qui corrobore l'idée d'une implication de cette zone dans l'hétérodimérisation.

Le groupe de Samuels a poursuivi les investigations et montré que les mutants de délétion de la neuvième heptade des TR et RAR perdent la capacité d'hétérodimériser avec RXR ou RAR/TR naturel, selon le mutant, en absence de ligand mais gardent la capacité d'homodimériser (Au-Fliegner *et al.*, 1993). La présence du ligand permet la formation d'hétérodimères, ce qui suggère l'existence d'une seconde région autre que la neuvième heptade, impliquée dans l'hétérodimérisation qui serait ligand-dépendante.

Rosen *et al.* (1993), quant à eux, se sont focalisés sur l'extrémité N-terminale du domaine E contenant la première heptade, au niveau de laquelle vingt acides aminés sont très conservés parmi les différents récepteurs. Ils ont montré que cette région est essentielle au niveau des TR, RAR et VDR pour l'hétérodimérisation de chacun d'eux avec RXR. Leurs études révèlent également que la région homologue au niveau du RXR ne joue pas le même rôle critique dans le processus d'hétérodimérisation.

Le domaine E est certes responsable des interactions les plus fortes pour la formation des complexes dimériques mais il n'intervient pas dans la détermination de la spécificité de reconnaissance des éléments de réponse. Cette spécificité est uniquement établie par la nature des régions de dimérisation présentes dans les domaines de liaison à l'ADN (Mader *et al.*, 1993 ; Perlmann *et al.*, 1993 ; Zechel *et al.*, 1994b).

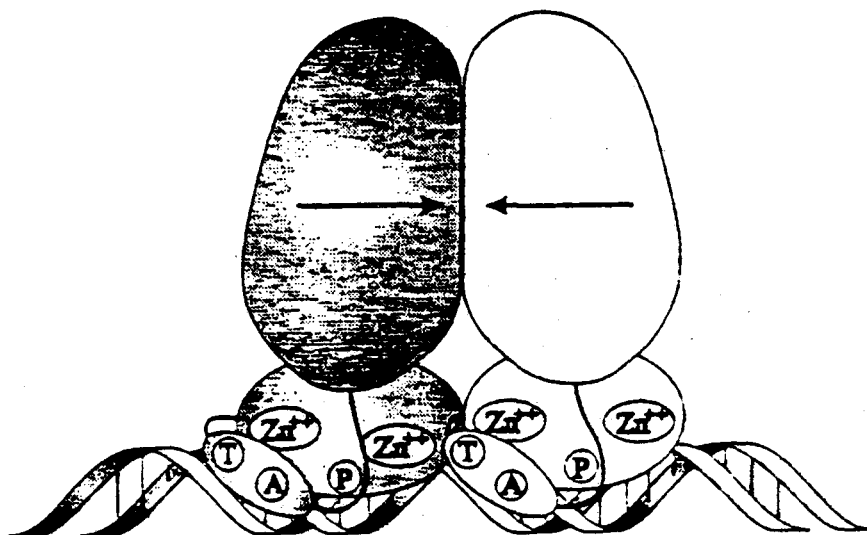
Les derniers travaux des groupes d'Evans, Glass, Giguère et Chambon qui tentent d'élucider le mécanisme d'hétérodimérisation et l'interaction avec des HRE constitués d'une répétition directe ne donnent pas les mêmes résultats. Les zones du domaine C, impliquées dans l'hétérodimérisation, qu'identifient ces équipes sont différentes.

Pour l'équipe de Glass, à côté des boîtes P et D du domaine de liaison à l'ADN interviendraient d'autres motifs peptidiques situés en dehors des boucles à zinc tels que la boîte A. Cette séquence de sept acides aminés décrite pour le récepteur NGF-1 (Wilson *et al.*, 1992) localisée dans la région D, est responsable de la spécificité de reconnaissance du HRE (Kurokawa *et al.*, 1993) (Fig. 11A).

De son côté, le groupe d'Evans montre qu'une zone située dans la boucle C1 de TR et RAR, appelée boîte DR, est impliquée dans l'hétérodimérisation. La dimérisation entre les espacements des demi-séquences des HRE s'effectuerait par les interactions boîte DR-boîte D de RXR (Perlmann *et al.*, 1993). Il propose que dans les complexes hétérodimériques RXR se positionne toujours en 5' de la séquence nucléotidique de l'élément de réponse de la même façon qu'un monomère GR. RAR et TR qui se placent en 3' du HRE, se positionneraient de façon à présenter la boîte DR en face de la boîte D de RXR (Fig. 11B).

Zechel *et al.*, quant à eux, concluent également à l'implication de la boîte D de RXR dans l'interaction de ce récepteur avec ses partenaires RAR ou TR, ainsi qu'à son positionnement en 5' des éléments de réponse. Par contre, ils proposent que la boîte D de RXR interagisse soit avec le sommet de la première boucle à zinc de RAR

A



B

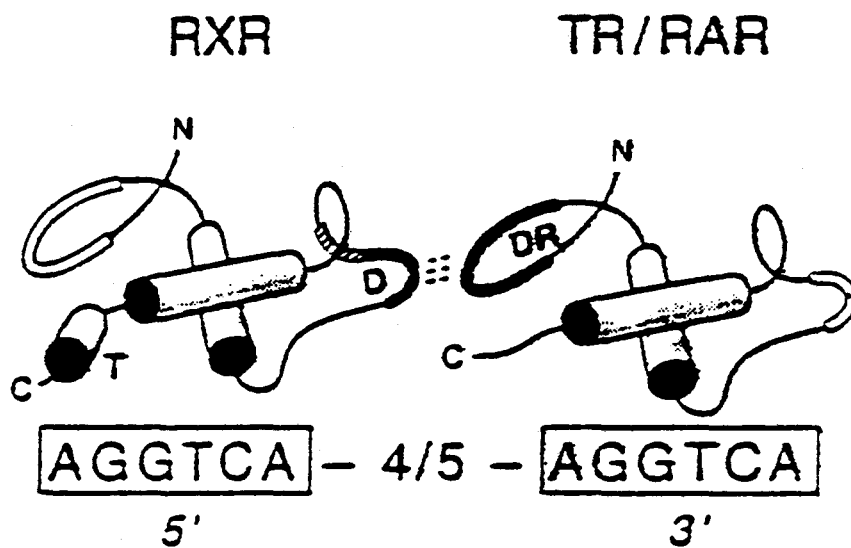


Fig. 11 : Interactions des hétérodimères RXR/TR ou RXR/RAR avec leur élément de réponse. Modèles proposés par (A) Kurokawa *et al.* (1993) ;  
(B) Perlmann *et al.* (1993).



pour former un complexe spécifique d'un DR-5, soit avec une séquence de sept acides aminés en amont de cette boucle (à l'extrémité C-terminale du domaine B) de TR pour reconnaître spécifiquement un DR-4. Les complexes RXR/RAR et les homodimères RXR/RXR, spécifiques de DR-2 et DR-1 respectivement, interagissent par l'intermédiaire de la seconde boucle à zinc de RXR et la boîte T de RAR ou RXR (Fig. 12) (Zechel *et al.*, 1994 a et b).

Pour le groupe de Giguère, l'interaction RAR-RXR mettrait en jeu la boîte H, constituée en partie de la boîte T et conservée chez les différents RAR (Predki *et al.*, 1994).

#### 4) La transactivation :

La fonction ultime d'un récepteur nucléaire est d'activer la transcription du gène cible contrôlé par le HRE sur lequel il s'est fixé.

Des récepteurs chimères contenant le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (qui ne possède pas de fonction de transactivation intrinsèque) et les domaines D/E de chacune des trois formes des RAR et RXR présentent une activité transactivatrice hormono-dépendante. Cela suggère l'existence d'une fonction d'activation de la transcription ligand-dépendante localisée dans le domaine de liaison à l'hormone. Elle est appelée TAF-2 ("Transcription Activation Function") (Leid *et al.*, 1992a). Folkers *et al.* (1993) montrent que TAF-2 de RAR $\beta$ 2 met en jeu une structure tertiaire qui s'étend tout le long du domaine E entre les acides aminés 137-410.

Des mutants de délétion des régions A ou B perdent la capacité d'activer certains gènes, ce qui suppose l'existence d'une activité transactivatrice localisée dans ces régions et appelée TAF-1 (Nagpal *et al.*, 1992a). TAF-1 de RAR $\beta$ 2 est constituée des 32 premiers acides aminés de la région A (Folkers *et al.*, 1993).

L'activité transactivatrice des RAR et RXR varie en fonction des promoteurs contenant des éléments de réponse synthétiques ou naturels. La synergie entre les deux fonctions de transactivation dépend à la fois du contexte du promoteur et de la nature de l'élément de réponse. TAF-1 peut également fonctionner de façon autonome en fonction du contexte du promoteur (Nagpal *et al.*, 1993).

TAF-1 et TAF-2 doivent être très différentes d'un type de récepteur à l'autre puisque leurs activités ne sont pas synergiques pour deux TAF provenant de deux types de récepteurs distincts. La spécificité de l'activité transactivatrice d'un type de récepteur donné est donc déterminée par une fonction commune à tous les récepteurs

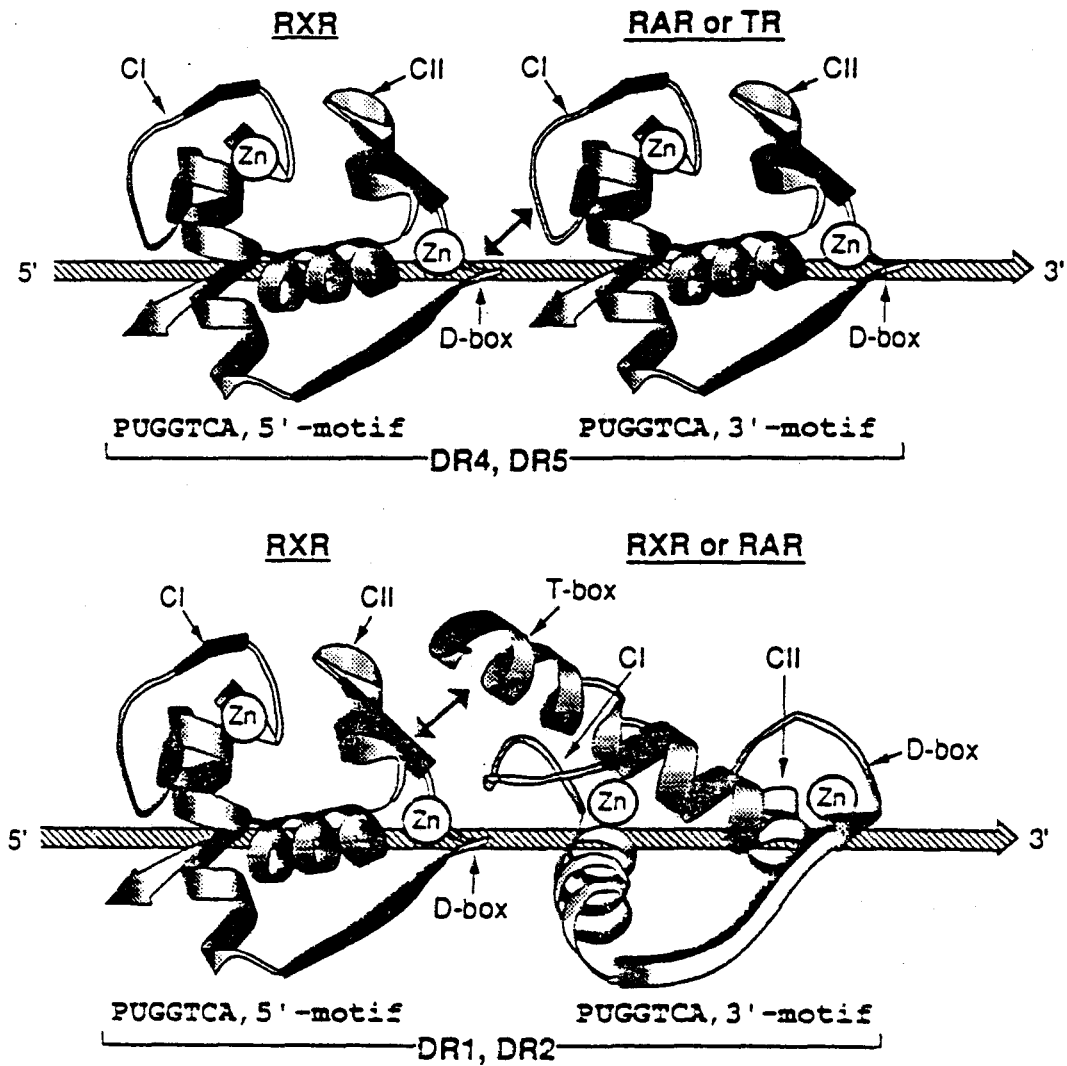


Fig. 12 : Interactions des hétérodimères RXR/TR ou RXR/RAR avec leur élément de réponse. Modèles proposés par Zechel *et al.* (1994b).

(TAF-2) et une autre fonction spécifique de l'isoforme, du type cellulaire et du stade du développement (TAF-1, qui est partiellement contenue dans la région N-terminale spécifique de chacune des isoformes) (Nagpal *et al.*, 1993).

Nous avons donc mis en place différentes fonctions des RAR et RXR, qui sont la fixation à des séquences oligonucléotidiques sous forme de dimères et la transactivation. L'interaction du récepteur avec son ligand est une étape fondamentale indispensable à la stimulation du récepteur. Cette fonction est localisée dans le domaine E des récepteurs nucléaires, domaine encore peu connu pour les RAR et RXR. Il nous a semblé très intéressant d'exposer les connaissances actuelles sur ce domaine pour l'ensemble des membres de la famille des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens.

CHAPITRE 2:

*LE DOMAINE DE FIXATION AU LIGAND  
DES RECEPTEURS  
STEROÏDIENS/THYROÏDIENS.*

### *Introduction :*

Le domaine E, responsable de la fixation du ligand, présente un faible degré d'homologie entre les différents récepteurs de la superfamille des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens. Ceci est dû à la diversité des ligands reconnus spécifiquement par chacun d'eux (Fig. 13).

Il existe cinq grandes classes d'hormones stéroïdes : les oestrogènes dont la forme la plus active est le 17  $\beta$ -oestradiol, la progestérone, les glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme, corticostérone chez les rongeurs), les androgènes et les minéralocorticoïdes dont l'aldostérone représente la forme majoritaire. Les hormones thyroïdiennes sont secrétées essentiellement sous deux formes d'inégale activité biologique : la L-T4 (L-thyroxine) et la T3 (3,5,3'-L-triiodothyronine). Toutes ces molécules ont donc en commun avec la vitamine D3 et l'acide rétinoïque le fait de diffuser librement à travers la membrane plasmique et d'avoir des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires.

Malgré la diversité des ligands reconnus par les récepteurs nucléaires, leur domaine E présente des analogies. Localisé en C-terminal, il représente une région très étendue, de 200 à 250 acides aminés, qui comporte de nombreux résidus hydrophobes.

Il présente dans tous les cas la même organisation générale en sous-domaines. En effet, on sait maintenant que le domaine E a de nombreuses autres fonctions importantes. De façon simplifiée, ce domaine peut être découpé en quatre régions de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale (Forman et Samuels, 1990, Fig. 14):

- La région L1 est directement impliquée dans la fixation du ligand et diffère beaucoup d'un type de récepteur à l'autre.

- La région Ti est responsable de la régulation de la transcription ligand-dépendante et de l'interaction avec certaines protéines, comme les protéines de choc thermique (hsp). On pense qu'en se fixant sur le domaine Ti, les protéines hsp contraignent le récepteur à rester sous une forme inactive (d'où le nom "transcription inhibition") et très affine pour le ligand (Danielsen, 1991). Il faut rappeler que l'interaction avec les hsp n'est pas décrite pour les récepteurs de l'acide rétinoïque (Dalman *et al.*, 1991), par contre le sous-domaine Ti existe dans tous les cas.

- La région de dimérisation (DM) est, comme la zone Ti, conservée entre presque tous les récepteurs nucléaires et est généralement associée à Ti sous le terme de région Ti-DM.

- La région L2, C-terminale, est avec L1 responsable de la fixation du ligand. Ces zones doivent se trouver associées par des repliements de la structure primaire

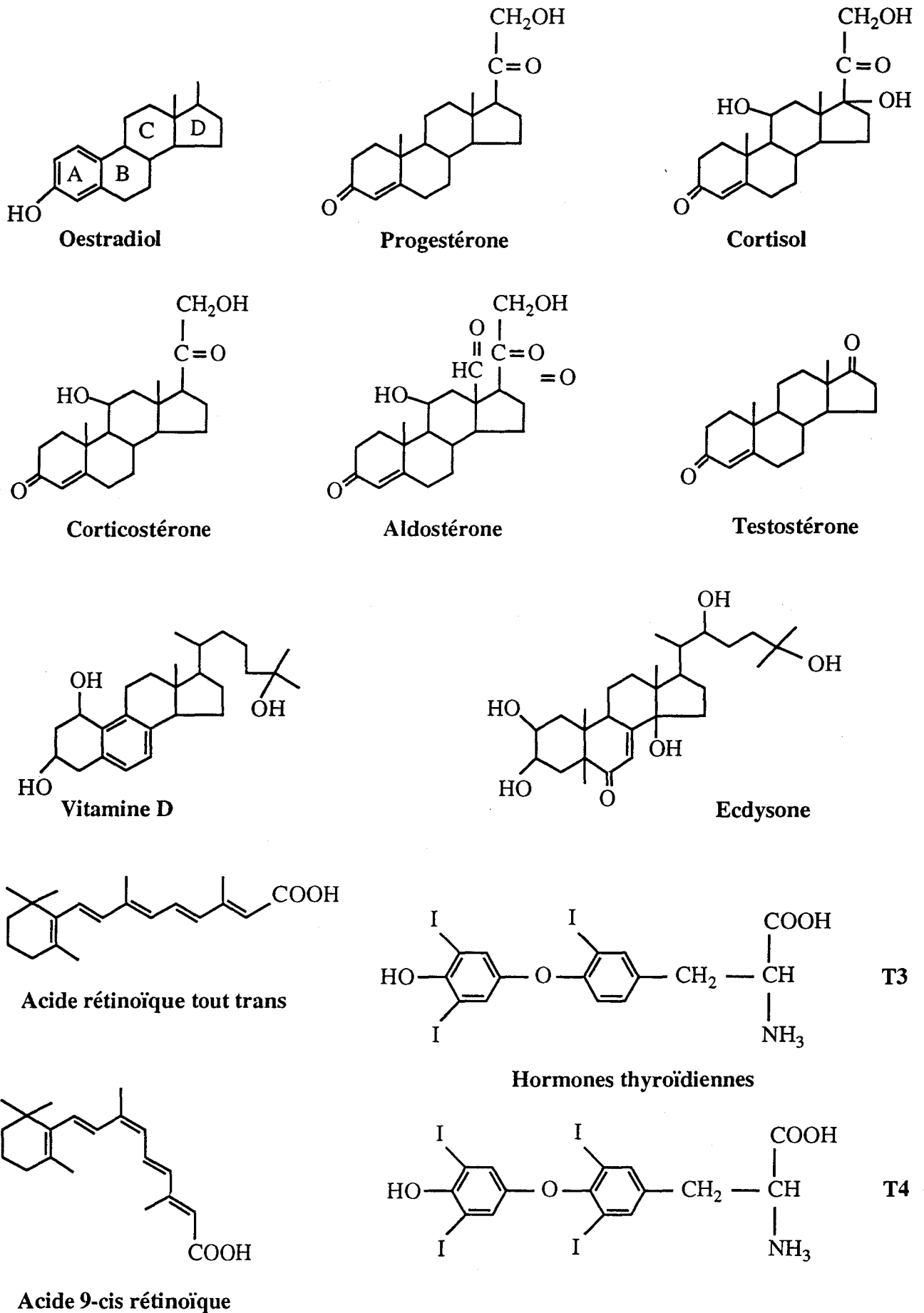


Fig. 13: Ligands des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens.

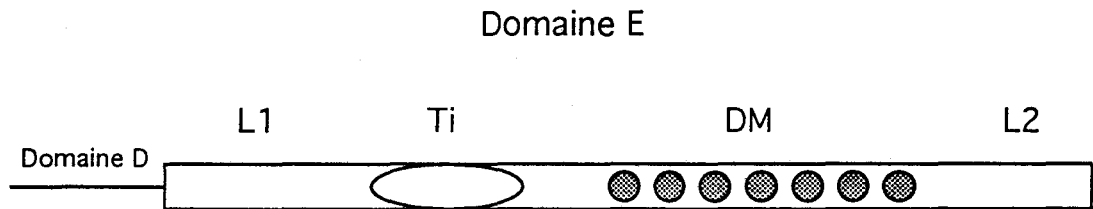


Fig. 14: Anatomie du domaine E des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens  
(d'après Forman et Samuels, 1990)

pour former une poche hydrophobe et participer à la spécificité de reconnaissance du ligand.

L'intérêt majeur de l'étude de ce domaine est de savoir comment se font la reconnaissance du ligand et la discrimination agoniste/antagoniste. Nous disposons de très peu de données, à ce jour, en ce qui concerne les RAR et RXR. Compte tenu des analogies entre les domaines E des différents récepteurs nucléaires, nous avons voulu voir comment a été abordée l'étude de ce domaine pour les autres récepteurs.

### A) RELATION STRUCTURE-AFFINITE DES LIGANDS DE SYNTHESE

L'étude du site actif du domaine E des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens peut être abordée via le ligand. De nombreux travaux sont consacrés à l'étude systématique de la corrélation entre la structure des dérivés de synthèse et leur activité de liaison aux récepteurs nucléaires. Cette approche permet non seulement d'évaluer l'affinité de ces molécules mais aussi leur spécificité. Nous ne détaillerons pas ici les résultats des études de relation structure-affinité (RSA) des membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens. Nous illustrerons seulement l'intérêt d'une telle approche par quelques exemples.

Les cinq classes des hormones stéroïdes ne présentent pas une spécificité absolue. En effet, des réactions croisées peuvent être observées entre les ligands des récepteurs des glucocorticoïdes, de la progestérone et des minéralocorticoïdes, ou encore entre les récepteurs de la progestérone et des androgènes. Les études de RSA ont conduit à la découverte de ligands spécifiques de l'un ou l'autre des récepteurs. Par exemple, le RU 26988, se lie exclusivement au GR (Ojasoo et Raynaud, 1978).

Les récepteurs des rétinoïdes présentent des degrés d'homologie élevés mais aussi des différences telles qu'il est envisageable de synthétiser des ligands spécifiques de l'un ou l'autre de ces récepteurs. Il existe des rétinoïdes de synthèse sélectifs ou même spécifiques de l'une ou l'autre des formes de RAR. Leur formule et leur sélectivité sont reprises dans la figure 15 (Crettaz *et al.*, 1990 ; Hashimoto *et al.*, 1990 ; Delescluse *et al.*, 1991 ; Graupner *et al.*, 1991 ; Lehmann *et al.*, 1991 ; Bernard *et al.*, 1992 ; Martin *et al.*, 1992). Etant donné la découverte très récente des RXR, il existe encore très peu de ligands spécifiques de ces récepteurs. Citons les travaux de Lehmann *et al.* (1992a) et Jong *et al.* (1993) qui ont conduit à la synthèse des dérivés SR 11217, SR 11237, D5 et D9 (Fig. 16).

La recherche d'antagonistes spécifiques de l'un ou l'autre des récepteurs a également fait l'objet de nombreux travaux. Le RU 486 présente une activité anti-glucocorticoïde et anti-progestérone, inconvénient majeur pour son utilisation.



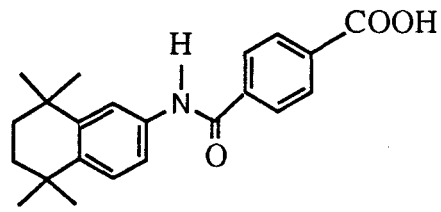
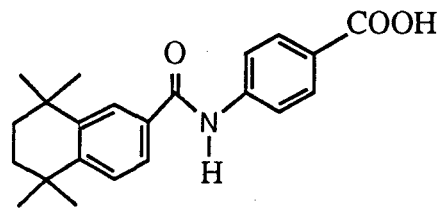
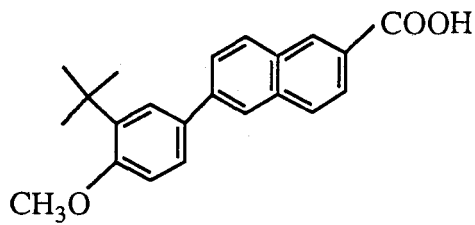
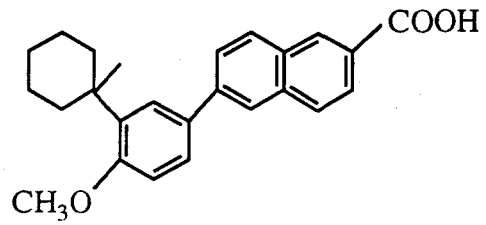
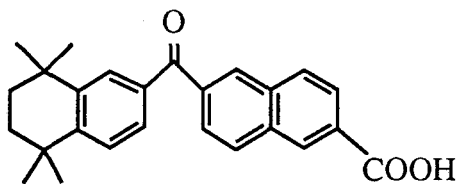
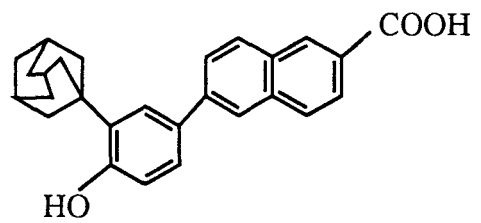
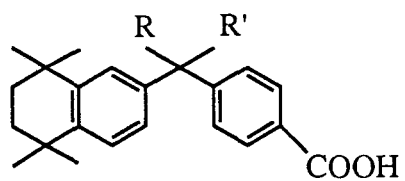
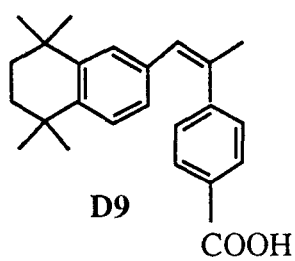
Am80: RAR $\alpha$ Am580: RAR $\alpha$ CD417: RAR $\beta$ CD2019: RAR $\beta$ CD564: RAR $\beta$ - $\gamma$ CD437: RAR $\gamma$ 

Fig. 15: Rétinoïdes de synthèse sélectifs. La sélectivité est précisée pour chaque molécule.



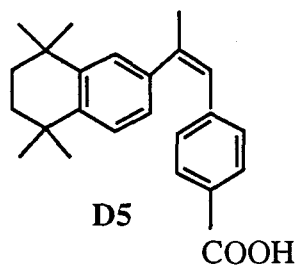
SR11217 : R,R' = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C

SR11237 : R,R' = OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O



D9

COOH



D5

COOH

Fig. 16: Rétinoïdes de synthèse spécifiques des RXR.

L'encombrement de la région 17 permet de dissocier les deux activités. Le dérivé Org 31710 est considéré comme un anti-progestérone pur (Mizutami *et al.*, 1992).

La plupart des antagonistes des récepteurs stéroïdiens présentent des caractéristiques communes : ils possèdent en effet un squelette stéroïde substitué par un groupement encombrant en position 7 (ICI 164384, anti-oestrogène) ou en position 11 (RU 486). D'autres voies de recherche ont conduit à l'anti-oestrogène tamoxifène, qui dérive de l'agoniste diéthylstilbestrol, également par l'introduction d'un groupement encombrant.

Ces deux voies de recherche ont été appliquées aux rétinoïdes et ont amené à la synthèse d'antagonistes plus ou moins spécifiques : RO-415253, spécifique de RAR $\alpha$  (Apfel *et al.*, 1992), BIPh, BIBn et D16, antagonistes de RAR $\alpha$  et RAR $\beta$  (Eyrolles *et al.*, 1992 ; 1994) (Fig. 17).

Ces études de RSA sont parfois accompagnées d'une approche conformationnelle, par cristallographie des dérivés de synthèse ou par modélisation moléculaire (Darmon *et al.*, 1988 ; Dawson *et al.*, 1989 ; Jong *et al.*, 1993). Les rétinoïdes de synthèse sont des molécules plus rigides que l'acide rétinoïque. Leur analyse cristallographique permet d'obtenir des informations plus précises sur la géométrie du site de liaison au ligand.

## **B) ETUDE DE LA PROTEINE :**

Le domaine E est une région dont la taille relativement importante et la difficulté de sa production sous forme recombinante fonctionnelle entravent l'étude, aux progrès très lents. Cependant trois méthodes, associées à l'étude des récepteurs déficients, sont expérimentées avec succès pour identifier les acides aminés impliqués dans l'affinité, la spécificité, la dimérisation et la transactivation. Ces méthodes sont l'utilisation de réactifs covalents spécifiques d'acides aminés, le marquage d'affinité et la mutagenèse dirigée. La grande taille du domaine E rend l'utilisation de la mutagenèse dirigée plus ou moins difficile. Il en est de même pour les études physico-chimiques, la structure tridimensionnelle de ce domaine fait l'objet de très peu de données.

Nous allons maintenant résumer les principaux résultats obtenus pour les différents récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens avant d'étudier le changement de conformation induit par le ligand.

### ***1) Les réactifs spécifiques d'acides aminés :***

L'utilisation de réactifs covalents spécifiques permet de définir l'importance de

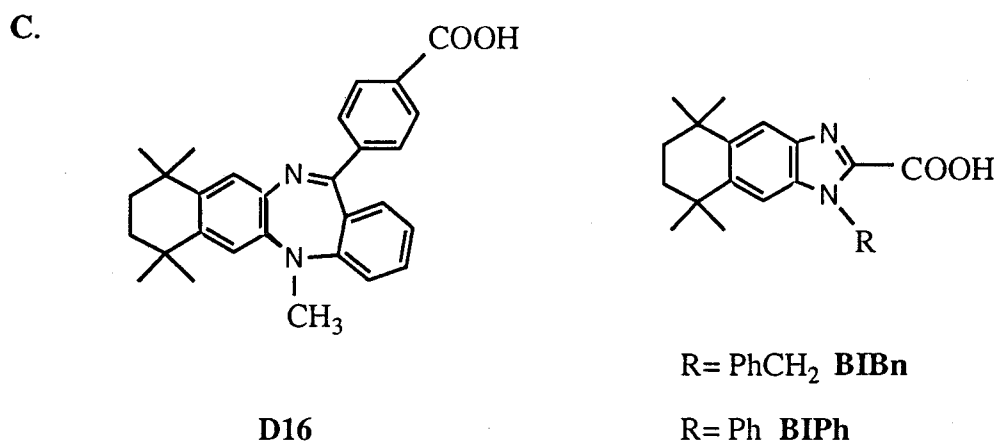
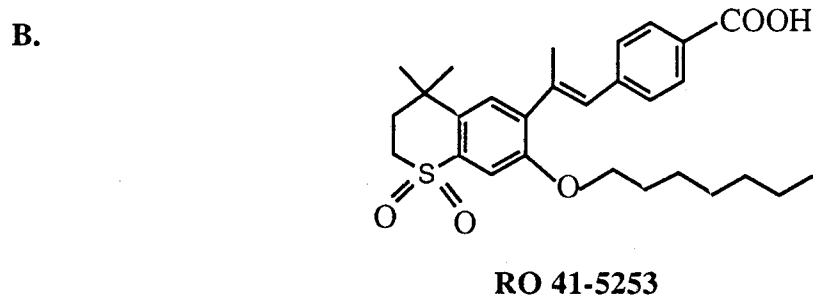
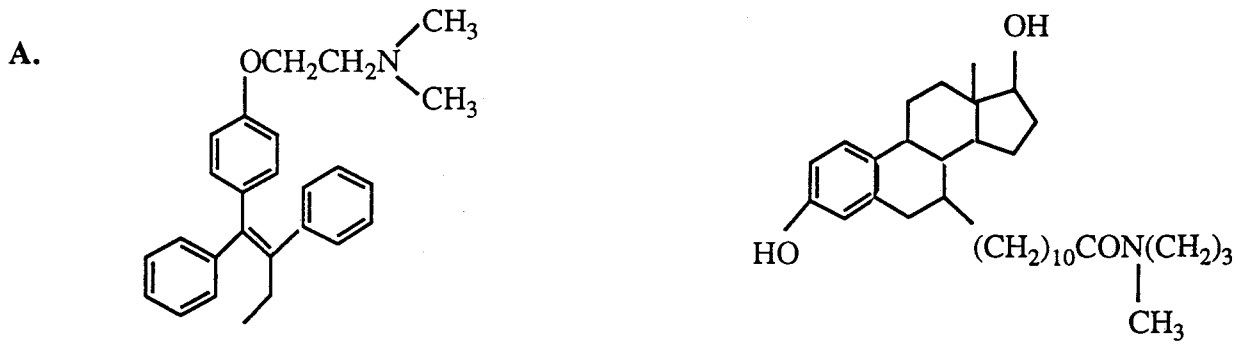


Fig. 17: Anti-oestrogènes (A) et antagonistes sélectifs de RAR $\alpha$  (B) ou RAR $\alpha$ - $\beta$  (C).

tel ou tel groupe d'acides aminés dans l'interaction hormone-récepteur. Ces réactifs vont réagir avec les acides aminés essentiels du site actif, mais aussi avec les autres résidus d'acides aminés accessibles à la surface du récepteur. La démonstration indirecte de l'existence d'un résidu essentiel dans le site lui-même pourra être apportée par des expériences de protection du site par la fixation préalable du ligand. Cette méthode d'étude apporte un argument indirect à l'implication de divers acides aminés dans l'interaction récepteur-ligand.

#### a) Les cystéines :

L'implication des cystéines dans la formation du complexe hormone-récepteur a fait l'objet de nombreux travaux. On compte 3 à 7 résidus cystéines dans le domaine E des différents récepteurs stéroïdiens. Leur localisation est représentée dans la figure 18.

#### *α) Le récepteur des glucocorticoïdes :*

Le récepteur le plus étudié par l'intermédiaire de cette technique est le récepteur des glucocorticoïdes. La notion de l'existence, dans le domaine E, d'au moins un groupement thiol nécessaire à l'activité de liaison à son ligand est montrée par la sensibilité de ce récepteur à différents réactifs plus ou moins spécifiques.

Les agents réducteurs des thiols tels que le  $\beta$ -mercaptoéthanol et le dithiothréitol (DTT) sont capables d'augmenter la durée de demi-vie du récepteur du GR sans toutefois augmenter la capacité de liaison du récepteur à l'hormone (Rees et Bell, 1975).

Les organomercuriels (Rees et Bell, 1975 ; Coty, 1980 ; Harrison *et al.*, 1983), le MMTS (Méthyl Méthane Thio Sulfonate) et le DTNB (5,5'-DiThio bis-Nitro Benzoate) (Tienrugroj *et al.*, 1987 ; Miller *et al.*, 1988) inactivent le GR de manière réversible. L'activité de liaison peut être totalement régénérée par addition d'un réducteur tel que le DTT à forte concentration.

L'iodoacétamide et diverses maléimides N-substituées alkylent les groupements thiols de manière irréversible. Le GR libre est inactivé en présence de ces réactifs. Par contre, la liaison préalable au récepteur d'un stéroïde synthétique à forte affinité comme la dexaméthasone protège complètement le site de liaison des effets de ces réactifs tout comme de l'action des réactifs à action réversible (Rees et Bell, 1975 ; Young *et al.*, 1975). La longueur de la chaîne substituant la maléimide présente un effet positif sur l'inactivation du GR, ce qui laisse supposer que le(s) groupement(s) thiol(s) alkylé(s) se trouve(nt) dans un environnement hydrophobe, et probablement dans le site de liaison du stéroïde lui-même (Formstecher *et al.*, 1984).

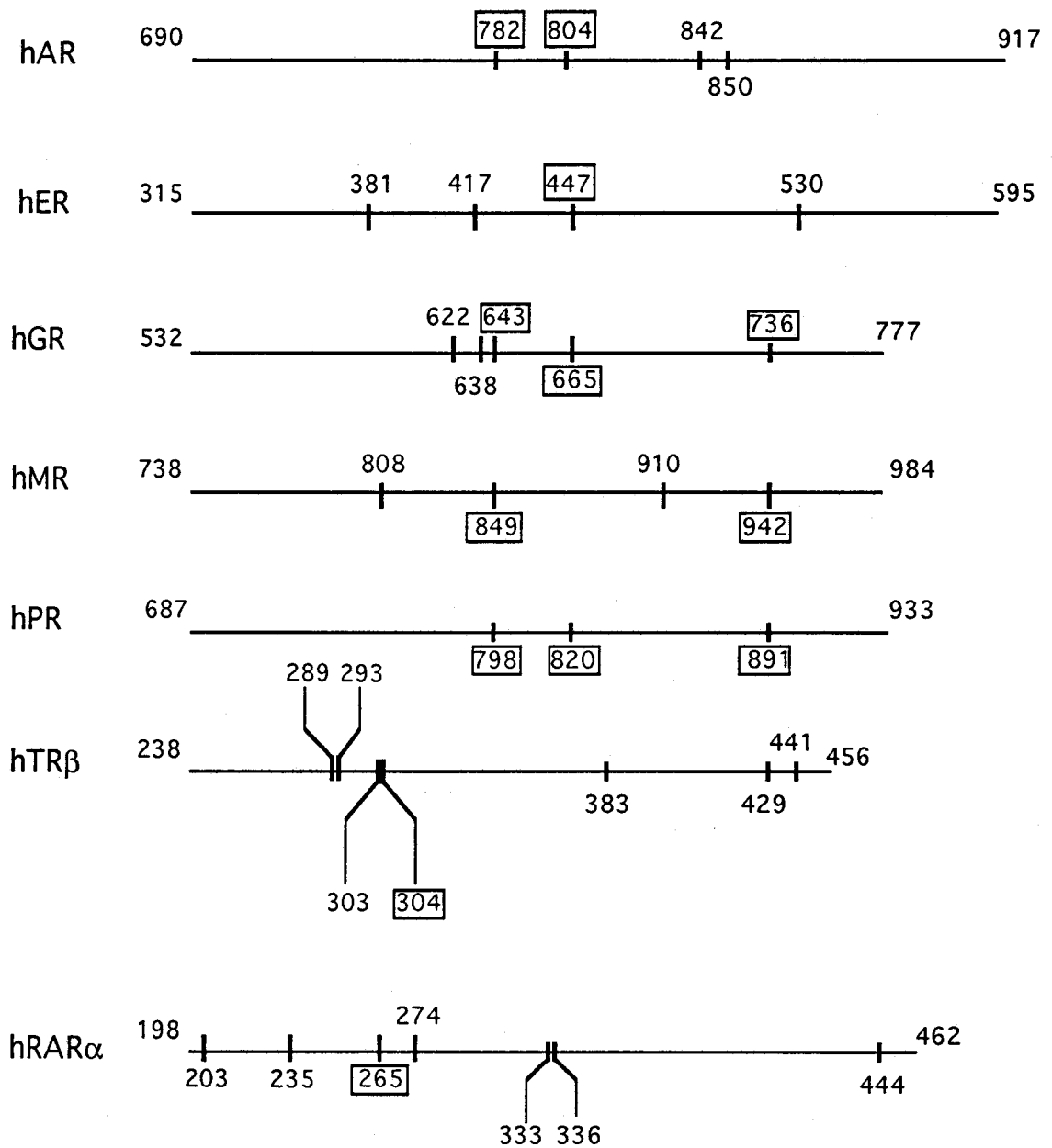


Fig. 18: Localisation des cystéines des différents récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens.

Les cystéines conservées chez plusieurs récepteurs sont encadrées. Toutes les cystéines de RAR $\alpha$  sont conservées chez RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  sauf la Cys 444.

L'étude des effets du sélénite (Tashima *et al.*, 1989), du peroxyde d'hydrogène (Bresnick *et al.*, 1988), du cadmium II et de l'arsénite et ses dérivés (Lopez *et al.*, 1990 ; Simons *et al.*, 1990) permet de confirmer l'importance des groupes thiols dans l'interaction stéroïde-GR. La spécificité de réaction de l'arsénite et du cadmium pour les thiols vicinaux est connue. L'observation d'une inhibition réversible de l'activité de liaison du GR en présence de ces substances suppose la formation d'un pont disulfure intramoléculaire impliquant deux groupes thiols voisins. Le groupe de Simons propose que ces thiols impliquent deux des cystéines présentes dans le fragment peptidique Thr537-Arg673 du GR de rat (Chakraborti *et al.*, 1990) et qu'ils soient localisés dans une poche importante pour l'interaction avec le cycle D du stéroïde (Stancato *et al.*, 1993).

Sans apporter la preuve directe de l'implication de cystéine dans l'interaction récepteur-ligand, tous les résultats énoncés ci-dessus corroborent l'idée de la participation d'une ou plusieurs cystéines dans ce processus.

#### β) *Les autres récepteurs :*

Le rôle des cystéines dans la formation du complexe avec le ligand a été étudié pour d'autres récepteurs stéroïdiens. La N-éthylmaléimide, l'iodoacétamide et le parahydroxymercuribenzoate réduisent également l'activité de liaison des récepteurs de la progestérone et des oestrogènes vis-à-vis de leur ligand respectif (Kalimi *et al.*, 1981 ; Jensen *et al.*, 1967). Par contre, l'arsénite, qui diminue l'activité de liaison du GR, ne présente pas d'effet sur celle des récepteurs des oestrogènes, de la progestérone (PR), des androgènes (AR) et des minéralocorticoïdes (MR) (Simons *et al.*, 1990).

#### b) Autres acides aminés :

L'utilisation de réactifs covalents spécifiques d'acides aminés n'a pas été seulement appliquée aux cystéines. Il a été montré que les acides aminés basiques comme la lysine (réactif spécifique : le phosphate de pyridoxal, Di Sorbo *et al.*, 1980) et l'arginine (réactifs spécifiques : phénylglyoxal et 1,2-cyclohexane dione, Di Sorbo *et al.*, 1980 ; Shyamala et Daveluy, 1982) joueraient également un rôle dans l'interaction GR-hormone.

#### c) Différence agoniste/antagoniste :

Les acides aminés du site de liaison impliqués dans l'interaction avec un ligand agoniste ou antagoniste ne sont pas complètement identiques. Cela peut être indirectement démontré par l'utilisation des réactifs covalents d'acides aminés. En

effet, les travaux des équipes de Hurd et Scali montrent que l'activité de liaison des récepteurs de la progestérone et des oestrogènes présente une sensibilité différente aux réactifs selon la nature agoniste (R5020, oestradiol) ou antagoniste (RU486, tamoxifène) du ligand (Borgna et Scali, 1988 ; Moudgil *et al.*, 1989).

Ainsi, cette méthode utilisant des réactifs spécifiques associée à des réactions de protection (post-incubation des réactifs par rapport au ligand) et des réactions d'échange peut apporter contrairement à la mutagenèse dirigée des indications sur le positionnement même du ligand à l'intérieur du site accepteur. En effet, Burollaud *et al.* (1993) mettent en évidence une sensibilité et une capacité de protection différente des ligands du GR en fonction de leur structure qui refléterait un positionnement différent dans la cavité du site de liaison.

## 2) Le marquage d'affinité :

Le concept de marquage d'affinité est de générer une liaison covalente entre deux molécules qui interagissent et de "geler" irréversiblement l'interaction. Le marqueur possède le squelette hydrocarboné de base d'un ligand naturel ou synthétique modifié par l'addition d'une fonction réactive permettant une liaison covalente avec les acides aminés du site actif du domaine de liaison au ligand. Il doit garder les mêmes spécificité et sélectivité que le ligand naturel.

### a) Les stéroïdes marqueurs d'affinité :

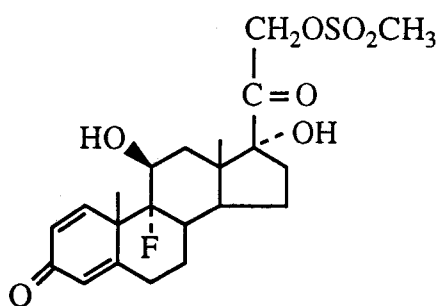
Les principaux marqueurs d'affinité utilisés pour l'étude des récepteurs stéroïdiens sont présentés dans la figure 19. Ils peuvent être classés en deux catégories selon le groupe réactif qu'ils possèdent et leur mécanisme réactionnel :

-les marqueurs alkylants électrophiles : ils possèdent un bon groupe partant comme un atome de brome ou le groupe méthyl sulfonyloxy (mésylate), très facilement déplacé pour permettre la liaison covalente ;

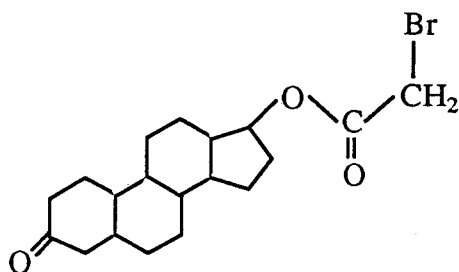
-les marqueurs de photoaffinité : ils possèdent un groupement activé par absorption d'énergie lumineuse et produisent alors un groupement carbène, nitrène ou un radical libre. La photoaffinité est en théorie une technique idéale puisque l'on peut réaliser d'abord la formation des complexes récepteur-ligand (non covalents) à l'abri de la lumière, puis éliminer l'excès de ligand libre avant de procéder à la photoactivation. Cette méthode présente cependant deux inconvénients. Le premier est le manque de sélectivité de la liaison covalente créée après photoactivation : il y a risque de réaction avec de nombreux groupements au voisinage de la fonction réactive selon des mécanismes réactionnels difficiles à élucider. Le second inconvénient est le rendement généralement très faible du marquage covalent obtenu.



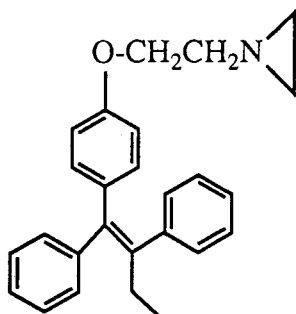
A.



Mésylate de dexaméthasone (GR)

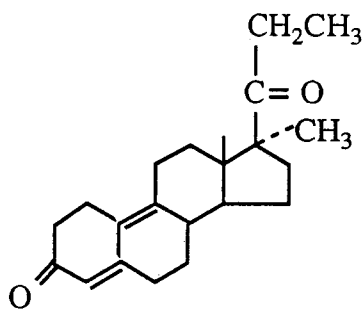


Dihydrotestostérone 17β-bromoacétate (AR)

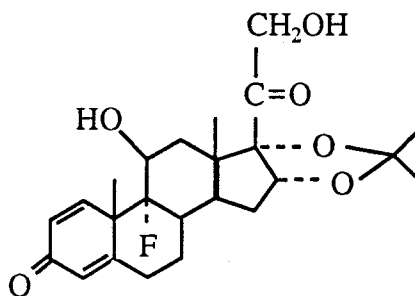


Tamoxifen aziridine (ER)

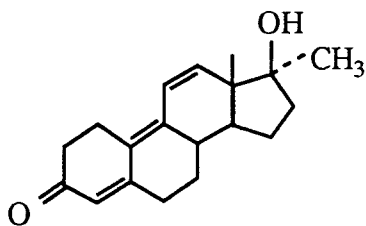
B.



R5020 (PR)



Acétonide de triamcinolone (GR)



R1881 (AR)

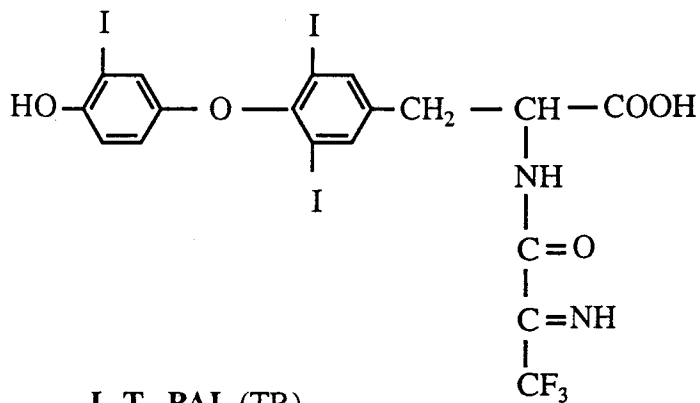
L-T<sub>3</sub>-PAL (TR)

Fig. 19: A: Marqueurs d'affinité électrophiles, B: Marqueurs de photoaffinité des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens

Cette technique d'étude suppose évidemment un travail de chimie de synthèse plus ou moins long et laborieux. La synthèse des dérivés aziridines est beaucoup plus délicate que celle des dérivés mésylates. Les aziridines présentent également l'inconvénient d'être très instables et requièrent de grandes précautions lors de leur purification et de leur utilisation (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 1988).

#### b) Le rendement de marquage :

Le marquage d'affinité est plus ou moins efficace selon le dérivé et manque parfois de sélectivité. De façon générale, les marqueurs de photoaffinité présentent un rendement très faible par rapport aux marqueurs électrophiles. Ainsi, le rendement du marquage du GR purifié de foie de rat par l'acétonide de triamcinolone n'est que de 4 à 5 % (Carlstedt-Duke *et al.*, 1988). Le dérivé R5020 (marqueur de PR) présente une efficacité variant de 5 à 15 % mais présente l'avantage d'être très spécifique (Gronemeyer, 1988). Le marqueur L-T<sub>4</sub>-PAL, qui est dix fois plus efficace que L-T<sub>3</sub>-PAL, présente un rendement très variable, de 13,5 à 50 % (Horowitz et Samuels, 1988).

En ce qui concerne les marqueurs électrophiles, le récepteur des androgènes réagit de façon covalente avec la bromoacétoxy-dihydrotestostérone avec une efficacité de près de 20 % (Chang *et al.*, 1984). Les meilleurs résultats sont obtenus avec le tamoxifène aziridine et le mésylate de dexaméthasone. Ces dérivés engagent une liaison covalente avec plus de 90 % des ER ou GR, respectivement, présents dans les préparations étudiées (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 1988 ; Simons, 1988).

#### c) Les résultats :

Dès le début des années 1980, ces deux techniques ont permis la caractérisation de récepteurs nucléaires et la détermination de leur poids moléculaire. Elles ont parfois permis l'identification des acides aminés concernés par la liaison covalente. Elles ont aussi été utilisées pour la comparaison structurale de formes apparentées et de variants. Les résultats obtenus à ce jour sont les suivants.

##### *α) Détermination de la masse moléculaire :*

La détermination de la masse moléculaire des récepteurs nucléaires à l'aide du marquage d'affinité s'est avérée plus ou moins facile selon la protéine. Pour les récepteurs des glucocorticoïdes et des oestrogènes, les résultats obtenus par les différentes équipes étaient concordants.

Le premier marquage d'affinité du récepteur des glucocorticoïdes a été réalisé avec un dérivé stéroïde photoréactif : la 21-diazo-dexaméthasone. La masse moléculaire de la protéine marquée est de 94 kDa. Cette masse a ensuite été confirmée par de nombreuses études dans lesquelles les masses moléculaires observées variaient entre 87 et 94 kDa, différences essentiellement dues aux conditions électrophorétiques (Gronemeyer et Govindan, 1986).

Le marqueur le plus largement utilisé, le mésylate de dexaméthasone, a permis d'identifier le récepteur des glucocorticoïdes dans de nombreux tissus et espèces : le foie de rat, purifié (Wrange *et al.*, 1984) ou non (Eisen *et al.*, 1981), les cellules HTC d'hépatome de rat (Simons et Thompson, 1981), les cellules lymphoïdes humaines ou de rat et les cellules MCF-7 de cancer du sein (Gronemeyer et Govindan, 1986).

Dans les cellules MCF-7 de cancer du sein et dans l'utérus de rate, le récepteur des oestrogènes réagit de façon covalente avec l'analogue électrophile de l'anti-oestrogène tamoxifène, le tamoxifène aziridine (TAZ) (Robertson *et al.*, 1981 ; Katzenellenbogen *et al.*, 1983). Les récepteurs marqués analysés en électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) apparaissent tous les deux sous une forme majeure d'une masse de l'ordre de 60-66 kDa et présentent les mêmes propriétés de sédimentation que les récepteurs associés à l'oestradiol radioactif.

Dans le cas du récepteur à la progestérone, le marquage d'affinité a surtout été utilisé pour comparer les deux formes existantes A et B de ce récepteur. Holmes *et al.* (1981), en utilisant trois dérivés de la progestérone : les dérivés 21-, 16 $\alpha$ - et 11 $\alpha$ -bromoacétoxy progestérone, ont alkylé une protéine de 45 kDa dans le cytosol de cellules humaines d'utérus. En 1983, l'équipe de O'Malley a eu recours à la photoaffinité. Le dérivé R5020 leur a permis de marquer les deux formes A (79 kDa) et B (108 kDa) du récepteur de poulet. Leurs premiers résultats ont révélé des similitudes entre les deux formes au point de vue point isoélectrique et profil de digestion enzymatique (Birnbaumer *et al.*, 1983a). Des études complémentaires ont montré que les deux formes présentent une structure primaire différente. Birnbaumer *et al.* (1983b) ont alors émis l'hypothèse de deux protéines apparentées se repliant de façon similaire. Leur structure tertiaire voisine leur conférerait alors le même comportement vis-à-vis des attaques enzymatiques.

Les résultats obtenus avec le récepteur des androgènes se sont révélés discordants. En effet, différentes masses moléculaires ont été rapportées après l'utilisation du marqueur électrophile, dihydrotestostérone 17- $\beta$ -bromoacétate, et du ligand photoactivable, méthyltriénolone (R1881), pour identifier le récepteur androgène des vésicules séminales de boeuf, de prostate et des vésicules séminales de

rat (Brinkmann *et al.*, 1986, Sweet et Murdock, 1987) ainsi que dans les cellules d'adénocarcinome prostatique humain et dans l'utérus de veau (Brinkmann *et al.*, 1986). L'origine de ces différences est mal définie, elles peuvent refléter une spécificité liée à l'espèce ou des problèmes associés à la protéolyse. En effet, les deux marqueurs d'affinité ne sont efficaces que sur des préparations partiellement purifiées, on ne peut donc exclure des phénomènes de protéolyse lors de la purification.

Dans les vésicules séminales de boeuf, deux protéines, de 60 et 70 kDa, ont été détectées. Seule la forme 60 kDa peut lier l'ADN et être isolée à homogénéité. Chez le rat, un seul polypeptide de 86 kDa a réagi spécifiquement avec le marqueur électrophile alors qu'une forme correspondant à une masse moléculaire de 50 kDa a été observée grâce à la molécule photoactivable. Une protéine de 50 kDa a également été mise en évidence dans l'adénocarcinome prostatique humain. Enfin, dans l'utérus de veau, la taille du récepteur marqué est de 95 kDa.

Pour connaître la masse moléculaire du récepteur aux androgènes humain par l'intermédiaire de cette méthode, il a fallu attendre les travaux de Brinkmann *et al.* en 1988 qui ont identifié ce récepteur *in situ* à l'aide de R1881 sous la forme d'une protéine de 110 kDa.

Peu de résultats ont été obtenus pour le récepteur des hormones thyroïdiennes identifié dans les cellules GH<sub>1</sub> et dans les fibroblastes humains grâce aux analogues fluorés de ces hormones : L-T<sub>3</sub>PAL, L-T<sub>3</sub>rPAL et L-T<sub>4</sub>PAL. Deux protéines, de 47 et 57 kDa, ont été alkylées et ont donné les mêmes produits de clivage après protéolyse ménagée. L'utilisation de ces ligands n'a pas permis d'établir la relation entre ces deux protéines (Pascual *et al.*, 1982 ; Casanova *et al.*, 1984 ; Horowitz *et al.*, 1988).

### β) *Etude de formes apparentées et de modifications post-traductionnelles :*

Nous avons vu dans le cas du récepteur de la progestérone que le marquage d'affinité peut être associé à une digestion enzymatique suivie d'une analyse en électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) pour étudier deux formes d'un récepteur. Ces méthodes d'études ont également permis de mettre en évidence des homologues structurales entre les récepteurs de différentes provenances. Ainsi le profil en PAGE obtenu après protéolyse limitée des ER humain et de rate révèle des similitudes entre les deux récepteurs et entre les formes nucléaires et cytosoliques (Katzenellenbogen *et al.*, 1987). Comme pour ces récepteurs, la digestion enzymatique ménagée du complexe ligand-ER porcin fournit un fragment de 30 kDa résistant aux protéases, appelé méro-récepteur (Koike *et al.*, 1987). Ce fragment résistant est également obtenu pour le PR et le GR.

Dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes, des homologies structurales ont pu être établies entre les récepteurs de différentes provenances : cellules normales ou transformées. Mais en aucun cas, cette méthode ne permet de détecter une petite délétion ou insertion, ni un changement d'acide aminé localisé à distance d'un site de coupure (Reichman *et al.*, 1984).

Certaines équipes ont également eu recours au marquage d'affinité en association avec l'électrophorèse bidimensionnelle pour étudier les modifications post-traductionnelles du récepteur des glucocorticoïdes. Harmon *et al.* (1989) ont pu montrer que le GR, avant ou après activation, présente deux formes de points isoélectriques 5,7 et 6-6,5. Seule cette dernière forme est capable de lier l'ADN. L'hétérogénéité de la charge responsable de l'existence de deux formes a été localisée dans un fragment tryptique dérivant du domaine de liaison au ligand.

#### γ) Localisation du marquage et identification de l'acide aminé modifié :

Il a été plus ou moins facile de déterminer l'acide aminé marqué par ces différents dérivés d'affinité. Cela a pu être réalisé avec succès dans le cas des récepteurs des glucocorticoïdes, des oestrogènes et de la progestérone.

L'analyse des peptides obtenus après protéolyse des ER alkylés par TAZ a permis de situer le marquage à l'extrémité C-terminale au niveau d'une zone très conservée parmi les ER de différentes espèces (Ratajczak *et al.*, 1989). L'acide aminé, site d'attachement du marqueur, a ensuite été localisé grâce aux travaux de l'équipe de Katzenellenbogen, au niveau de la cystéine 530 du RE humain. Cette cystéine est également alkylée par un marqueur d'affinité à activité agoniste : le kétonestrol aziridine. La différence d'activité des deux composés n'est donc pas due à un marquage différentiel d'acides aminés dans le domaine E (Harlow *et al.*, 1989).

En ce qui concerne le marquage du site de liaison du GR, la mise en évidence d'une inhibition de la réaction du mésylate de dexaméthasone par le MMTS suggérait que la liaison covalente implique au moins un résidu cystéinyl du site de liaison (Simons, 1987). La cystéine 656 du GR d'hépatome de rat fut le premier site de marquage identifié (Simons *et al.*, 1987). Puis Smith *et al.* (1988) ont montré que le mésylate de dexaméthasone alkyle la cystéine 644 du GR de souris (qui correspond à la Cys 656 du GR de rat). Au contraire de ce marqueur d'affinité, le mésylate de cortivazole est incapable de se lier de manière covalente au récepteur (Lamontagne *et al.*, 1984). Le cortivazole possède un groupement substituant de type phénylpyrazole au niveau du noyau aromatique A et possède une activité

glucocorticoïde plus puissante que le cortisol. L'encombrement induit par ce substituant implique un positionnement différent pour le cortivazole dans le site actif, qui se traduit par l'absence de marquage d'affinité.

L'acétonide de triamcinolone alkyle la méthionine 622 et la cystéine 754 du GR de foie de rat purifié : le repliement du domaine E place donc ces deux acides aminés à proximité (Carlstedt-Duke *et al.*, 1988). Ces deux résidus sont également le site de marquage par un dérivé de la progestérone, la promégestone (la sélectivité n'est pas absolue entre les récepteurs stéroïdiens) (Strömstedt *et al.*, 1990).

Pour le PR, les dérivés  $16\alpha$ - et  $11\alpha$ -bromoacétoxy progestérone ont permis de préciser la nature des acides aminés impliqués dans la liaison covalente. Le dérivé  $11\alpha$  alkyle la position 1 d'une histidine et le dérivé  $16\alpha$  alkyle la position 3 d'une histidine et une méthionine mais les résidus concernés n'ont pas été identifiés (Holmes et Smith, 1983). Le marqueur de photoaffinité, promégestone, alkyle les méthionines 759 et 909 du PR humain. Les méthionines 759 du PR et 622 du GR de rat sont équivalentes, au contraire des méthionine 909 et cystéine 754. Ces différences de marquage peuvent traduire des différences subtiles dans l'interaction du ligand avec les deux récepteurs mais importantes pour la spécificité biologique (Strömstedt *et al.*, 1990).

#### d) Le marquage d'affinité des RAR :

Un seul dérivé est proposé pour le marquage d'affinité des RAR. La caractérisation du récepteur marqué, sa purification et la localisation du site de marquage n'ont pas été réalisées. Il s'agit d'un dérivé rétinobenzoinique marqueur de photoaffinité fluorescent de RAR : ADAM-3, synthétisé par l'équipe de Schudo (Fig. 20). La constante d'association de ce composé pour RAR $\alpha$  est de l'ordre de  $10^6$  M<sup>-1</sup> (Shimazawa *et al.*, 1991).

### **3) La mutagenèse dirigée :**

La mutagenèse dirigée est utilisée selon diverses modalités. La réalisation de délétions plus ou moins importantes permet de définir la taille minimale du domaine de liaison. L'insertion d'acides aminés supplémentaires en divers endroits de la séquence introduit une modification plus ou moins importante de la conformation du site de liaison. En fait, la méthode de choix est la mutagenèse ponctuelle avec substitution d'un seul acide aminé par un autre de nature différente, de taille inférieure et susceptible de ne pas entraîner de modification majeure de la conformation du site de liaison. Si cet acide aminé est réellement essentiel à la liaison, sa mutation entraînera

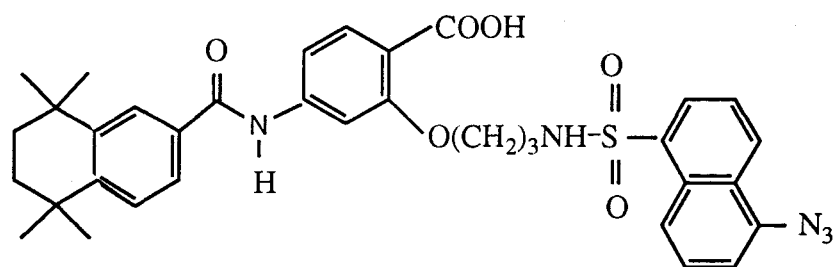


Fig. 20: Marqueur de photoaffinité de RAR $\alpha$ : ADAM-3.

une chute importante de l'affinité pour le ligand. Au contraire, s'il est situé hors du site actif, ou même dans celui-ci mais en ne contractant que peu ou pas d'interactions avec le ligand, ou encore si cette interaction ne rend compte que d'une modeste partie de l'énergie de liaison ligand-récepteur, la mutation n'aura pas d'effet perceptible sur l'affinité.

Dès le clonage des gènes codant les récepteurs stéroïdiens, des délétions et des mutations ponctuelles ont été réalisées pour délimiter les régions responsables des différentes fonctions de ces facteurs de transcription ligand-dépendants. Elles ont également été effectuées en vue de déterminer les exigences structurales d'une haute affinité récepteur-ligand et d'élucider le mécanisme de la discrimination entre un agoniste et un antagoniste.

#### a) Délimitation du domaine E :

Plusieurs études mettent en évidence la sensibilité d'un domaine entier aux mutations, quelles qu'elles soient. Ainsi, les insertions d'acides aminés dans la séquence du récepteur des glucocorticoïdes affectent la liaison du stéroïde si elles touchent l'extrémité C-terminale de la protéine (Giguère *et al.*, 1986). Les travaux de Godowski *et al.* (1987) tendent à délimiter le domaine E de hGR. Le fragment 407-795 lie le stéroïde comme le récepteur naturel. La délétion des 29 résidus C-terminaux (407-766) provoque une réduction de cent fois de l'affinité alors que la délétion des 140 acides aminés N-terminaux (547-795) diminue l'affinité de dix fois. Comme les mutations de l'acide glutamique 546 en glycine et de la tyrosine 770 en asparagine altèrent les propriétés de liaison du GR de souris, Danielsen *et al.* (1989) proposent qu'une large étendue de l'extrémité C-terminale est nécessaire à la capacité d'interaction du récepteur avec son ligand. Ceci est encore démontré par le fait qu'un fragment tryptique de 16 kDa dérivant de la moitié N-terminale du domaine E garde la capacité de lier le ligand (Simons *et al.*, 1989) alors que la phénylalanine 780 du GR de souris (qui comporte 783 résidus), localisée tout à fait en C-terminal, joue un rôle dans la spécificité et l'affinité de liaison (Chen *et al.*, 1994).

Kumar *et al.* (1986) montrent que l'intégrité du domaine comprenant les résidus 301 à 552 du récepteur des oestrogènes est indispensable pour la liaison de l'oestradiol.

La présence du domaine D ainsi que des huit derniers acides aminés du récepteur  $\beta$  des hormones thyroïdiennes humain apparaît essentielle à la fonctionnalité des mutants de délétion de ce récepteur fabriqués par Lin *et al.* (1991).



La délétion des huit résidus C-terminaux pourrait déstabiliser le domaine E ou éliminer des acides aminés responsables des contacts directs avec le ligand.

De même, alors que le c-erbA de poulet tronqué des domaines A, B et C lie l'hormone thyroïdienne T<sub>3</sub>, le mutant dépourvu des domaines A, B, C, D et des douze derniers acides aminés du domaine E ne lie plus son ligand (Horowitz *et al.*, 1989). Les résultats de cette équipe suggèrent que des acides aminés d'une zone différente du domaine E de c-erbA participent à la formation du site de liaison ou que celui-ci implique une structure tertiaire du domaine E altérée par la délétion d'acides aminés aux extrémités N- et C-terminales.

Des expériences similaires ont été réalisées sur les récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone. Le groupe de Katzenellenbogen rapporte que le mutant bHBD (fragment 302 à 595, domaines E et F uniquement) présente une affinité légèrement plus faible que le récepteur aux oestrogènes normal et conserve la même spécificité (Wooge *et al.*, 1992). En ce qui concerne le récepteur à la progestérone, l'intégrité du fragment 420-659 est nécessaire au maintien de la protéine dans une conformation capable de lier l'hormone. Les 42 acides aminés à l'extrémité C-terminale peuvent donc être tronqués sans perturber la capacité de lier le ligand (Dobson *et al.*, 1989).

#### b) Détermination d'acides aminés essentiels à la liaison du ligand :

L'implication des résidus cystéinyles dans l'interaction hormone-récepteur des glucocorticoïdes a été étudiée par mutagenèse dirigée. Le remplacement des cystéines 640 et 661 de ce récepteur par une sérine n'a qu'un effet mineur sur la fonctionnalité du récepteur. Le double mutant dans lequel une sérine prend la place des cystéines 656 et 661 conserve la même affinité pour la dexaméthasone que le récepteur naturel (Chakraborti *et al.*, 1992). De façon surprenante, la substitution de la cystéine 656 du GR de rat, par une sérine ou une glycine, génère des "supers" récepteurs. En effet, ces récepteurs présentent de meilleures affinité et spécificité que le récepteur normal (Chakraborti *et al.*, 1991).

Cependant, la substitution de la cystéine correspondant à la cystéine 638 de hGR par un tryptophane chez le cobaye est en partie responsable de la diminution de l'affinité de ce récepteur pour la dexaméthasone et confère une activité transactivatrice constitutive (Keightley et Fuller, 1994).

Les résidus cystéines du récepteur des oestrogènes sont également le centre d'intérêt de nombreux travaux. Les cystéines 381, 417, 447 et 530 peuvent être substituées individuellement par des alanines sans que cela modifie l'affinité de ce récepteur pour l'oestradiol. La mutation du résidu 530, qui est le site d'attachement

des aziridines (agoniste ou antagoniste), par une alanine ou une sérine n'abolit pas le marquage d'affinité mais le déplace alors vers le résidu cystéinyl 381. Ces deux cystéines, éloignées dans la structure primaire, sont probablement très proches dans la poche qui accueille le ligand (Reese *et al.*, 1992). Le tamoxifène aziridine présente une activité antagoniste moins efficace quand il est lié à la cystéine 381. Alors que les mutations de la cystéine 530 confèrent des propriétés transactivatrices différentes en présence des dérivés aziridines par rapport au récepteur naturel, elles ne modifient pas l'effet des ligands à liaison réversible (Reese et Katzenellenbogen, 1991).

Alors que les mutations des cystéines n'ont pas d'effet sur l'activité de liaison, les mutations de l'isoleucine 518 et de la glycine 525 du mER en acide aspartique (positions correspondantes du récepteur humain : 514 et 521) provoquent une diminution de l'activité de liaison de l'oestradiol (Fawell *et al.*, 1990).

Le RU486, antagoniste du PR, est actif chez l'homme mais pas chez le poulet ou le hamster. La substitution de la cystéine 575 du PR de poulet par une glycine confère une sensibilité à l'antagoniste. En fait, tous les récepteurs capables de lier le RU486 possèdent une glycine en cette position (Gly 722 du PR humain). L'absence de chaîne latérale à cet endroit est indispensable pour permettre l'interaction avec un ligand possédant un groupe volumineux en 11- $\beta$  (Benhamou *et al.*, 1992).

### c) Détermination de régions indispensables à l'activation transcriptionnelle :

Dans certains cas, la mutagenèse dirigée permet de découpler deux des fonctions localisées dans le domaine E : la liaison du ligand et l'activation transcriptionnelle hormono-dépendante. Cette dernière activité, située au niveau de la zone TAF2 décrite par Forman et Samuels (1990) peut être altérée par les mutations sans que la capacité de lier le stéroïde soit modifiée.

Ainsi les mutants L540Q (dans lequel la leucine 540 est remplacée par une glutamine) et S554fs (décalage du cadre de lecture pour les 21 derniers acides aminés) de hER présentent une affinité identique au récepteur naturel vis-à-vis de l'oestradiol mais ne conservent pas la capacité de transactivation (Ince *et al.*, 1993).

Danielian *et al.* (1992) mettent en évidence l'importance d'une séquence de la région C-terminale conservée parmi un grand nombre de récepteurs nucléaires, impliquée dans la transactivation. La mutation ponctuelle d'acides aminés hydrophobes ou chargés, conservés dans cette région située entre les résidus 538 à 552 du récepteur des oestrogènes de souris, diminue fortement l'activation transcriptionnelle ligand-dépendante sans affecter la liaison du ligand.

Saatcioglu *et al.* (1993) montrent que les substitutions simples (F403P) ou doubles (E401K/E404K ou E401V/E404V) d'acides aminés situés dans la région

correspondante de c-erbA $\alpha$  abolissent la capacité de transactivation en diminuant légèrement la liaison du ligand.

#### d) Discrimination agoniste/antagoniste :

Parfois, les mutations ont des conséquences différentes sur l'activité de liaison selon la nature, agoniste ou antagoniste, du ligand. Ainsi le mutant K531stop de hER répond normalement à l'antagoniste hydroxy-tamoxifène alors qu'il présente une affinité réduite pour l'oestradiol qui l'active faiblement. Les 64 derniers acides aminés de ce récepteur porteraient une information nécessaire à la réponse agoniste mais pas antagoniste (Wrenn et Katzenellenbogen, 1993).

Vegeto *et al.* (1992) ont observé le même phénomène avec un mutant de hPR. En effet, le récepteur tronqué des 42 acides aminés C-terminaux conserve la capacité de lier l'antagoniste RU486 mais pas les agonistes, progestérone et R5020. De plus, l'effet pharmacologique du RU486 est modifié, il active le récepteur mutant. L'extrémité C-terminale est donc requise pour la liaison des agonistes et non pas des antagonistes. Elle est de plus nécessaire à l'expression de l'activité antagoniste du RU486.

De nombreux anti-oestrogènes se caractérisent par la présence d'une chaîne latérale encombrante avec une fonction basique ou polaire. Cette fonction peut interagir avec les acides aminés chargés ou polaires situés près du site de liaison. Pakdel et Katzenellenbogen (1992) sondent ces interactions en mutant les résidus chargés à proximité de la cystéine 530 du hER. Ce résidu est le site d'attachement de l'aziridine qui se trouve sur une chaîne latérale du ligand. Les mutations simultanées des lysines 529 et 531 en glutamine associées ou non à la substitution de l'asparagine 532 en acide aspartique réduisent l'affinité pour l'agoniste de 5 à 10 fois sans affecter celle de l'anti-oestrogène. Ces substitutions diminuent le pouvoir transcriptionnel d'une molécule agoniste et augmente la sensibilité du récepteur vis-à-vis des antagonistes. Si les mutations concernent des résidus plus éloignés (523 ou 538), aucune modification de l'activité de liaison n'apparaît.

Les acides aminés localisés près de la cystéine 530 sont donc impliqués dans la discrimination agoniste-antagoniste. Cette discrimination est basée sur l'encombrement stérique du ligand et non sur sa charge. Comme l'antagoniste est plus volumineux que l'agoniste, la poche de liaison peut être trop exigüe. Les substitutions conduisent à des interactions moins productives pour les agonistes et plus favorables pour les antagonistes.

### e) La mutagenèse dirigée des RAR et RXR :

La mutagenèse dirigée réalisée sur les RAR consiste essentiellement en des délétions de l'extrémité C-terminale afin de créer des récepteurs à activité inhibitrice dominante. Ces délétions touchent une région très conservée entre TR et les RAR (53 % d'homologie) et qui contient une hélice  $\alpha$  amphipatique impliquée dans la transactivation. La délétion de 9 acides aminés dans cette région est responsable de l'effet inhibiteur de v-erbA (Damm *et al.*, 1989). La délétion de la région correspondante de RAR $\alpha$  convertit l'activité positive hormono-dépendante en une activité répressive constitutive de la transcription (Saatcioglu *et al.*, 1993).

Le RAR $\alpha$ 403, tronqué des 59 acides aminés C-terminaux, présente une activité négative dominante et son expression inhibe la différenciation des HL-60 induite par l'acide rétinoïque et altère le développement d'une lignée hématopoïétique multipotente (Tsai *et al.*, 1992). Il bloque la différenciation des neutrophiles au stade promyélocytes (Tsai et Collins, 1993). Ce mutant induit également des malformations crânio-faciales chez des souris transgéniques, similaires aux effets tératogènes associés à l'administration d'acide rétinoïque (Damm *et al.*, 1993).

Les mutants RAR $\beta$ 387 et RAR $\gamma$ 406 (délétion des 61 et 48 derniers résidus, respectivement) se comportent également comme v-erbA. Alors que RAR $\beta$ 387 n'inhibe que l'activité de l'analogue normal RAR $\beta$ ,  $\alpha$ 403 et  $\gamma$ 406 sont des inhibiteurs efficaces de l'activité des trois formes de RAR (Damm *et al.*, 1993).

Alors que le RAR $\beta$  tronqué des derniers 39 acides aminés présente une activité normale, la délétion de 25 résidus supplémentaires lui confère une activité dominante négative. Le récepteur tronqué des 78 derniers résidus, quant à lui, est un compétiteur négatif (Shen *et al.*, 1993).

Des mutations ponctuelles peuvent conférer une activité inhibitrice dominante. C'est le cas des mutants RAR $\alpha$ G303E et RAR $\alpha$ Q296H correspondant respectivement aux TR $\beta$ G342E et TR $\beta$ Q335H associés à des cas de résistance généralisée aux hormones thyroïdiennes et dont nous reparlerons plus tard. Comme pour les TR $\beta$  mutants, les variants de RAR $\alpha$  doivent dimériser pour exercer leur effet inhibiteur (Saitou *et al.*, 1994). L'activité de liaison du premier mutant est diminuée, au contraire du second. Cela peut être dû au changement de polarité apporté par la substitution plus important dans le premier cas.

La substitution simultanée des arginine 269 et lysine 220 du RAR $\beta$  provoque une diminution très importante de l'activité de liaison de l'acide rétinoïque tout-trans, alors que la mutation d'un seul des deux résidus n'a qu'une faible incidence. Le double mutant présente également une activité inhibitrice dominante, dépendante de la concentration en ligand (Tairis *et al.*, 1994).

Les travaux de Tate *et al.* (1994) permettent de délimiter une frontière de TAF2 de RAR $\alpha$  et montrent que cette région de quinze résidus chevauche une séquence essentielle pour la liaison de l'acide 9-cis rétinolique au contraire de l'isomère tout-trans. En effet, contrairement au récepteur tronqué des 43 acides aminés C-terminaux (RAR $\alpha$  $\Delta$ 419), le récepteur tronqué des 58 derniers résidus (RAR $\alpha$  $\Delta$ 404) a perdu la capacité de lier l'isomère 9-cis et de transactiver. RAR $\alpha$  $\Delta$ 404 conserve une bonne affinité pour l'acide tout-trans rétinolique.

Les études de mutagenèse dirigée des RXR ont été réalisées en vue d'étudier les processus d'homo- et d'hétérodimérisation. Des délétions de l'extrémité C-terminale des RXR ont d'abord montré que cette région du domaine E est impliquée dans les phénomènes de dimérisation (Leid *et al.*, 1992b ; Marks *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 1992a).

Le groupe de Pfahl montre que la région comprise entre les résidus 433 et 443 de RXR $\alpha$  est nécessaire à la formation d'homodimères et non d'hétérodimères. Le RXR tronqué des 29 derniers acides aminés ne peut former d'homodimères mais il garde la capacité d'hétérodimériser. Le récepteur tronqué des 49 acides aminés C-terminaux ne peut pas former d'homodimères ni d'hétérodimères avec RAR $\beta$  ou TR, mais il peut dimériser avec le RXR $\alpha$  sauvage (non tronqué) et inhiber son activité transcriptionnelle. Le mutant L422Q homodimérise en absence d'acide 9-cis rétinolique. Ce phénomène est inhibé en présence du ligand. Le mutant L430F forme des homodimères en absence d'acide 9-cis rétinolique, il peut également dimériser avec RXR $\alpha$ . Ces deux caractéristiques peuvent expliquer l'effet inhibiteur dominant de ce mutant (Zhang *et al.*, 1994).

#### 4) Les récepteurs déficients :

La résistance ou l'insensibilité à une hormone est généralement associée à l'expression de récepteurs mutants. Certaines cellules tumorales expriment également une forme variante de récepteur stéroïdien. Les mutations ponctuelles et les délétions peuvent toucher l'un ou l'autre des domaines fonctionnels du récepteur. Dans cette revue, nous nous focaliserons sur les mutations qui altèrent le domaine de liaison au ligand. Nous verrons que de nombreuses mutations entraînent une perte plus ou moins importante de l'activité de liaison de l'hormone. Mais l'activité de liaison du stéroïde n'est pas un indicateur adéquat de fonctionnalité car certains mutants sont capables de lier l'hormone mais ne sont pas fonctionnels, alors que d'autres ne lient pas le ligand mais sont constitutivement actifs. Nous observerons donc l'effet des mutations sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Nous verrons également que

les mutants sont parfois moins spécifiques que les récepteurs normaux ou répondent différemment aux antagonistes.

a) Perte plus ou moins complète de l'activité de liaison :

*α) Activité transcriptionnelle nulle :*

Chez certains individus atteints de rachitisme résistant à la vitamine D<sub>3</sub>, le gène du récepteur de cette vitamine comporte une mutation d'une base nucléotidique qui convertit le codon de la tyrosine 292 en codon de terminaison. Le récepteur tronqué des 132 acides aminés C-terminaux ne présente aucune activité fonctionnelle (Ritchie *et al.*, 1989 ; Malloy *et al.*, 1990).

Trois mutants de délétion du récepteur des oestrogènes ont été identifiés dans les cellules tumorales T47D<sub>CO</sub>. Deux protéines sont tronquées à partir du résidu 250 ou 417, elles sont donc tronquées des domaines D et E/F ou d'une partie du domaine E et de la région F, selon le cas. Le troisième variant est tronqué de 153 acides aminés au niveau du domaine D et de l'extrémité N-terminale du domaine E (Graham *et al.*, 1990).

Des mutations ponctuelles dans le domaine E du récepteur aux androgènes ont été identifiées dans deux types de pathologie : le cancer de la prostate et les syndromes d'insensibilité partielle ou complète aux androgènes. Chez certains sujets porteurs de ce syndrome, le remplacement de l'une des arginines 774 et 831 (ou 772 et 829 selon l'ADNc de référence) par une cystéine ou une glutamine, respectivement (Brown *et al.*, 1990), ou de la méthionine 786 par une valine (Nakao *et al.*, 1992) abolit ou diminue fortement la liaison de l'hormone et inactive la protéine.

Pour le récepteur des glucocorticoïdes, trois mutations responsables de son inactivation ont été identifiées. Il s'agit des substitutions des résidus 546 et 742 chez la souris et 641 chez l'homme. Le mutant E546G (acide glutamique 546 remplacé par une glycine), caractérisé dans les cellules S49 nt- (déficientes en transfert nucléaire) et le mutant C742G, découvert dans une lignée de lymphome, ne présentent aucune activité de liaison (Danielsen *et al.*, 1986 ; Byravan *et al.*, 1991). La substitution de l'acide aspartique 641 par une alanine, identifiée chez des patients atteints de résistance aux glucocorticoïdes provoque une diminution de trois fois de l'affinité de liaison mais inhibe totalement l'activité transcriptionnelle. Ceci suggère que la résistance aux glucocorticoïdes chez ces patients peut être corrélée à la présence de

cette mutation ponctuelle et que l'acide aspartique 641 est essentiel à l'activité du récepteur (Hurley *et al.*, 1991).

β) *Activité transcriptionnelle réduite* :

De nombreuses mutations ponctuelles provoquent une diminution de l'activité de liaison du ligand. Les récepteurs mutants nécessitent alors des concentrations beaucoup plus élevées pour être transcriptionnellement actifs. Ces concentrations peuvent dépasser les taux physiologiques des différentes hormones ; dans ce cas, le récepteur ne conserve aucune fonctionnalité *in vivo* mais présente une activité *in vitro*.

Le récepteur des glucocorticoïdes dont la tyrosine 770 est remplacée par une asparagine nécessite des concentrations 4 fois plus élevées que le récepteur normal pour être actif. La substitution de la proline 547 par une alanine, qui provoque certainement des modifications plus importantes dans le repliement de la protéine, affecte également plus fortement l'activité transcriptionnelle qui requiert alors des concentrations 100 fois plus élevées (Byravan *et al.*, 1991).

En ce qui concerne le récepteur des androgènes, la substitution de la valine 864 par une méthionine ou une leucine, selon la forme complète ou partielle, respectivement, du syndrome d'insensibilité aux androgènes, provoque une diminution de l'affinité du récepteur pour les androgènes (Brown *et al.*, 1990 ; Kazemi-Esfarjani *et al.*, 1993 ; Lubahn *et al.*, 1989). L'activité transactivatrice de ces deux récepteurs mutants correspond au phénotype clinique, ainsi la fonctionnalité du mutant portant la méthionine est davantage altérée et correspond à la forme complète de l'insensibilité aux androgènes (Kazemi-Esfarjani *et al.*, 1993). Le mécanisme par lequel cette mutation peut abolir la transactivation sans affecter fortement la liaison du stéroïde n'est pas clair. Ce récepteur mutant n'est actif qu'à des concentrations supra-physiologiques (Brown *et al.*, 1990). La mutation peut modifier le processus d'une autre étape de la régulation. Kazemi-Esfarjani *et al.* soulignent que le remplacement de cette valine, localisée dans un domaine de dimérisation, par un autre résidu hydrophobe (Met ou Leu) ne devrait pas altérer le phénomène de dimérisation.

D'autres mutations ponctuelles ont été caractérisées par Mac Phaul *et al.* (1992), dont les études ont porté sur 22 sujets porteurs du syndrome d'insensibilité aux androgènes. Ils rapportent que 19 de ces mutations sont regroupées en deux régions représentant environ 35 % du domaine E, entre les acides aminés 726 à 772 et 826 à 864. Ces mutations et leur effet sur l'activité de liaison du récepteur sont

représentés dans la figure 21 (complétée par les mutations décrites plus haut). L'activité transcriptionnelle de ces mutants n'est pas décrite. Ces deux segments définissent vraisemblablement des régions importantes pour l'interaction récepteur-ligand.

La substitution de l'acide aspartique 686 du récepteur androgène par une histidine ou une asparagine modifie l'activité de liaison à l'hormone. Le premier récepteur mutant ne possède que 15 à 20% de la capacité de liaison du récepteur naturel. Le second présente une capacité normale mais la dissociation du ligand est beaucoup plus rapide. La diminution du pouvoir transcriptionnel est donc attribuée à une diminution de la demi-vie des complexes hormone-récepteur. Il est intéressant de noter que cet acide aspartique est conservé chez les PR, GR et MR (Ris-Stalpers *et al.*, 1991).

Dans le cas du remplacement de l'arginine 772 par une cystéine, Marcelli *et al.* (1991) proposent que la résistance complète aux androgènes résulte d'une diminution à la fois de la fonctionnalité du récepteur mutant et du taux d'ARN messager.

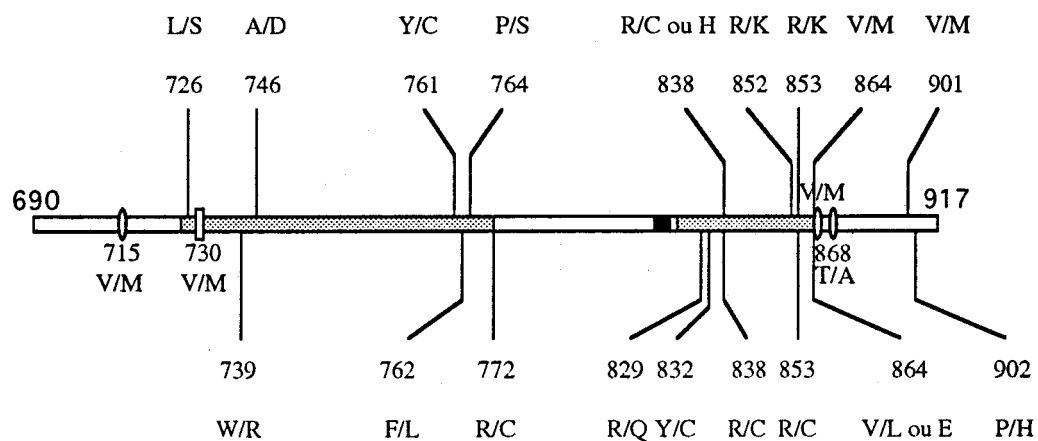
La substitution de l'arginine 734 par une glutamine est à l'origine de l'insensibilité aux androgènes chez le rat. Ce récepteur mutant ne garde que 10 à 15 % de la capacité de liaison du récepteur normal et présente une activité transcriptionnelle réduite (Yarbrough *et al.*, 1990). Cette arginine est très conservée chez les différents récepteurs stéroïdiens.

#### γ) *Activité transcriptionnelle constitutive :*

Certaines mutations peuvent conférer une activité constitutive aux récepteurs mutants. En effet, certaines lignées cellulaires de tumeurs du sein sont ER-/PR+, c'est-à-dire que la liaison des oestrogènes à leur récepteur ne peut être mise en évidence dans ces cellules ; par contre, le récepteur à la progestérone, dont l'expression est régulée par les oestrogènes, y est présent. Ceci suppose que ER existe sous une forme variante, incapable de lier son ligand mais transcriptionnellement active. L'ADNc d'un tel ER a été caractérisé par Fuqua *et al.* (1991) dans trois tumeurs du sein ER-/PR+. Cet ADNc est tronqué de la totalité de l'exon 5, au niveau du domaine E (délétion de 46 résidus).

Une activité constitutive est proposée, mais n'est pas démontrée, pour un mutant du récepteur des androgènes caractérisé chez un individu atteint d'une tumeur prostatique. La mutation porte sur le codon 730 (valine remplacée par une méthionine), situé dans la région de liaison de l'hsp90. Comme les mutations dans cette région du GR rendent le récepteur constitutivement actif, Newmark *et al.* (1992)





### Effets des mutations:

X/Y Acide aminé du récepteur normal/récepteur mutant

▮ Mutations associées au syndrome d'insensibilité aux androgènes. Les mutations qui affectent le plus fortement l'activité de liaison sont placées dans le bas du schéma.

▮ Activité transcriptionnelle constitutive

○ Modification de l'effet pharmacologique de certains antagonistes

■ Activité inhibitrice dominante

Fig. 21: Mutations touchant le domaine E du récepteur des androgènes

suggèrent que la mutation 730 puisse avoir les mêmes conséquences sur l'activité de AR.

#### δ) *Activité inhibitrice dominante :*

Une autre conséquence des mutations peut être une activité inhibitrice dominante du récepteur muté sur le récepteur normal. L'hypothèse d'une interférence de protéines mutantes avec la fonction du récepteur normal est émise pour le récepteur des oestrogènes. En effet, Murphy et Dotzlaw (1989) ont étudié l'expression de ER dans les tumeurs du sein ER+ résistantes à la thérapie hormonale et mis en évidence trois ARNm de 6,5 ; 3,8 et 2,4 kb. Les deux transcrits de plus faible taille sont détectés uniquement dans les biopsies contenant également l'ARN messenger normal de 6,5 kb et n'hybrident pas, ou très peu, avec un fragment d'ADNc correspondant au domaine E/F.

En criblant une banque d'ADN complémentaire de testicules humains, Govindan (1990) a isolé un ADNc du récepteur androgène dont quatre codons entre les résidus 816 à 822 diffèrent par rapport au normal. Ces mutations provoquent une diminution de l'affinité pour la dihydrotestostérone et de l'activité transcriptionnelle. De plus, dans un système de cotransfection, la protéine mutante influence l'efficacité transactivatrice du récepteur normal de façon négative.

De nombreux exemples d'activité inhibitrice dominante sont donnés par les mutations du récepteur thyroïdien associées à la résistance généralisée aux hormones thyroïdiennes (RGHT), syndrome dans lequel sont observés des taux élevés de T4 libre circulant et de TSH, ainsi qu'une résistance tissulaire à l'action des hormones thyroïdiennes.

La séquence du gène de hTR $\beta$ 1 a fait l'objet d'une correction portant sur cinq acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale du récepteur (Sakurai *et al.*, 1990). Deux numérotations différentes sont donc utilisées par les auteurs. Dans ce qui suit, afin d'éviter les répétitions et les erreurs, les codons seront numérotés en fonction de la première détermination de la séquence car elle est le plus souvent utilisée (Weinberger *et al.*, 1986).

Différentes mutations ponctuelles ont été identifiées au niveau du domaine de liaison au ligand de c-erbA $\beta$  chez des individus porteurs de cette maladie. Le codon 332 est tronqué dans un cas de RGHT (Usala *et al.*, 1991b), ce qui abolit l'activité de liaison. L'insertion d'une base au niveau des codons 443 ou 449 qui modifie le cadre de lecture pour les 15 ou 9 derniers acides aminés a été détectée dans deux familles atteintes de RGHT (Parrilla *et al.*, 1991 ; Takeda *et al.*, 1992). Une mutation dans le

codon 446 est responsable de la délétion des 16 résidus C-terminaux (Groenhout et Dorin, 1994). Pour la mutation 443, une diminution de l'activité de liaison a été mise en évidence.

Toutes les autres mutations associées à une RGHT sont des substitutions d'acides aminés résultant de la modification d'un nucléotide. Les premières études ont été réalisées sur un seul patient ou sur une famille d'individus atteints de RGHT. Ainsi, plusieurs équipes ont mis en évidence les mutations des codons 340 (Arg à la place de Gly, Sakurai *et al.*, 1989), 433 (une His remplace une Arg, Boothroyd *et al.*, 1991), 448 (Pro remplacée par His, Usala *et al.*, 1990a) et 335 (Gln est substituée par His, Usala *et al.*, 1991a).

En fait, l'étude associée de plusieurs familles par Parrilla *et al.* (1991), Takeda *et al.* (1992) et Weiss *et al.* (1993) montrent que trente huit mutations ponctuelles sont reliées à une RGHT et que la plupart des substitutions touchent la région L2 et le centre du domaine E au niveau des extrémités C-terminale de Ti et N-terminale du domaine de dimérisation. Les segments les plus touchés sont les régions 305-342 et 412-448. Il est très intéressant de noter que le segment 305-342 correspond au segment 726-772, particulièrement touché par les mutations associées au syndrome d'insensibilité aux androgènes (Mac Phaul *et al.*, 1992).

La figure 22 décrit les différentes mutations identifiées et leur localisation dans le domaine E de TR $\beta$ . Chaque fois que l'activité de liaison de ces récepteurs mutants a fait l'objet d'une étude, une diminution de cette activité a pu être mise en évidence, sauf pour la mutation 433.

Ces défauts génétiques touchent en général un seul allèle de TR $\beta$ . Il y a coexpression des formes mutée et sauvage avec inhibition de l'activité du récepteur normal. Ces récepteurs mutants appartiennent donc à la classe fonctionnelle des protéines à activité inhibitrice dominante comme v-ErbA (Damm *et al.*, 1989). En ce qui concerne la résistance aux hormones thyroïdiennes, l'activité inhibitrice dominante négative est démontrée pour les mutations des codons 332 (Usala *et al.*, 1991b), 340 et 448 (Sakurai *et al.*, 1990 ; Usala *et al.*, 1990b ; Chatterjee *et al.*, 1991 ; Yen *et al.*, 1992).

Comment les récepteurs mutés exercent-ils leur effet inhibiteur? Comme ils gardent la même capacité de lier les éléments de réponse que les récepteurs naturels, les homodimères mutants peuvent entrer en compétition avec les hétérodimères TR $\alpha$ /TR $\beta$  ou les homodimères des formes  $\alpha$  ou  $\beta$  pour la liaison à l'ADN. Ils peuvent également former des complexes inactifs avec la TRAP ("Thyroid Receptor Auxiliary Protein") ou d'autres facteurs de transcription.

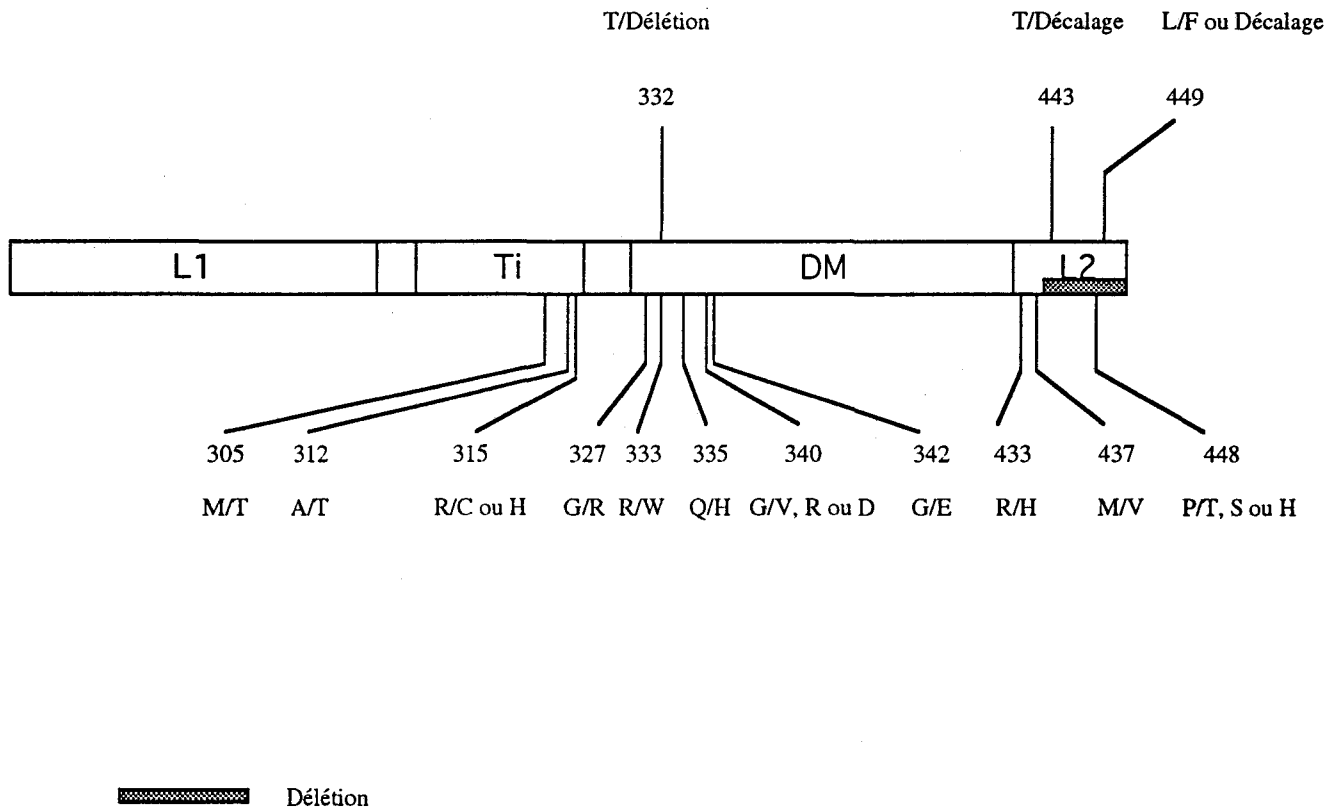


Fig. 22: Mutations associées à la résistance généralisée aux hormones thyroïdiennes.  
La numérotation correspond à la séquence de l'ADNc de Weinberger *et al.* (1986).

Nagaya et Jameson (1993) montrent que l'hétérodimérisation des récepteurs mutants est indispensable à leur effet inhibiteur dominant. En effet, les mutants associés à la résistance généralisée aux hormones thyroïdiennes, G340R et P448H, sont capables d'homodimériser et d'hétérodimériser avec RXR $\alpha$  et présentent un effet inhibiteur dominant. Par contre, la mutation artificielle L423R, qui touche une des heptades du domaine de dimérisation, inhibe la fonction d'hétérodimérisation (au contraire de l'homodimérisation) et ne confère pas d'activité inhibitrice dominante. Ceci explique sans doute qu'aucune mutation perturbant les heptades de dimérisation ne soit détectée car le mutant ne pourrait alors exercer son effet inhibiteur à l'origine de la pathologie.

#### b) Effet des mutations sur la spécificité :

Le remplacement d'un acide aminé par un autre peut modifier la spécificité de la liaison. Dans les cellules LNCaP de tumeur prostatique, la thréonine 868 du récepteur androgène est remplacée par une alanine. Ce changement ne modifie pas l'affinité pour les androgènes mais diminue la spécificité du récepteur. En effet, les progestagènes et l'oestradiol peuvent activer la transcription d'un gène régulé par le récepteur muté (Veldschote *et al.*, 1990).

Une autre mutation observée chez un individu atteint d'une tumeur prostatique met en jeu le codon 715, où une valine est remplacée par une méthionine (Culig *et al.*, 1993). Le rôle oncogénique de cette mutation n'est pas encore démontré. Ce mutant est moins spécifique que le récepteur normal puisque la transactivation induite par les androgènes surrénaliens et la progestérone est augmentée. Le codon 715 est situé dans une région très conservée des récepteurs stéroïdiens. Dans le sous-groupe du GR, seuls deux acides aminés entre les résidus 715 et 720 diffèrent.

La spécificité du récepteur des androgènes est également affectée lorsque la valine 864 est remplacée par une méthionine. L'affinité de ce récepteur mutant pour la progestérone est augmentée. Cette valine est parfois mutée en leucine. Il est intéressant de noter que le codon 864 correspond à une méthionine dans les GR et MR humains et une leucine dans les PR et ER humains (Lubahn *et al.*, 1989).

#### c) Effet des mutations sur l'activité des antagonistes :

Certaines mutations peuvent modifier les effets des antagonistes. Ainsi, Tora *et al.* (1989) ont mis en évidence une mutation ponctuelle au niveau de l'ADNc du récepteur des oestrogènes isolé à partir des cellules MCF-7. Cette mutation concerne la glycine 400, qui est remplacée par une valine, et modifie les propriétés de liaison de la protéine à 25 °C mais pas à 4 °C. Cette mutation change également l'effet

pharmacologique de l'anti-oestrogène tamoxifène. En effet, ce composé, qui présente une activité agoniste partielle envers le récepteur normal, stimule le récepteur mutant de façon agoniste pure (Jiang *et al.*, 1992).

D'autre part, certains anti-androgènes (Cyproterone acétate et anandron) possèdent une activité agoniste vis-à-vis du récepteur androgène portant la mutation T868A. Ce n'est pas le cas de l'anti-androgène ICI1766334 (Veldschote *et al.*, 1990 et 1992).

#### d) Les RAR mutants :

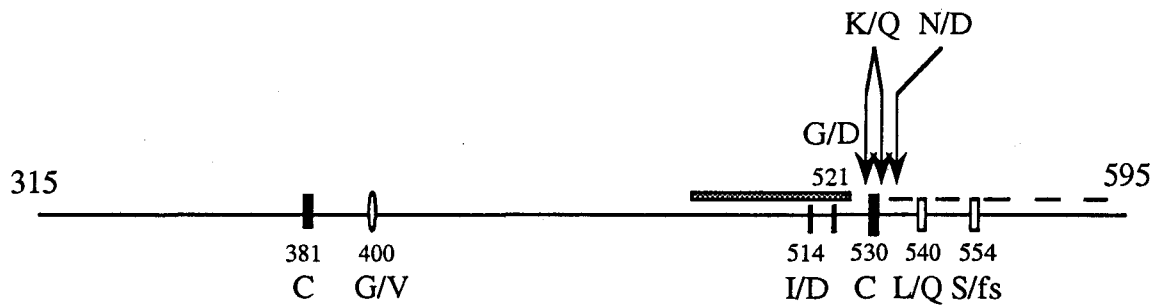
Deux RAR $\alpha$  mutants ont été caractérisés dans des lignées cellulaires en culture et devenues résistantes à l'acide rétinoïque : la lignée RAC65 dérivée des cellules P19, cellules de carcinome embryonnaire de souris, et la lignée HL-60R, cellules leucémiques promyélocytaires. La même mutation responsable de la résistance à l'acide rétinoïque a été caractérisée dans deux clones différents de la lignée HL-60 (Robertson *et al.*, 1990, Li *et al.*, 1994b), ce qui laisse supposer que cette mutation existe dans une faible sous-population de la lignée naturelle ou qu'elle est localisée en un "point chaud". Les récepteurs mutants sont tronqués des 71 ou 52 acides aminés C-terminaux, respectivement, et présentent une activité inhibitrice dominante (Pratt *et al.*, 1990 ; Robertson *et al.*, 1990). Le RAR $\alpha$ -RAC65 bloque la différenciation des cellules P19 dépendante de l'acide rétinoïque (Kruyt *et al.*, 1992) en inhibant l'induction de certains gènes Hox (Pratt *et al.*, 1993).

#### *Conclusion :*

Tous les résultats relatés ci-dessus et récapitulés dans les figures 21 à 25, montrent la complexité de l'étude de cette interaction. Il apparaît d'abord que l'intégrité d'un domaine très étendu est nécessaire à l'activité normale du récepteur. Il est difficile de définir des régions qui seraient plus importantes que d'autres. Ce domaine est impliqué dans d'autres fonctions que la fixation du ligand, telles que la dimérisation ou la transactivation. Une modification mineure de l'activité de liaison peut entraîner un déficit important de l'activité transcriptionnelle ou être accompagnée d'une modification en une activité constitutive ou inhibitrice dominante.

Les acides aminés supposés essentiels sont nombreux, de nature différente (acide, basique, neutre) et répartis sur toute la séquence du domaine E. Ces résultats ne montrent pas très bien si ces résidus agissent dans l'interaction d'une façon :

- directe, c'est-à-dire en développant des interactions avec le ligand lui-même ;



■ Marquage d'affinité

Effets des mutations:

■ affecte la liaison agoniste

□ abolit la transactivation sans affecter la liaison

○ modifie l'effet pharmacologique de l'antagoniste

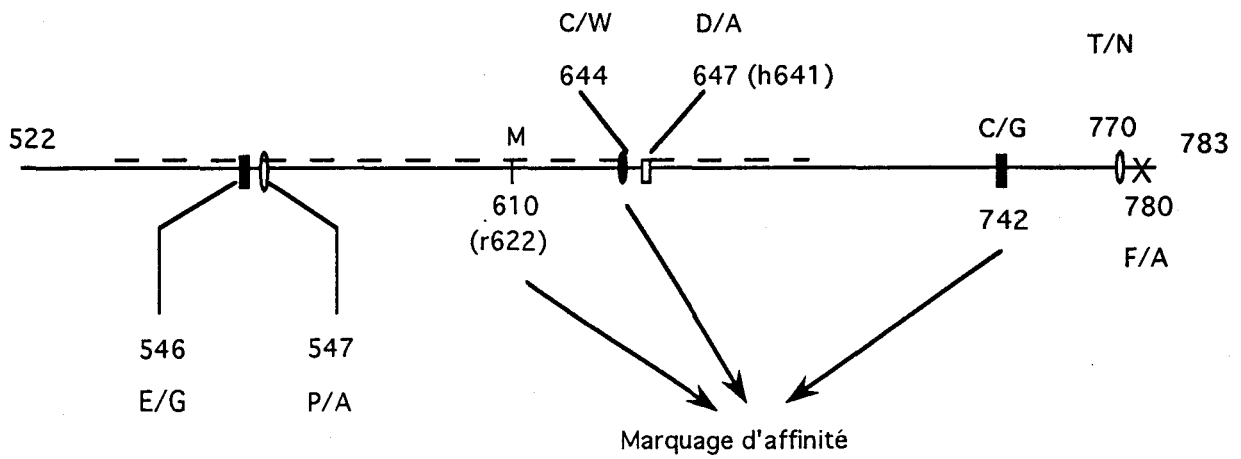
↓ Mutations ponctuelles

ou affectant la liaison agoniste au contraire de l'antagoniste

--- Déletion

■■■■■■■■■■ Déletion entraînant une activité constitutive

Fig. 23: Domaine E de hER: Résultats des études de marquage d'affinité et des récepteurs mutants.



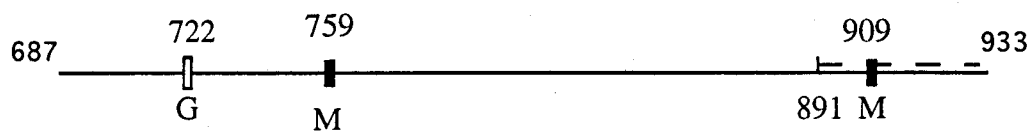
— — — Fragment protéolytique de 16 kDa capable de fixer la dexaméthasone

#### Effets des mutations:

- X/Y Acide aminé du récepteur normal/récepteur mutant
- █ Abolition de l'activité de liaison et de la transactivation
  - ▣ Diminution de l'activité de liaison et abolition de la transactivation
  - ◊ Diminution de l'activité de liaison et de la transactivation
  - X Diminution de la spécificité et de l'affinité
  - Activité constitutive

Fig. 24: Résultats des différentes études du GR. La séquence correspond au GR de souris. La numérotation correspondant au GR humain (h) ou de rat (r) est précisée.





- Marquage d'affinité
- Indispensable à la sensibilité au RU486.
- — — Délétion entraînant l'inhibition de la liaison agoniste et l'inversion de l'effet pharmacologique des antagonistes.

Fig. 25: Résultats du marquage d'affinité et des mutations du domaine E du récepteur humain de la progestérone.

- ou indirecte, soit en développant entre eux des interactions favorisant alors une certaine conformation du site qui faciliterait l'entrée du stéroïde et sa fixation, soit en évitant d'encombrer à certains endroits le site, de taille à peine supérieure au ligand, par un groupement trop volumineux.

Il faut également prendre en compte le fait que l'affinité de la liaison récepteur-ligand est la résultante d'une somme d'interactions dans laquelle chaque acide aminé essentiel du site actif n'intervient que pour une part. L'importance relative de cette part détermine le caractère essentiel du résidu concerné et peut expliquer la discordance apparente des résultats des expériences de modifications chimiques avec les données de la mutagenèse dirigée. Il ne faut pas oublier en effet que la modification chimique d'un résidu entraîne non seulement la formation de nouvelles liaisons avec le ligand mais qu'elle génère aussi un encombrement stérique du site qui peut empêcher la fixation du ligand. Cette alkylation peut gêner le positionnement du ligand dans le site de liaison sans que la cystéine elle-même soit nécessaire à l'interaction, en modifiant les interactions avec les acides aminés situés à proximité du résidu alkylé. De plus, tous les groupements thiols peuvent être alkylés, l'encombrement stérique résultant de l'alkylation par un réactif de taille relativement élevée, comme le DTNB, entraîne certainement une modification très importante du site de liaison. La diminution de l'activité de liaison qui en résulte alors, ne reflète pas forcément l'importance des cystéines dans l'interaction récepteur-ligand.

La méthode basée sur l'utilisation de réactifs spécifiques d'acides aminés peut paraître archaïque à côté de la mutagenèse dirigée, technique plus récente. Les réactifs spécifiques sont pourtant très utiles en première intention dans le cas de la découverte d'un nouveau récepteur ou enzyme pour déterminer l'importance d'un acide aminé dans l'interaction avec le ligand ou le substrat. La mutagenèse dirigée sera utilisée ensuite pour confirmer, ou non, les résultats obtenus et identifier les acides aminés impliqués. Les données des méthodes chimiques et de la mutagenèse dirigée doivent donc être considérées comme complémentaires et interprétées en tenant compte des limites de chacune d'elles.

De nombreux récepteurs naturels déficients procurent de très bons exemples de mutations ponctuelles dont les conséquences sur l'activité du récepteur sont importantes. Alors que la mutagenèse dirigée consiste en la substitution d'un acide aminé par un autre plus petit et neutre, les mutations associées à une pathologie mettent très souvent en jeu le remplacement d'un résidu par un autre plus encombrant, de polarité différente ou porteur d'un groupement thiol. La modification de la séquence primaire du site de liaison peut modifier de façon très importante sa structure spatiale. La substitution d'un acide aminé par un autre peut donc entraîner une diminution de l'activité de liaison sans qu'il soit directement impliqué dans

l'interaction. On peut donc très rarement conclure au caractère indispensable d'un acide aminé.

### 5) *Les études physico-chimiques :*

Alors que la structure tridimensionnelle du domaine C des récepteurs nucléaires est bien décrite, la détermination de la structure tertiaire du domaine de liaison au ligand nécessite encore de nombreuses investigations. Les difficultés rencontrées pour la cristallisation de ce domaine ne permettent pas de concrétiser les informations, apportées par les études biochimiques et les mutations, sur les acides aminés impliqués dans l'interaction récepteur-ligand. Après avoir vu les quelques données disponibles sur la physico-chimie du domaine E des récepteurs nucléaires, nous nous proposons de résumer les connaissances sur la structure tridimensionnelle mieux connue des protéines de liaison du rétinol et de ses dérivés.

#### a) La structure tridimensionnelle du site de liaison des récepteurs nucléaires :

Les différentes approches utilisées pour la définition de la structure dans l'espace du domaine de liaison au ligand des récepteurs nucléaires aboutissent à la proposition de modèles différents. Le groupe de Mornon utilise la méthode d'analyse des groupes hydrophobes (HCA pour "Hydrophobic Cluster Analysis") qui permet de prédire la structure tridimensionnelle d'une protéine selon la répartition de résidus hydrophobes impliqués dans la formation d'hélices  $\alpha$  ou de feuillets  $\beta$ . Cette équipe propose que la structure tridimensionnelle des récepteurs stéroïdiens présente 80 % d'homologie, il en est de même pour le sous-groupe RAR-TR-VDR. La structure tridimensionnelle de ER ne partagerait que 75 % d'homologie avec les récepteurs stéroïdiens (Mornon *et al.*, 1989). Ils proposent ensuite un modèle tridimensionnel du domaine de liaison au ligand des récepteurs stéroïdiens basé sur la structure tridimensionnelle de l' $\alpha_1$ -antitrypsine et de l'ovalbumine déterminée par diffraction des rayons X (Lemesle-Varloot *et al.*, 1992). Leur modèle révèle deux sites de liaison potentiels des stéroïdes.

Goldstein *et al.* (1993) utilise également une méthode basée sur la recherche d'homologies structurales entre le domaine E des récepteurs nucléaires et un ensemble de protéines de structure connue. Ils mettent en évidence des similitudes avec des protéases à sérine de type subtilisine. Le modèle proposé est un modèle de type  $\alpha/\beta$  consistant en un feuillet ouvert flanqué d'hélices  $\alpha$ .

Mac Phie *et al.* (1993) rejettent ce modèle et s'appuient sur des analyses en dichroïsme circulaire pour proposer une structure de type tonneau  $\alpha/\beta$  pour le domaine E de hTR $\beta$ 1. Ce modèle est constitué de huit feuillets  $\beta$  parallèles et huit hélices  $\alpha$ . Cette méthode d'analyse leur permet de corrélérer la perte d'une structure secondaire coopérative induite par la délétion du domaine D ou des huit acides aminés C-terminaux de hTR $\beta$ 1 avec l'incapacité des mutants de lier le ligand.

Cette équipe combine ensuite deux approches, l'utilisation d'analogues structuraux du ligand et de récepteurs mutants, pour moduler les interactions intermoléculaires et ainsi comprendre la nature du site de liaison de l'hormone thyroïdienne. L'hormone s'étendrait dans une cavité du tonneau (Fig. 26). La chaîne alanine de l'hormone serait ancrée via des interactions ioniques à la boucle 4. Le cycle phényle s'étendrait le long de la face amino-terminale du tonneau et le cycle phénoxy pointerait vers le bas et interagirait avec le feuillet 8 de la face carboxy-terminale. Les boucles 1 et 7, situées sur la même face que le domaine de liaison à l'ADN, se replieraient sur le haut du tonneau vers l'hormone. Ce repliement constituerait le signal du changement de conformation induit par la liaison de T<sub>3</sub> (Cheng *et al.*, 1994).

Tout récemment, Mac Grath *et al.* (1994) ont réussi à cristalliser le domaine E du TR associé à son ligand mais n'ont pas encore décrit sa structure tridimensionnelle.

#### b) La structure tridimensionnelle du site de liaison des protéines de liaison :

L'acide rétinoïque et son précurseur, le rétinol, se lient à des protéines sériques ou cellulaires spécifiques : RBP ("Retinol Binding Protein"), CRBP et CRABP. La faible masse moléculaire de ces protéines de liaison facilite l'obtention de cristaux et permet de déterminer leur structure tridimensionnelle.

RBP, CRABP et CRBP appartiennent à la famille des calicynes. Celles-ci assurent la reconnaissance et le transport des molécules hydrophobes. Deux grandes catégories sont décrites à ce jour : les protéines fixant les acides gras (les FABP : "Fatty Acid Binding Protein") et les lipocalines.

Les lipocalines, dont le chef de file est la RBP, possèdent une structure très particulière : huit feuillets  $\beta$  successifs, disposés tête bêche, forment deux parois d'un cône tronqué et aplati. Deux entrées/sorties sont possibles, mais l'une d'elles est bloquée par cinq cycles de phénylalanine et une méthionine. Le cycle  $\beta$  ionone du rétinol est dans la partie la plus profonde de la poche et la chaîne isoprénique s'étire

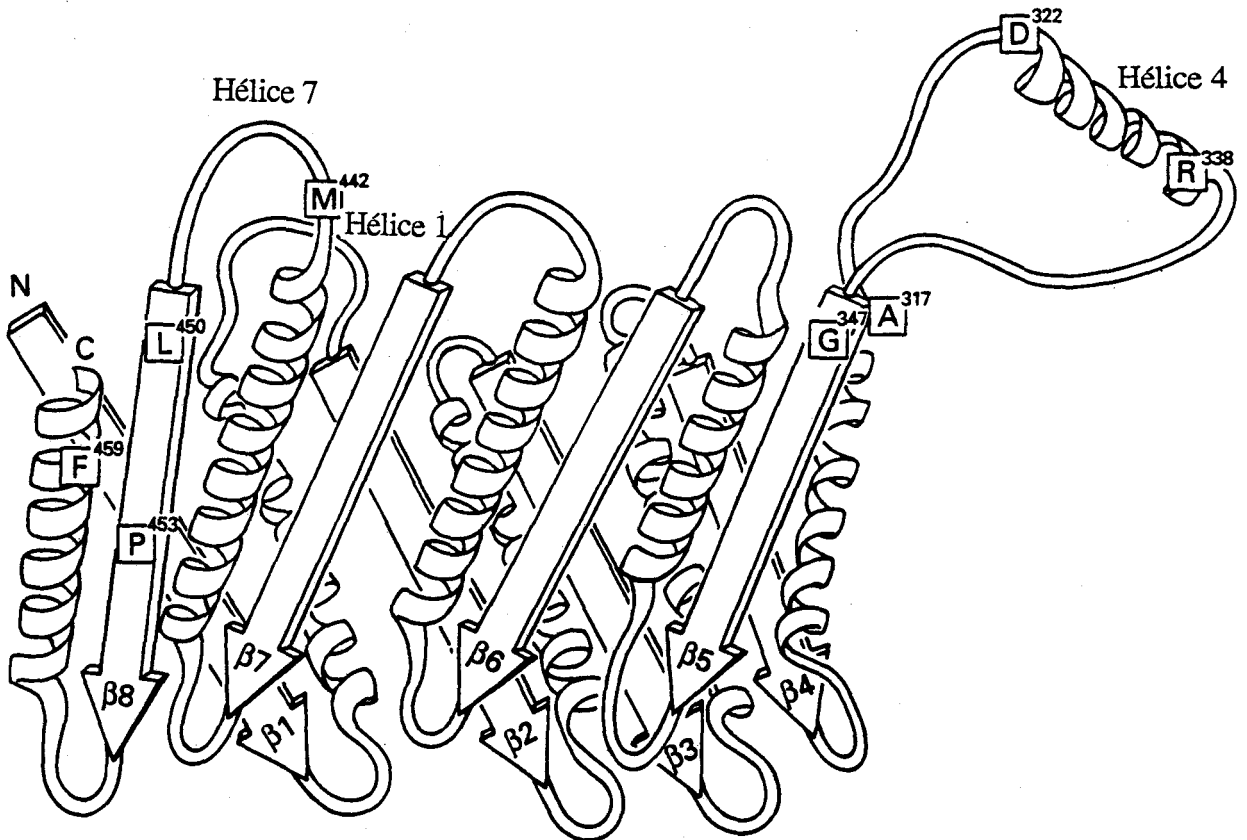


Fig. 26: Représentation schématique de la structure du domaine E de hTRβ1 proposée par Cheng *et al.* (1994). Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont notées N et C.

jusqu'à la surface de la protéine. Le groupe hydroxyl est accessible au solvant. La structure tertiaire est stabilisée par deux ponts disulfures (Gachon, 1994).

Zanotti *et al.* (1993) montrent que le N-éthyl rétinamide se positionne comme le rétinol dans le site de liaison de la RBP. La substitution de la fonction OH par un groupe éthyl n'a pas de conséquence sur la structure de l'holo-protéine, ni sur l'affinité. Cependant, la liaison de l'éthyl-rétinamide diminue l'affinité de RBP pour la transthyrétine.

Les CRBP I et II sont les chefs de file des FABP. La structure tertiaire de la forme holo de CRBPI et des formes holo et apo de CRBP II sont décrites grâce aux travaux de Cowan *et al.* (1993) et Winter *et al.* (1993), respectivement. Ces deux protéines lient le rétinol et le rétinol. Alors que CRBP II présente la même affinité vis-à-vis des deux composés, CRBPI est plus spécifique de l'alcool. De plus, l'affinité de CRBPI pour le rétinol est meilleure que celle présentée par CRBP II.

Les CRBP sont des protéines globulaires constituées de dix feuillets  $\beta$  antiparallèles qui s'enroulent pour former la charpente structurale en forme de tonneau. Les feuillets  $\beta$  établissent des liaisons hydrogènes entre eux à l'exception des motifs d et e, ce qui entraîne la formation d'une ouverture entre ces deux feuillets. Dans la poche de CRBP, le ligand a une orientation relative opposée à celle qu'il adopte dans le site de liaison de la RBP, avec le groupement hydroxyl ou aldéhyde enfoui au fond de la poche (Fig. 27).

Dans CRBPI, le groupe hydroxyl du rétinol est un donneur de liaison hydrogène à l'oxygène de la glutamine 108. Cela permet au groupe amino de ce résidu d'interagir avec la phénylalanine 4. Si le ligand est le rétinol, il est alors un accepteur de pont hydrogène. Dans ce cas, le groupe NH de la Gln 108 doit se comporter comme un donneur et l'interaction favorable avec la Phe 4 est perdue. Ce mécanisme de liaison du rétinol, dans lequel le groupe hydroxyl peut servir de donneur plutôt que d'accepteur de liaison hydrogène, pourrait expliquer la spécificité de CRBPI. Dans CRBP II, le résidu 4 est une glutamine. Il n'y a donc plus d'interaction favorable à préserver. Dans ce cas, le ligand peut aussi bien être donneur qu'accepteur.

Quant à la différence d'affinité des ligands pour ces protéines, cela peut s'expliquer par l'augmentation apparente de la polarité du site de liaison de CRBP II. En effet, des huit acides aminés qui diffèrent entre les deux protéines, trois introduisent des groupes plus polaires.

Dans la lumière de l'épididyme, les acides rétinoïques 9-cis et tout-trans se lient à une protéine vectrice, la E-RABP. Celle-ci présente une structure en tonneau  $\beta$ ,



Fig. 27: Représentation du complexe CRBP-rétinol d'après Cowan *et al.* (1993).

dans laquelle les ligands prennent la même orientation que le rétinol dans la RBP. La structure tertiaire obtenue par cristallographie des complexes ligand-protéine montrent que l'acide rétinoïque tout-trans ne présente pas une conformation étirée. La chaîne isoprénique se replie dans une conformation semblable à celle de l'isomère 9-cis (Newcomer *et al.*, 1993). A l'entrée de la poche, trois résidus chargés positivement et deux chargés négativement sont positionnés pour des interactions électrostatiques favorables avec le carboxyle des ligands. Le groupement polaire du rétinol ou du rétinol ne répond pas à l'équilibre des charges nécessaires à une bonne affinité. Newcomer souligne que des 22 acides aminés qui forment le site de liaison, cinq sont conservés dans la RBP. Contrairement à ce que l'on peut attendre, ces cinq résidus ne sont pas retrouvés dans le site de liaison de la RBP, mais participent à l'intégrité de la structure tertiaire. La chute de l'activité de liaison qu'entraînerait la mutation de l'un de ces résidus serait due à une disparition de l'intégrité de la structure dans l'espace. Elle ne devrait pas être interprétée comme une modification du site de liaison lui-même (Newcomer, 1993).

#### 6) *Changement conformationnel induit par le ligand :*

Afin de comprendre les bases structurales de la régulation transcriptionnelle hormono-dépendante, de nombreuses équipes étudient le changement de conformation des récepteurs induit par la liaison d'un ligand agoniste ou antagoniste.

L'approche technique souvent utilisée consiste en une hydrolyse enzymatique ou chimique du récepteur en présence ou non d'un ligand. La protéine, totalement hydrolysée en absence de l'hormone, devient résistante à la digestion lorsqu'elle est associée à son ligand et génère un fragment dont la taille varie de 23kDa à 32kDa selon le récepteur nucléaire et la nature du ligand, agoniste ou antagoniste (Allan *et al.*, 1992a ; Bhat *et al.*, 1993 ; Leng *et al.*, 1993). En ce qui concerne les RAR, le fragment résistant en présence d'agoniste est de 30 kDa, et 25 kDa en présence d'antagoniste (Keidel *et al.*, 1994). La modification du profil de digestion enzymatique ne peut être attribuée à un blocage direct des sites de coupure par le ligand car d'une part, le domaine E contient plus de vingt sites de coupure par les différents enzymes testés et les profils de digestion sont similaires quels que soient le récepteur et l'enzyme. D'autre part, l'hormone, molécule cent fois plus petite que le domaine E, ne peut bloquer la totalité des sites de coupure. L'association du ligand avec le récepteur produit donc une structure plus compacte, moins accessible aux enzymes.

D'autres moyens sont utilisés pour étudier le repliement de la protéine induit par l'hormone. Fritsch *et al.* (1992), à l'aide d'une technique d'affinité avec le PEG-



palmitate, mettent en évidence une diminution de l'hydrophobicité de surface du domaine E de ER après fixation d'un agoniste ou d'un antagoniste. La migration du TR en PAGE non dénaturant est plus rapide lorsqu'il est associé à l'hormone thyroïdienne. Cette variation ne peut être attribuée qu'à une différence de forme, et non à une différence de masse ou de charge nette (Leng *et al.*, 1993).

Enfin, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les extrémités C- et N-terminales et contre la région charnière du TR ainsi que le dichroïsme circulaire permettent aux équipes de Chin (Yen *et al.*, 1993) et de Samuels (Toney *et al.*, 1993) d'observer également les modifications conformationnelles induites par la liaison du ligand à ce récepteur. En effet, les spectres de dichroïsme circulaire du TR rendent compte d'une ellipticité variant selon la présence ou non du ligand ainsi que d'une légère stabilisation de la protéine par l'hormone vis-à-vis de la dénaturation thermique (Toney *et al.*, 1993). Yen *et al.* montrent que des anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale du récepteur lié à l'ADN reconnaissent moins bien leur épitope lorsque la protéine est associée à son ligand. Le changement de conformation s'étend donc jusqu'à l'extrémité N-terminale et est sans doute très important pour la régulation de la transcription ligand-dépendante.

Quelle est donc la signification de ce changement de conformation ligand-dépendant? Rappelons qu'un agoniste possède différents rôles selon le récepteur nucléaire qu'il active. Il peut être nécessaire à toute une série d'événements, débutant par la dissociation d'un complexe oligomérique cytoplasmique pour aboutir à la transactivation : c'est le cas du GR. Par contre, pour le TR, la fixation de l'hormone thyroïdienne a pour seul effet de modifier l'activité transcriptionnelle de la protéine associée à l'ADN en absence de ligand.

Les modifications conformationnelles observées sont similaires pour les hétérodimères TR/RXR ou RAR/RXR déjà complexés à l'ADN en absence de ligand et pour le PR qui subit plusieurs étapes avant d'être transcriptionnellement actif (Allan *et al.*, 1992b). Ce changement structural est donc un mécanisme commun à tous les récepteurs nucléaires pour la régulation de la transcription.

De nombreux auteurs établissent d'ailleurs une corrélation entre la modification conformationnelle des récepteurs et leur compétence transcriptionnelle. En effet, les groupes de O'Malley (Allan *et al.*, 1992a et b ; Beekman *et al.*, 1993), d'Edwards (El-Ashry *et al.*, 1989 ; Weigel *et al.*, 1992) et d'Apfel (Keidel *et al.*, 1994) observent tous une différence dans le repliement du récepteur selon qu'il est associé à un agoniste ou un antagoniste. Alors que ces deux types de molécules rendent les complexes formés capables de se lier à l'ADN, seuls les complexes récepteur-agoniste acquièrent une fonctionnalité transcriptionnelle. L'induction d'une conformation structurale inappropriée est donc une composante de l'effet antagoniste d'une molécule. Les

études d'Allan *et al.* (1992b) montrent que des anticorps monoclonaux dirigés contre différentes régions du PR sont capables d'induire la liaison à l'ADN *in vitro* mais pas la transcription hormono-dépendante. La liaison à l'ADN n'est donc pas suffisante pour provoquer la modification conformationnelle spécifique d'un ligand agoniste et nécessaire à l'activation de la transcription.

Le changement structural induit par le ligand permet donc de masquer une fonction répressive ou d'exposer les fonctions d'activation de la transcription avec lesquelles d'autres facteurs de transcription vont interagir. L'incapacité d'un antagoniste à activer la transcription résulte de la stabilisation d'une conformation inappropriée du récepteur qui n'autorise pas les interactions protéine-protéine requises pour la transactivation.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

L'objectif de notre travail est l'étude de l'interaction des RAR avec leurs ligands. Nous avons abordé ce sujet par l'étude biochimique du domaine de fixation au ligand des récepteurs rétinoïdes. Notre choix s'est porté sur la forme  $\alpha$  des RAR, car son implication dans certaines leucémies et l'utilisation de l'acide rétinoïque pour le traitement de ces pathologies nous ont semblé particulièrement importantes.

Notre travail a consisté en la construction d'un vecteur d'expression du domaine E de RAR $\alpha$  dans *Escherichia coli*, en la mise au point de la purification de la protéine recombinante puis en la caractérisation biochimique de cette protéine. Nous avons vérifié la fonctionnalité du domaine E ainsi obtenu en mesurant son affinité pour l'acide rétinoïque et le CD 367. Nous avons également mesuré les paramètres cinétiques de la liaison ligand-récepteur. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication ("Purification and functional characterization of the ligand-binding domain from the retinoic acid receptor  $\alpha$  : evidence that sulfhydryl groups are involved in ligand-receptor interaction." Dallery, N., Sablonnière, B., Grillier, I., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1993), *Biochemistry* **32** : 12428-12436).

Nous avons ensuite débuté l'étude de l'implication de certains groupes d'acides aminés dans l'interaction de RAR $\alpha$  avec ses ligands. Nous avons pour cela observé l'effet de réactifs spécifiques des cystéines et des arginines sur l'activité de liaison au ligand de ce récepteur.

L'identification de la (ou des) cystéine(s) potentiellement localisée(s) dans le site actif du domaine E a ensuite été abordée par une approche indirecte qui utilise la spectrométrie de masse en mode électrospray. Seuls les tous premiers résultats de nombreux essais, effectués en collaboration avec le Docteur D. Belaïche, pourront être présentés dans ce mémoire.

Pour étudier l'interaction ligand-récepteur, il importe de disposer d'une bonne méthode de séparation du ligand libre et du ligand lié au récepteur. La protéine exprimée dans *E. coli* a été utilisée pour l'étude des paramètres physicochimiques influençant l'efficacité de l'une des méthodes de séparation souvent employée : l'adsorption du ligand libre par le charbon-dextran. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication ("Physicochemical parameters affecting the charcoal adsorption assay for quantitative retinoid-binding measurement". Sablonnière, B., Dallery, N., Grillier, I., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1994), *Anal. Biochem.* **217**: 110-118).

CHAPITRE 3:

*EXPRESSION, PURIFICATION ET  
CARACTERISATION DU DOMAINE E  
DE RAR $\alpha$ .*

## A) INTRODUCTION :

L'analyse de l'interaction d'un récepteur nucléaire avec son ligand demande qu'il soit isolé des autres récepteurs afin que l'on soit sûr d'interroger la protéine d'intérêt. D'autre part, les RAR sont exprimés à un taux très faible dans les tissus naturels, nous devons donc recourir à la production de protéines recombinantes afin d'obtenir le matériel nécessaire à notre étude. Le choix du système d'expression s'est alors posé. Au moment où nous avons débuté nos travaux (1990), il existait très peu de données sur l'expression de RAR recombinants. Seuls les travaux de Crettaz *et al.* (1990) étaient rapportés. Ces auteurs ont exprimé le domaine E de RAR $\alpha$  dans *E. coli* et le récepteur en entier dans les cellules Cos. Nous nous sommes donc basée sur l'expérience plus vaste de l'expression des récepteurs stéroïdiens pour guider notre choix. Nous avons pu observer que la plupart des grands systèmes d'expression disponibles étaient utilisés, et le sont encore actuellement, avec un succès variable en terme de rendement et de fonctionnalité.

### 1) *Les données disponibles au début de notre travail :*

#### a) Escherichia coli :

De nombreuses tentatives ont été réalisées visant à produire soit un récepteur entier (Bonifer *et al.*, 1989 ; Lin *et al.*, 1990) soit le domaine de liaison au ligand seul (Eul *et al.*, 1989), parfois avec le domaine de liaison à l'ADN (Eul *et al.*, 1989 ; Power *et al.*, 1990).

La production de fragments de récepteurs correspondant à un ou deux domaines fonctionnels est plus facile que celle du récepteur entier, car alors se posent des problèmes importants de solubilité de la protéine recombinante, un inconvénient majeur du système *E. coli*. Le recours à la production du récepteur recombinant sous forme de protéine de fusion a été employé pour augmenter la stabilité et la solubilité de la protéine recombinante.

La fusion a ainsi été réalisée avec l'extrémité C-terminale de la  $\beta$ -galactosidase (Eul *et al.*, 1989), la protéine A de Staphylocoque qui offre l'avantage d'une purification facile sur IgG-sepharose (Bonifer *et al.*, 1989) ou l'ubiquitine (Power *et al.*, 1990). L'ubiquitine peut être secondairement clivée du récepteur recombinant sous l'effet d'une ubiquitinase eucaryote.

Les taux d'expression observés varient de quelques dizaines de microgrammes à plusieurs milligrammes de récepteur recombinant par litre de culture bactérienne. Des taux particulièrement élevés ont été obtenus pour le récepteur de la progestérone tronqué des domaines A/B (Power *et al.*, 1990). Le système utilisant une protéine de fusion avec l'ubiquitine apparaît particulièrement performant avec une protéine recombinante représentant 1 à 4 % des protéines cellulaires totales et conduisant à la production de près de 10 mg de récepteur par litre de culture. Les domaines D et E de PR exprimés en fusion avec la  $\beta$ -galactosidase ne représentent que 0,2 % des protéines totales (Eul *et al.*, 1989).

Les rendements obtenus après purification sont également très variables. Eul *et al.* recueillent 85  $\mu$ g du segment D/E de PR et seulement 38  $\mu$ g du fragment C<sub>1</sub>C<sub>2</sub> correspondant aux domaines C, D et E, par litre de culture. De plus, des contaminants sont présents dans les préparations de protéines purifiées. Plus récemment, la chromatographie d'immunoaffinité permet à Park *et al.* (1993) de produire 100  $\mu$ g de TR $\beta$ 1 pur à homogénéité par litre de culture.

La solubilité de la protéine recombinante est variable. Elle est généralement bien meilleure dans le cas des protéines de fusion. Ainsi, 20 % du TR $\beta$ 1 exprimé en entier existe sous forme soluble (Park *et al.*, 1993) pour 30 à 40 % du récepteur de la progestérone fusionné à l'ubiquitine (Power *et al.*, 1990).

Sur le plan de l'activité biologique, le récepteur recombinant conserve très bien sa réactivité immunologique. L'activité de liaison du stéroïde est conservée par un pourcentage des molécules recombinantes variant de 0 à 100 % selon les récepteurs, leur solubilité et le mode d'induction utilisé. Dans le cas du récepteur de la progestérone fusionné à l'ubiquitine, le taux de récepteur fonctionnel est de 0,3 % si l'on considère la totalité du récepteur exprimé, et 10 % du récepteur soluble (Power *et al.*, 1990). Une fixation du ligand à haute affinité et grande spécificité a été observée dans le cas des récepteurs de la progestérone (Eul *et al.*, 1989 ; Power *et al.*, 1990) et de l'hormone thyroïdienne (Lin *et al.*, 1990 ; Park *et al.*, 1993), tandis qu'elle n'a pas été obtenue dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes après dénaturation-renaturation (Bonifer *et al.*, 1989). Plus récemment, Nakajima *et al.* (1993) augmentent la capacité de liaison du récepteur de la vitamine D surexprimé dans *E. coli* (ou baculovirus) et purifié en ajoutant de l'extrait nucléaire de foie de rat au milieu d'incubation.

### b) Levures :

L'expression des récepteurs des oestrogènes (Metzger *et al.*, 1988 ; Mac Donnell *et al.*, 1991), des glucocorticoïdes (Schena et Yamamoto, 1988), de la progestérone (Mak *et al.*, 1989) et de la vitamine D (Mac Donnell *et al.*, 1989 ; Sone *et al.*, 1990) a été rapportée avec des résultats variables. Le taux d'expression s'est avéré faible pour le récepteur des glucocorticoïdes (2500 molécules produites par cellule), il atteint en général 0,1 à 0,2 % des protéines solubles, soit environ 150 000 molécules par cellule. Sone *et al.* (1990) ont réussi à améliorer le taux d'expression de VDR jusqu'à 0,5 % des protéines solubles. La production sous forme de protéine de fusion avec l'ubiquitine améliore la qualité du récepteur recombinant (Mac Donnell *et al.*, 1989 ; Mak *et al.*, 1989 ; Mac Donnell *et al.*, 1991).

L'activité de liaison du stéroïde est conservée par 10 à 40 %, parfois 100 % des protéines recombinantes. Après purification, un faible pourcentage de VDR est capable de lier son ligand avec une bonne affinité (Sone *et al.*, 1990). L'affinité et la spécificité de liaison sont comparables à celles des récepteurs naturels, avec cependant parfois des anomalies. En effet, le récepteur des glucocorticoïdes recombinant n'a pu être activé par la dexaméthasone (Schena et Yamamoto, 1988), ce qui peut être dû à un taux d'expression trop élevé du récepteur recombinant dans la levure (Wright et Gustafsson, 1992).

### 3) Cellules CHO :

Comme pour les autres systèmes d'expression, la cotransfection dans les cellules CHO dhfr<sup>-</sup> des vecteurs d'expression codant le récepteur des glucocorticoïdes (ou des oestrogènes) et la dihydrofolate réductase a conduit à la production par les cellules transfectées de quantités de récepteur variables. Quelques dizaines de milliers à 8 millions de molécules sont exprimées, soit 30 à 100 fois plus que les cellules non transfectées (Bellingham et Cidlowski, 1989 ; Hirst *et al.*, 1990 ; Kushner *et al.*, 1990 ; Sanchez *et al.*, 1990). Il faut noter que les cellules CHO possèdent des récepteurs endogènes et qu'une surexpression est parfois létale pour ces cellules.

### 4) Cellules d'insectes :

Au moment où nous débutons nos travaux, le système d'expression comportant un vecteur baculovirus et des cellules d'insectes Sf9 et Sf21 (*Spodoptera*



*frugiferda*) commençait seulement à être employé. Cet emploi s'est très largement développé aujourd'hui. Ainsi, ce système a permis de produire le récepteur des glucocorticoïdes (Srinivasan et Thompson, 1990 ; Alnemri *et al.*, 1991a ; Alnemri et Litwack, 1993), des minéralocorticoïdes (Alnemri *et al.*, 1991b ; Binart *et al.*, 1991 ; Alnemri et Litwack, 1993) des oestrogènes (Brown et Sharp, 1990 ; Obourn *et al.*, 1993), des androgènes (Chang *et al.*, 1992 ; Xie *et al.*, 1992), de la progestérone (Elliston *et al.*, 1992) et de la vitamine D (Mac Donald *et al.*, 1991 ; Ross *et al.*, 1991 ; Li *et al.*, 1994a).

Comme les modifications post-traductionnelles telles que le clivage de la séquence signal, la phosphorylation, la myristylation, la palmitoylation et la glycosylation existent dans ce système, les problèmes de solubilité à l'origine d'une faible fonctionnalité sont moins importants, mais ils existent quand même.

Le taux d'expression de la protéine recombinante varie beaucoup. Le GR ou le PR ne représenterait que 0,1 à 0,25 % des protéines totales (Srinivasan et Thompson, 1990 ; Elliston *et al.*, 1992). Le VDR représente 3 à 5% des protéines totales, mais seulement 0,5 % des protéines solubles (Mac Donald *et al.*, 1991 ; Ross *et al.*, 1991). Alors que le taux d'expression du récepteur des androgènes atteint 30 % des protéines totales, seuls 10 % sont solubles (Xie *et al.*, 1992).

Tous les récepteurs exprimés dans les cellules Sf9 présentent une affinité et une spécificité comparables à leurs analogues naturels. Le taux d'expression de récepteur fonctionnel le plus souvent rapporté est de l'ordre de  $1.10^6$  molécules de récepteur fonctionnel par cellule. Ce taux a pu être triplé en cultivant les cellules en suspension (Alnemri *et al.*, 1991a). Alors que Binart *et al.* (1991) ne détectent que  $10^5$  sites de liaison des minéralocorticoïdes par cellule, Obourn *et al.* (1993) obtiennent un meilleur taux d'expression : cinq jours après l'infection, chaque cellule contiendrait  $10^8$  sites de liaison des oestrogènes.

L'activité de liaison atteint parfois un maximum un, deux ou trois jours après l'infection pour diminuer ensuite. Ceci peut être dû à une mort cellulaire ou une déstabilisation du récepteur (Alnemri *et al.*, 1991a ; Binart *et al.*, 1991 ; Chang *et al.*, 1992). Il arrive que la capacité de liaison du récepteur recombinant atteigne un maximum 24 h après l'infection alors que le taux d'expression est maximal 48 h après cette infection. Cette différence peut être due à un taux d'expression trop élevé pour permettre un repliement correct des protéines. Dans des études complémentaires, Alnemri et Litwack (1993) montrent que le récepteur total exprimé (GR ou MR) peut représenter 30 à 50 % des protéines totales mais que 0,35 % seulement des protéines

exprimées serait assemblé en complexes oligomériques cytoplasmiques fonctionnels. La majorité des protéines recombinantes forment des particules insolubles. La capacité de liaison du ligand n'est que légèrement améliorée (10 %) lors de la co-expression d'une hsp (hsp70 ou hsp90). Les récepteurs tronqués de leur domaine de liaison au ligand ne forment pas d'agrégats.

Le récepteur humain des oestrogènes exprimé par le système baculovirus est purifié à 70-80 % d'homogénéité par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie d'affinité sur DNA-cellulose (Obourn *et al.*, 1993). Le récepteur de la vitamine D est purifié par immunoaffinité à 95 % d'homogénéité en conservant une très bonne affinité ( $K_d=0,2$  nM et 0,5 nM, avant et après purification, respectivement) et une très bonne capacité. En effet 80 % du récepteur purifié, quantifié par immunoradiométrie, lie l'hormone (Li *et al.*, 1994). Alnemri *et al.* (1991a) "estiment" qu'ils peuvent purifier en trois étapes 1 à 1,5 mg de GR par litre de culture.

Enfin, tous les modèles disponibles ont été employés pour l'expression de récepteurs nucléaires avec des résultats variables. Les systèmes procaryote et baculovirus sont les plus adaptés à la production de protéines en grande quantité. Notre choix s'est porté sur le système procaryote.

## 2) Notre choix :

Pour obtenir le matériel nécessaire à la caractérisation biochimique du domaine E de RAR $\alpha$  et à l'étude de l'effet de réactifs spécifiques d'acides aminés sur l'activité de liaison, nous avons choisi le système bactérien pour sa simplicité. Dans ce système, toutes les modifications post-traductionnelles n'existent pas ; mais comme elles n'ont pas été décrites comme étant indispensables à la fixation du ligand, cela ne semblait pas être un inconvénient. Pour augmenter nos chances d'obtenir une protéine soluble, nous avons décidé de n'exprimer que l'extrémité C-terminale du récepteur comprenant les domaines E et F de RAR $\alpha$ . Cela était tout à fait envisageable puisque les domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires sont indépendants. Nous avons vu plus haut que le domaine E seul du PR ou du RAR a été exprimé dans *E. coli*. L'absence de la région N-terminale n'altère pas profondément l'activité de liaison (Eul *et al.*, 1989 ; Crettaz *et al.*, 1990).

Nous avons vu que l'expression sous forme de protéine de fusion permet parfois d'augmenter le taux d'expression et de diminuer la proportion de protéines insolubles. L'utilisation du vecteur d'expression choisi, pGEX-2T, nous permet

d'exprimer la protéine d'intérêt sous forme de protéine de fusion. Celle-ci est constituée en N-terminal de la glutathion-S-transférase (GST), ce qui permet la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité sur colonne de glutathion immobilisé dans des conditions douces et non dénaturantes (Smith et Johnson, 1988). Les deux composantes de la protéine de fusion peuvent être séparées par clivage à la thrombine grâce un site de coupure spécifique introduit dans le vecteur d'expression.

Après la construction du vecteur d'expression pGEX-2T-hRAR $\alpha$ LBD, nous avons donc mis au point la purification de la protéine recombinante, et procédé à sa caractérisation. Nous avons ensuite vérifié la fonctionnalité du domaine de liaison au ligand recombinant en mesurant son affinité pour deux ligands, l'acide rétinoïque et le CD367, avant de mesurer les paramètres cinétiques de la liaison.

L'étude de l'implication des cystéines dans la liaison récepteur-ligand est bien avancée pour certains des récepteurs stéroïdiens. C'est le cas du récepteur des glucocorticoïdes ou celui des oestrogènes. Trois approches différentes ont été utilisées pour ces récepteurs : l'utilisation des réactifs spécifiques d'acides aminés, le marquage d'affinité et la mutagenèse dirigée (voir revue générale). Nous avons voulu débiter l'étude du rôle des cystéines dans la liaison RAR-ligand en observant d'abord l'effet de réactifs spécifiques des groupements thiols sur l'activité de liaison du récepteur.

## **B) RESULTATS :**

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication suivante :

"Purification and functional characterization of the ligand-binding domain from the retinoic acid receptor  $\alpha$  : evidence that sulfhydryl groups are involved in ligand-receptor interaction."

Dallery, N., Sablonnière, B., Grillier, I., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1993).  
*Biochemistry* 32 : 12428-12436.

## Purification and Functional Characterization of the Ligand-Binding Domain from the Retinoic Acid Receptor $\alpha$ : Evidence That Sulfhydryl Groups Are Involved in Ligand-Receptor Interactions<sup>†</sup>

Nathalie Dallery, Bernard Sablonnière,\* Isabelle Grillier, Pierre Formstecher, and Michel Dautrevaux

CJF INSERM 92-03, Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

Received April 22, 1993; Revised Manuscript Received July 30, 1993<sup>o</sup>

**ABSTRACT:** The pGEX-2T expression vector was used to produce the ligand-binding domain from the human retinoic acid receptor  $\alpha$  (hRAR $\alpha$  LBD) in *Escherichia coli*. The resulting fusion protein, containing the glutathione *S*-transferase separated from the truncated receptor (hRAR $\alpha$  186-462) by a thrombin cleavage site, was purified with use of affinity chromatography on immobilized glutathione. A 90% homogeneity was obtained, with a specific activity of 100 pmol/mg and an overall 10% yield. Following purification and thrombin cleavage, a predominant monomeric (Stokes radius = 2.3 nm, molecular mass of 32 kDa) [<sup>3</sup>H]retinoic acid hRAR $\alpha$ -LBD complex was characterized by high-performance size-exclusion chromatography. The purified hRAR $\alpha$  LBD bound retinoic acid with an apparent  $K_d$  of 9 nM, a value close to the  $K_d$  of the full-length hRAR $\alpha$  expressed in COS cells. Kinetic studies at 0 °C demonstrate that the association of [<sup>3</sup>H]retinoic acid and [<sup>3</sup>H]CD367, a synthetic retinoid, to the overexpressed receptor was extremely rapid (complete in less than 3 min), whereas their dissociation from the receptor was slower, with half-lives of about 40 min at 0 °C. Experiments performed at various subzero temperatures allowed a more accurate assay of the association rate constant and indicate that the entropy of activation ( $\Delta S^\ddagger$ ) is positive, which is characteristic of hydrophobic interactions. The ligand-binding activity was markedly decreased by pretreatment with various sulfhydryl modifying agents. 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) appeared to be the most potent, whereas iodoacetamide was the least active. Furthermore, a series of *N*-alkylmaleimides was shown to inactivate the recombinant receptor. Comparison of these agents revealed a striking increase of receptor inactivation with increasing chain length of the maleimide derivative. Full protection against inactivation was afforded by previous [<sup>3</sup>H]retinoid-binding on the receptor. The receptor binding activity was insensitive to arsenite, a reagent able to preferentially oxidize vicinal dithiols. Taken together, these results demonstrate that one or several sulfhydryl groups but probably no vicinal dithiols are involved in the retinoid-binding activity of hRAR $\alpha$ , lying most probably in the retinoid-binding site itself.

*All-trans* retinoic acid (RA),<sup>1</sup> a biologically active vitamin A derivative, and its synthetic analogues affect processes as diverse as growth, differentiation, and morphogenesis (Brookes, 1990; Summerbell & Maden, 1990; Eichele, 1989). RA has profound effects on the differentiation of various tissues, including the hematopoietic and nervous system (Amatruda & Koeffler, 1986; Durston *et al.*, 1989), skin, and cartilage (Shapiro, 1980; Paulsen *et al.*, 1988; Asselineau *et al.*, 1989). It can suppress and reverse malignant transformation induced by either chemical carcinogens or ionizing radiation (Sporn *et al.*, 1976; Moon & Mehta, 1990). Many retinoids have now been described, and some are used for the treatment of

dermatological disorders (Peck, 1983) and acute promyelocytic leukemia (Chomienne *et al.*, 1989), for cancer chemoprevention, and as immunomodulators (Bollag & Hartmann, 1983; Lippman *et al.*, 1987). A number of retinoids have been tested in various *in vivo* systems, inducing very often a differentiation response (Sporn & Roberts, 1984).

It is now well established that the ultimate targets of retinoids are the nuclear protein receptors termed RARs, which belong to the steroid/thyroid hormone receptor superfamily (Evans, 1988; Chambon *et al.*, 1991). Three RAR subtypes (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , and RAR $\gamma$ ) have been cloned in humans and mice (Petkovitch *et al.*, 1987; Giguere *et al.*, 1987; de Thé *et al.*, 1987; Brand *et al.*, 1988; Benbrook *et al.*, 1988; Zelent *et al.*, 1989; Krust *et al.*, 1989). Another receptor class named RXR, which displays a rather different sequence and which binds specifically to 9-*cis*-retinoic acid, has been identified (Hamada *et al.*, 1989; Mangelsdorf *et al.*, 1990; Levin *et al.*, 1992). RARs bind to their target cognate DNA sequences, termed retinoic acid response elements, in the promoters of responsive genes and upon ligand binding activate or repress the transcription of the target. However, despite the identification of various genes regulated by RARs (Vasios *et al.*, 1989; de Thé *et al.*, 1990; Nicholson *et al.*, 1990; Sucov *et al.*, 1990; Schüle *et al.*, 1991; Umesono *et al.*, 1991), the precise molecular events that are triggered following RA binding to

<sup>†</sup> This work was supported by the University of Lille II, by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRE No. 884 008 and CJF 92-03), by the Association pour la Recherche sur le Cancer, and by the Ligue Nationale Française contre le cancer.

\* To whom correspondence should be addressed.

<sup>o</sup> Abstract published in *Advances ACS Abstracts*, November 1, 1993.

<sup>1</sup> Abbreviations: CRABP, cellular retinoic acid binding protein; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); DTT, dithiothreitol; GST, glutathione *S*-transferase; hRAR, human retinoic acid receptor; IA, iodoacetamide; IPTG, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; LBD, ligand-binding domain;  $\beta$ ME,  $\beta$ -mercaptoethanol; MMTS, methyl methanethiosulfonate; NEM, *N*-ethylmaleimide; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RA, retinoic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis;  $K_d$ , equilibrium constant of dissociation;  $k_a$ , rate constant of association;  $k_d$ , rate constant of dissociation.

the receptor are not well understood. RARs and RXRs, like others members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily, are organized in several domains (Green & Chambon, 1988). Two main receptor functions, i.e., ligand binding and DNA binding, are fulfilled by the E and C domains, respectively, which are also the most conserved domains. Owing to the natural low abundance of RARs in target tissues and to the frequent colocalization in the same tissues of different RAR subtypes with various isoforms (Leroy *et al.*, 1991), an absolute requirement for the study of the ligand-binding specificity of each RAR subtype was the resort to recombinant RARs overexpressed either in *E. coli* or in eukaryotic cells. First results in this field have been recently reported, affording the critical information that some of the existing retinoids displayed a partial RAR subtype-binding specificity (Lehmann *et al.*, 1991; Delescluse *et al.*, 1991). These differences in binding specificity are probably related to the limited but significant differences in the sequences of the E domain of RAR $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ . The need for RAR subtype-specific ligands, which could be more efficient and less toxic in human therapy, renews the interest in retinoid medicinal chemistry and also greatly stimulates the basic study of the structural and functional properties of RAR ligand-binding domains.

Several successes in the *E. coli* expression of hRAR $\alpha$  and  $\beta$ , either as full-length protein or as ligand-binding domain, have already been reported (Crettaz *et al.*, 1990; Yang, *et al.*, 1991; Keidel *et al.*, 1992). But in all these cases, work was focused on the study of the DNA and ligand-binding specificity of the hRARs, and no attempt was made to purify the recombinant RAR and to study more precisely its biochemical properties. Moreover, very little information is available about the kinetic parameters governing the association and dissociation of retinoid-receptor complexes, and no thermodynamic study has been reported so far. Such a study could allow a better understanding of the respective contributions of hydrophobic interactions and the involvement of other kinds of bonding to the high affinities observed for retinoid-receptor complexes. In this paper, we report the complete purification and describe some biochemical properties (hydrodynamic properties and kinetics parameters of ligand binding) of a recombinant hRAR $\alpha$  ligand-binding domain. To gain further insights into the mechanisms involved in retinoid-receptor interactions, the thermodynamic parameters of association were measured, and we have also studied the ligand-binding activity and its sensitivity toward various sulfhydryl reagents.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials.** The plasmid pHK1 containing the full-length hRAR $\alpha$  coding sequence and the pRSV-GR expression vector were obtained from Dr. R. M. Evans, Howard Hughes Medical Institute, La Jolla, CA. The expression vector pSVM-dhfr was obtained from Dr. G. Ringold, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA. The expression vector pGEX-2T was obtained from Pharmacia-LKB, France. [ $^3$ H]All-trans retinoic acid ([ $^3$ H]RA, 55.7 Ci/mmol) was from New England Nuclear. [ $^3$ H]CD367 (52.8 Ci/mmol) and unlabeled CD367 (4-[5,6,7,8 tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-anthracenyl]benzoic acid) were obtained from Dr. B. Shroot, CIRI, Sophia Antipolis, Valbonne, France.

A rabbit polyclonal antibody (IS39 antiserum) directed against a synthetic peptide (hRAR $\alpha$  425-443) was prepared in our laboratory (Sablonnière *et al.*, in press). Restriction endonucleases and T4 DNA ligase was purchased from Boehringer or Biolabs. The affinity gel glutathione Sepharose

4B was from Pharmacia-LKB. Human thrombin (3000 IU/mg), antiproteases, *N*-ethylmaleimide (NEM), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), methyl methanethiosulfonate (MMTS), and iodoacetamide (IA) were obtained from Sigma. All other chemicals were of the highest available purity grade and were purchased from Merck. *N*-Propyl-, *N*-hexyl-, and *N*-nonylmaleimides were prepared from maleic anhydride and the appropriate amine through a two-step procedure according to the method of Heitz *et al.* (1968), whereas *N*-benzylmaleimide was obtained by the two-step procedure of Cava *et al.* (1961).

**Construction of the Expression Vector pGEX-2T-hRAR $\alpha$  LBD.** The pHK1 vector was digested with *Sac*I, and a *Bam*HI site was inserted for subsequent cloning into the pGEX-2T expression vector. Positive clones were then amplified, and the plasmid was digested with *Bam*HI and *Aat*II. The excised sequence was introduced into the pGEX-2T vector, giving the resulting pGEX-2T-hRAR $\alpha$  LBD plasmid containing the cDNA sequence coding for the E and F domains of hRAR $\alpha$  in frame with the sequence coding for glutathione *S*-transferase (GST). *E. coli* JM109 cells were then transformed with this plasmid. The recombinant clones were screened by restriction analysis using *Pst*I digestion.

**Expression of the Fusion Protein GST-hRAR $\alpha$  LBD in Bacteria and Extract Preparations.** Transformed JM109 cells were screened for the expression of fusion protein by analysis on SDS-PAGE. Following an overnight preculture, each culture sample was diluted to 1:20 with fresh medium plus ampicillin and incubated at 37 °C until an OD 600 nm of 0.8 was reached. IPTG was then added to a 0.2 mM final concentration, and the culture was further incubated for 1-4 h. Two-milliliter aliquots were harvested and centrifuged, and the pellet was analyzed on SDS-PAGE (10% acrylamide gels). For large-scale production of recombinant protein, typical experiments were conducted as follows. An overnight culture of transformed JM109 cells was diluted to 1:50 in 2000 mL of fresh medium and grown at 37 °C before IPTG was added to 0.2 mM. Three hours later, cells were pelleted by centrifugation and lysed in 50 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 8.00/10 mM EDTA/10% (w/v) saccharose/0.4 mg/mL lysozyme, including a protease inhibitor cocktail: 1 mM PMSF, 20  $\mu$ g/mL leupeptin, and 20  $\mu$ g/mL aprotinin. The lysis was then completed by a cycle of freezing/thawing and by addition of Triton X-100 (0.1% final concentration). Homogenization was performed on ice by mild sonication, and 10% glycerol (v/v) was added. After centrifugation, the supernatant was saved and referred as crude bacterial extract for subsequent purification of the GST-hRAR $\alpha$  LBD fusion protein.

**Ligand-Binding Assays.** Bacterial extracts or nucleosol samples were incubated with 1-50 nM [ $^3$ H]RA or [ $^3$ H]CD367 in binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.00/150 mM NaCl/1 mM EDTA/1 mM DTT). After 16 h incubation at 0 °C, 0.1 mL of chilled charcoal-dextran suspension (3% Norit A/0.3% dextran T70 in 50 mM Tris-HCl, pH 8.00/10 mM KCl/1 mM DTT) was added to 0.2 mL of incubates, mixed vigorously, and left for 15 min at 0 °C. The tubes were then centrifuged at 6000g for 10 min, and 0.15-mL supernatant samples were counted for radioactivity. Nonspecific binding measured in the presence of 200-fold excess of nonradioactive retinoids was 10-15% of the total binding. Scatchard plots were obtained using a "Scatchard-computed" program (LKB Wallac, Sweden).

**Kinetics of [ $^3$ H]Retinoid Binding to the Recombinant GST-hRAR $\alpha$  LBD. Determination of Association Rate.** Bacterial extracts were submitted to 20-fold dilution with binding buffer

containing 40% (v/v) glycerol. To 0.5 mL duplicate aliquots of diluted bacterial extracts was added, at time zero, 30 nM tritiated retinoids ( $[^3\text{H}]\text{RA}$  or  $[^3\text{H}]\text{CD367}$ ) in the absence or presence of a 1000-fold excess of the corresponding unlabeled retinoids. At times varying from 1 to 8 min, 0.2-mL aliquots were pipetted, and bound retinoid was measured by dextran-charcoal adsorption as described above. At each time point, the radioactivity observed in the sample containing an excess of unlabeled retinoid was subtracted from that obtained in the absence of nonradioactive retinoid, giving the specifically-bound  $[^3\text{H}]\text{retinoid}$ . The total concentration of specifically-binding sites,  $R_0$ , was determined in bacterial extracts incubated to equilibrium with 30 nM of the corresponding tritiated retinoid in the presence or absence of an excess of unlabeled retinoid.  $R_0$  was equal to 3 nM and  $D_0$  to 30 nM. At the various times indicated after the addition of the ligand, the concentrations of free binding sites  $R_t$  and free retinoid  $D_t$  were calculated. The rate constant of association  $k_a$  was calculated from the equation

$$t = \frac{2.303}{k_a(D_0 - R_0)} \log \frac{R_0 D_t}{D_0 R_t}$$

**Determination of Dissociation Rate.** The measurement of the rate constant of dissociation was performed at the indicated temperatures. Duplicate aliquots (0.5 mL) were incubated with 30 nM  $[^3\text{H}]\text{retinoids}$  for 3 h at 0 °C. At time zero, a 1000-fold excess of the corresponding unlabeled retinoid in 0.02 volume of ethanol was added. At various time intervals thereafter, varying from 0 to 180 min, 0.2-mL aliquots of each tube were withdrawn, and bound retinoid was measured by dextran-charcoal adsorption.

**Affinity Purification and Cleavage of the Fusion Protein GST-hRAR $\alpha$  LBD.** A modified protocol of the procedure described by Smith and Johnson (1988) was used. A 55-mL sample of crude bacterial extract was adjusted to pH 7.30 and mixed with 6 mL of glutathione Sepharose 4B for 16 h at 4 °C on a rotating shaker. The affinity gel was rapidly washed with 30 mL of buffer 1 (20 mM Tris-HCl, pH 8.00/150 mM NaCl/10% glycerol (v/v)), followed by 30 mL of buffer 2 (20 mM Tris-HCl, pH 8.00/10% glycerol (v/v)). The fusion protein was eluted by competition for 5 h at 4 °C with free reduced glutathione in 6 mL of eluting buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.00/30 mM reduced glutathione/150 mM NaCl/5% glycerol (v/v). The affinity gel eluate was then concentrated in an Amicon microconcentrator. To ensure an efficient thrombin cleavage of the fusion protein without loss of receptor binding activity, the concentrated eluate was incubated with 300 IU of human thrombin for 16 h at 4 °C, in 50 mM Tris-HCl, pH 7.50/150 mM NaCl/2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ /5% glycerol (v/v). At the end of the incubation period, thrombin cleavage was stopped by the addition of 2 mM PMSF.

**Size-Exclusion HPLC.** Analytical size-exclusion chromatography was carried out with a LKB 2150 liquid chromatography system. The samples were fractionated over a TSK G 3000 SW column (7.5  $\times$  300 mm) equipped with a guard column (7.5  $\times$  100 mm) at a flow rate of 0.5 mL/min using 10 mM Tris-HCl, pH 7.20/150 mM NaCl/1 mM DTT as eluent. Fractions of 0.25 mL were collected and assayed for GST activity and radioactivity. The column was calibrated with the following standard proteins: catalase ( $R_s = 5.2$  nm), bovine serum albumin ( $R_s = 3.6$  nm), ovalbumin ( $R_s = 2.9$  nm), and chymotrypsinogen ( $R_s = 2.0$  nm). The distribution coefficient  $K_d$  [ $K_d = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ ] was plotted as  $K_d^{1/3}$  versus the Stokes radii of standards according to Porath (1963).

**SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.** SDS-PAGE was performed in 10% or 12% acrylamide gels according to Laemmli (1970). Proteins bands were visualized by Coomassie blue staining. Molecular mass markers were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), and soybean trypsin inhibitor (20 kDa).

**Western Blot Analysis.** Proteins separated by SDS-PAGE as described above were electroblotted onto nitrocellulose filters as previously described (Sablonnière *et al.* 1988). The filters were then treated with a blocking buffer and incubated for 2 h at 20 °C with anti-hRAR $\alpha$  polyclonal antibodies. The filters were then washed and incubated for 1 h with peroxidase-conjugated goat anti-(rabbit antibody) (Institut Pasteur, Paris, France). Following four washes, the nitrocellulose filters were incubated with luminol as substrate (ECL western blotting kit, Amersham, France) for 2 min, rinsed rapidly, and autoradiographed.

**Sulphydryl Modification Procedures.** To determine the ligand-binding susceptibility of the fusion protein to sulphydryl reagents, aliquots of crude bacterial extracts were diluted to 1:20 in 50 mM Tris-HCl, pH 7.40, and 150 mM NaCl was incubated with four different reagents as follows. The first aliquot was treated with NEM (0–2 mM) for 5 min at 0 °C; NEM activity was then stopped by the addition of 20 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and specific retinoid-binding activity was assayed with 20 nM  $[^3\text{H}]\text{RA}$ . The second, third, and fourth aliquots were treated with IA (0–1 mM), DTNB (100 nM to 100  $\mu\text{M}$ ), and MMTS (0–1 mM), respectively, in the same conditions and further assayed for retinoid-binding activity with  $[^3\text{H}]\text{RA}$ . To test the reversibility of the receptor inactivation, aliquots incubated for 30 min with DTNB were rapidly mixed with  $\beta$ -mercaptoethanol (20 mM final concentration) and further assayed for retinoid-binding activity with  $[^3\text{H}]\text{RA}$ . In another experiment, an aliquot subjected to MMTS treatment for 30 min was then mixed with DTT (10 mM final concentration) and assayed for retinoid-binding activity. In each series of experiments, a control sample which was not treated with the sulphydryl-modifying reagents was assayed for ligand-binding activity in the same conditions. The ligand-binding susceptibility of the fusion protein to various N-substituted maleimides was tested as follows. Aliquots of crude bacterial extracts were diluted to 1:20 in 50 mM Tris-HCl, pH 7.40, and 150 mM NaCl and incubated with 10–100  $\mu\text{M}$  of the different maleimides (*N*-ethyl-, *N*-propyl-, *N*-hexyl-, *N*-benzyl-, and *N*-nonyl-substituted maleimides) for 5 min at 0 °C. The maleimide activity was then stopped, and retinoid-binding activity was measured.

The ligand-exchange assay was performed with a diluted bacterial extract previously incubated with 1  $\mu\text{M}$  RA for 16 h at 0 °C. The 0.5-mL aliquots were then treated or not with 2 mM NEM for 5 min at 0 °C, and the alkylation was stopped by the addition of 20 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Excesses of both RA and NEM were further eliminated by desalting the incubates on a small Ultrogel ACA 202 column. The excluded fractions were then pooled, left for 30 min at 0 °C, and finally incubated with 50 nM  $[^3\text{H}]\text{RA}$  for 4 h at 0 °C prior to specific retinoid-binding activity measurement.

**Construction of the pSVM-hRAR $\alpha$  Expression Vector.** The pHK1 vector was digested with *EcoRI*, and the resulting 2.9-kb fragment containing the entire hRAR $\alpha$  coding sequence was inserted into the pSVM-dhfr plasmid as follows. The unique *BglII* site of pSVM-dhfr separating the SV40 origin fragment from dhfr sequences was transformed into an *EcoRI* site. pSVM-dhfr was then partially digested with *EcoRI*,

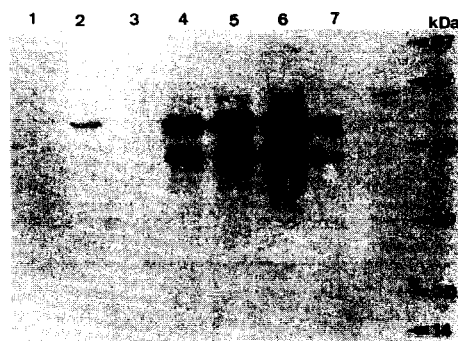


FIGURE 1: Expression of the fusion protein in *E. coli*. Before (lane 2) and after a 1-, 2-, 3-, or 4-h IPTG induction (lanes 4–7, respectively), JM109 cells transformed with pGEX-2T hRAR $\alpha$  LBD were lysed in SDS loading buffer; proteins were then resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel, blotted on a nitrocellulose filter, and then immunorevealed with the IS39 antiserum. The proteins on lane 1 were obtained from a lysate of *E. coli* transformed with pGEX-2T and submitted to a 3-h IPTG induction. Lane 3 corresponds to a lysate of the same transformed cells without IPTG induction. Molecular weight markers are indicated on the right side of the gel.

and the 2.9-kb fragment of pHK1 was inserted, giving the pSVM-hRAR $\alpha$  expression vector. Colonies were screened to isolate the DNA containing the hRAR $\alpha$  sequence in the correct orientation by restriction analysis.

**COS Cell Transfection and Nuclear Extract Preparation.** For transient expression of hRAR $\alpha$ , COS-7 cells were grown in DMEM containing 10% fetal calf serum (complete medium) and plated at 50% confluence ( $2.5 \times 10^6$ /dish) the day before transfection. Cells were then cotransfected with use of the calcium phosphate coprecipitation technique (Chen & Okayama, 1987) with the pSVM-hRAR $\alpha$  expression vector (10  $\mu$ g of plasmid/dish) together with 5  $\mu$ g of pRSV-GR. Sixteen hours after transfection, cells were washed and refed with complete medium containing  $10^{-6}$  M dexamethasone. Twenty-four hours later, cells were washed again, refed for 48 h, and collected in cold PBS with use of a rubber policeman. Cell nuclear extracts were then prepared according to the procedure described by Nervi *et al.* (1989). These extracts were subjected to ultrafiltration through an Amicon YM 30 membrane to eliminate protein contaminants of molecular mass lower than 30 kDa.

**Miscellaneous.** Glutathione *S*-transferase (GST) activity was assayed at 30 °C using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as substrate (Simons & Vander Jagt, 1977). Protein contents of the bacterial and cell nuclear extracts were determined with use of the Bradford assay (Bradford, 1986). Radioactivity was measured in a 1214 Rack  $\beta$  liquid scintillation counter (LKB-Wallac, Sweden) with Aqualyte as scintillation cocktail. Subzero temperatures were generated by a Huber HS40 cryostat.

## RESULTS

**Expression, Purification, and Characterization of the Fusion Protein.** JM109 cells transformed with the pGEX-2T-hRAR $\alpha$  LBD were induced by IPTG, and bacterial extracts were thereafter produced at various times. The expression of a protein with the 56-kDa molecular mass expected for the GST-hRAR $\alpha$  LBD fusion protein was observed between 1 and 4 h following induction. Western blot analysis of the various bacterial extracts clearly demonstrated that the IPTG-inducible, 56-kDa protein contained the hRAR $\alpha$  LBD, as it was recognized by the IS39 antiserum (Figure 1). However, another immunoreactive protein with an apparent  $M_r$  of 43 000 was observed in most experiments. This protein, representing 5–30% of the immunorevealed

material, corresponded probably to a proteolytic degradation of the full-length fusion protein.

The results of a representative purification experiment are summarized in Table I. About 86% of the fusion protein (quantified here by its retinoid-binding activity) was adsorbed to the affinity gel. Washing steps did not result in a significant loss of binding activity (data not shown). Even though a high and quite reproducible adsorption yield was obtained in most experiments, the elution yield was low, varying in a 3–16% range in five separate experiments, and resulted in an overall purification yield of 2–14%. Attempts to preserve the maximum ligand-binding capacity of the hRAR $\alpha$  LBD throughout the purification procedure appeared unsuccessful; in particular, no significant improvement was observed when the adsorption and the elution steps were performed in the presence of 40 nM RA (data not shown). The 45% yield of functional fusion protein expressed in terms of enzymatic activity contrasts with the 15-fold lower yield of retinoid-binding activity, suggesting a marked functional instability of the hRAR $\alpha$  LBD moiety of the fusion protein. This suggestion is in agreement with the calculated purification yield, which rises 8.5-fold when expressed by the retinoid-binding activity of the fusion protein, whereas it reaches 74-fold when expressed by its enzymatic activity. As indicated by Smith and Johnson (1988), who purified the GST by using the same glutathione-immobilized matrix, optimal yield elution (~90%) could be achieved by performing the elution at pH 9.6. However, an experiment performed at this pH with the GST-hRAR $\alpha$  LBD resulted in complete loss of retinoid-binding activity (data not shown). Analysis by SDS-PAGE and Coomassie blue staining of the affinity gel eluate revealed an apparently homogenous protein band (Figure 2) with the expected molecular mass of 56 kDa. This band was also revealed by the IS 39 antiserum, which, here again, detected the presence of a minor putative proteolytic fragment (lane 4).

**Thrombin Cleavage and Characterization of the Purified hRAR $\alpha$  LBD.** In all experiments, cleavage by thrombin was obtained, but its efficiency was variable. In the data reported in Figure 2, the cleavage was complete, giving a main protein species with an apparent  $M_r$  of 28 000 (Figure 2B, lane 1). Depending on the purification experiment, some minor protein contaminants were inconstantly observed in the affinity gel eluate. Despite the use of a 12% polyacrylamide gel, separation of the two cleaved protein moieties from the fusion protein (with calculated molecular masses of 27 and 29 kDa, respectively) could not be observed. The purified truncated receptor was analyzed by size-exclusion HPLC on a TSK G 3000 SW column. As shown in Figure 3, two [ $^3$ H]RA-hRAR $\alpha$  LBD species with respective Stokes radii of 3.7 (peak I) and 2.3 nm (peak II) were observed. These two eluted peaks were further analyzed by SDS-PAGE and western blotting (Figure 2B and C). Here again, an apparent unique protein component of ~28 kDa was seen. As shown by western blotting (Figure 2C), both peaks contained the hRAR $\alpha$  LBD. The apparent  $M_r$  of 68 000 of the receptor species eluted in peak I, the absence of GST activity in this peak (Figure 3), and the absence of 56-kDa immunorevealed protein (Figure 2C, track 2) can suggest that the purified hRAR $\alpha$  LBD forms homodimers. Such homodimers are not observed in culture cells *in vivo* (Nagpal *et al.*, 1993) but could correspond here to a facilitated *in vitro* dimerization of the purified hRAR $\alpha$  LBD at high concentration.

**Both the GST-hRAR $\alpha$  LBD and the Purified hRAR $\alpha$  LBD Are Functional Proteins.** The ligand-binding activity of the fusion protein obtained from a crude bacterial extract and

Table I: Purification and Quantitative Measurement of the GST-hRAR $\alpha$  LBD

step	volume (mL)	protein (mg/mL)	functional activity <sup>a</sup>		yield (%)	
			[ <sup>3</sup> H]RA binding (total, pmol)	GST activity (total, IU) <sup>b</sup>	[ <sup>3</sup> H]RA binding	GST activity
crude bacterial extract	55	4.6	3080	55.6	100	100
effluent	51	4.4	428	8.4	14	15
affinity gel eluate	2.8	0.55	154	25	5	45

<sup>a</sup> The functional activity of the fusion protein is measured as the retinoid-binding activity expressed in pmol or as the GST enzymatic activity expressed in international units. <sup>b</sup> IU, one unit of enzyme transforms one micromole of substrate per minute.

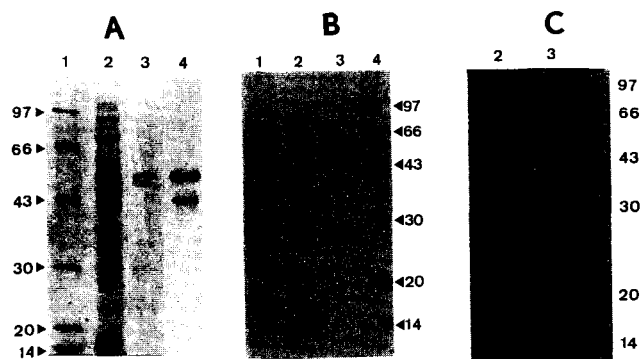


FIGURE 2: Characterization of the purified GST-hRAR $\alpha$  LBD and hRAR $\alpha$  LBD by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting. (A) The crude bacterial extract from JM109 cells transformed with pGEX-2T hRAR $\alpha$ LBD and the affinity gel eluate obtained following purification of the fusion protein GST-hRAR $\alpha$ LBD were submitted to SDS-PAGE. Lane 2: crude bacterial extract analyzed on a 10% polyacrylamide gel and stained by Coomassie blue. Lane 3: affinity gel eluate analyzed in the same conditions. Lane 4: western blot analysis of an affinity gel eluate with use of the IS39 anti-hRAR $\alpha$  antibody. (B) An affinity gel eluate submitted to thrombin cleavage (300 IU/mL for 16 h at 0 °C) was analyzed on a 12% polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue (lane 1). The eluted fractions corresponding to peaks I and II described in the experiment presented in Figure 3 were also analyzed (lanes 2 and 3, respectively). (C) Western blot analysis of the samples corresponding to peaks I and II (lanes 2 and 3, respectively). Molecular weight markers were analyzed in A (lane 1) and B (lane 4) and indicated on the right side of C.

from the purified cleaved hRAR $\alpha$  LBD were compared (Figure 4A and B). The deduced  $K_d$  values were similar (7 and 9 nM, respectively). A comparison was done by studying the equilibrium parameters of RA-binding to the full-length hRAR $\alpha$  overexpressed by transient transfection in COS cells. A  $K_d$  value of 15 nM was measured, indicating that the ligand-binding domain of the receptor had retained the full binding properties of the native receptor and that production of this domain as a fused protein to GST did not affect its ligand-binding properties. The possible interference of CRABP in the equilibrium parameters of RA-binding from COS cells, as mentioned by Cavey *et al.* (1990), was eliminated by ultrafiltration of the nuclear extracts through an Amicon YM30 membrane. Binding experiments were also performed with [<sup>3</sup>H]CD367, a chemically stable retinoid compound whose affinity toward hRAR $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  has been reported to be particularly high (Delescluse *et al.* 1991). Similar  $K_d$  values in the range 2–3 nM were obtained for both the intact and the cleaved fusion protein.

**Binding Kinetics Parameters.** At 0 °C, the association between the GST-hRAR $\alpha$  LBD and retinoids appeared extremely rapid. Therefore, experiments at subzero temperatures were undertaken to allow accurate assay of the rate of association of [<sup>3</sup>H]RA and [<sup>3</sup>H]CD367 to the recombinant receptor (Figure 5A). At all three temperatures studied, the reaction followed second-order kinetics. This was verified by measuring the rate at three different ligand concentrations (3, 10, and 20 nM). In all cases, second-order kinetics were

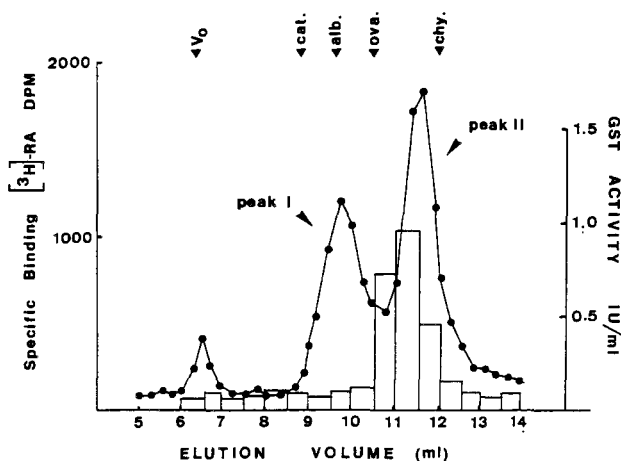


FIGURE 3: Analytical characterization of the purified hRAR $\alpha$  LBD by size-exclusion HPLC. A 0.16-mL aliquot of the thrombin-cleaved affinity gel eluate containing the [<sup>3</sup>H]RA-labeled hRAR $\alpha$  LBD was brought to 0.6 M KCl and injected onto a TSK G 3000 SW column equilibrated with 10 mM Tris-HCl, pH 7.20/150 mM NaCl/1 mM DTT. Fractions of 0.25 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL/min and assayed for both GST activity (histogram) and radioactivity content (●). Arrows indicate the positions of protein standards. Catalase, cat,  $R_s = 5.2$  nm; bovine serum albumin, alb.,  $R_s = 3.6$  nm; ovalbumin, ova.,  $R_s = 2.9$  nm, and chymotrypsinogen, chy.,  $R_s = 2.0$  nm.

observed (data not shown). Calculated values for the second-order rate constants of association derived from these data are given in Table II. The lower value observed for [<sup>3</sup>H]-CD367 may have been due to some differences in its molecular mechanisms of interaction with the receptor ligand-binding site. The dissociation reaction of the ligand from the recombinant receptor at 0 °C follows first-order kinetics and proceeds rapidly, with  $t_{1/2}$  of 35 and 45 min for retinoic acid and CD367, respectively (Figure 5B and Table II). At higher temperatures, this rate was too rapid to be measured accurately. The contribution of the rate constant for the loss of retinoid-binding capacity (inactivation rate) of the recombinant receptor was negligible ( $4.33 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  at 0 °C). The  $k_d$  values were approximately 3-fold lower at -10 °C than at 0 °C, and we can observe that the acceleration of the rate of dissociation caused by increasing temperature was higher for CD367 than for RA (Table II). The same phenomenon could be observed when we compare the variation of the rate of association of the receptor with the two ligands.

The transition-state thermodynamics of the forward reaction (association) were calculated as described before (Eliard & Rousseau, 1984). The free-energy change ( $\Delta G^\ddagger$ ) of the transition state can be expressed as  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger = RT \log_e k_a + RT \log_e (bT/h)$ , where  $b$  and  $h$  are the Boltzmann and the Planck constants, respectively. When calculated at -5 °C, these values were slightly different for the two ligands:  $\Delta G^\ddagger = +27.6$  and  $+29.7$  kJ/mol,  $\Delta H^\ddagger = +119$  and  $+150$  kJ/mol, and  $\Delta S^\ddagger = +339$  and  $+447$  J/mol for RA and CD367, respectively. In both cases, the enthalpy barrier was partially compensated for by the favorable entropy change. Apparently



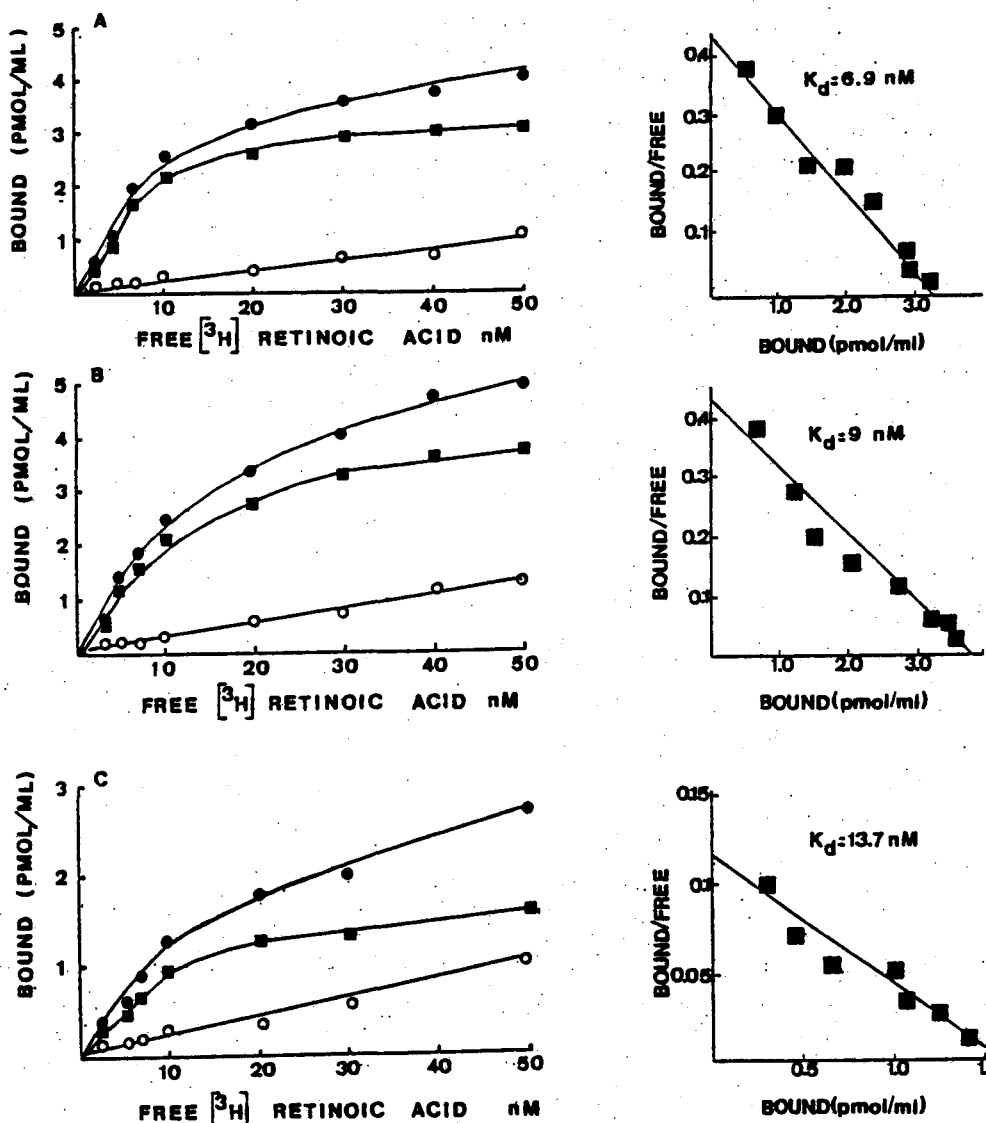


FIGURE 4:  $^3\text{H}$ RA binding activity.  $^3\text{H}$ RA saturation binding curves (left) and Scatchard plots (right) were determined (A) on the entire GST-hRAR $\alpha$  fusion protein, (B) on the purified hRAR $\alpha$  LBD polypeptide, and (C) on the full-length hRAR $\alpha$  obtained by transient transfection of COS cells with the pSVM-hRAR $\alpha$  vector. Total  $^3\text{H}$ RA-binding activity ( $\bullet$ ), nonspecific binding activity ( $\circ$ ), and calculated RAR-specific binding activity ( $\blacksquare$ ) are represented.

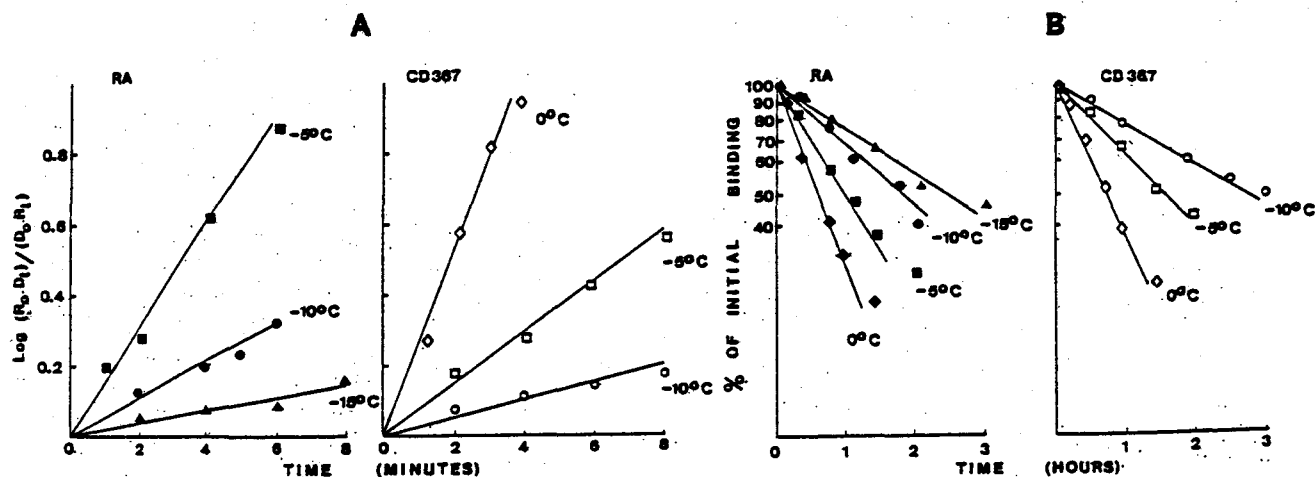


FIGURE 5: Kinetics of  $^3\text{H}$ retinoid binding to the recombinant GST-hRAR $\alpha$  LBD at different temperatures. (A) Rate of association. Aliquots of bacterial extracts were incubated with 30 nM of the tritiated retinoids (RA or CD367). At times varying from 1 to 8 min, the concentration of specifically bound  $^3\text{H}$ retinoid was determined by charcoal assay and used to calculate the concentration of free binding sites  $R_t$  and free retinoid  $D_t$  at the corresponding times  $t$ . (B) Rate of dissociation. Aliquots of the same extracts were incubated with 30 nM  $^3\text{H}$ retinoids before addition of a 1000-fold excess of unlabeled retinoids. At various times thereafter, aliquots were withdrawn to determine the amount of specifically bound  $^3\text{H}$ retinoid with use of the dextran-charcoal assay.

linear van't Hoff plots with negative slopes were obtained between 0  $^{\circ}\text{C}$  and -15  $^{\circ}\text{C}$  for both ligands (data not shown). Highly positive values were obtained at equilibrium for  $\Delta H$

(+69 and +57 kJ/mol for RA and CD367, respectively) and  $\Delta S$  (+433 and +386 J/mol, respectively), indicating that the interaction with the receptor was mainly entropy driven.

Table II: Kinetic Parameters of Retinoid Binding to the GST-hRAR $\alpha$  LBD<sup>a</sup>

retinoid	T (°C)	10 <sup>-6</sup> × k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	10 <sup>2</sup> × k <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>a</sub> /k <sub>d</sub> (nM)
RA	0	ND <sup>b</sup>	1.98	ND <sup>b</sup>
	-5	22	1.38	0.63
	-10	6.5	0.70	1.08
	-15	2.6	0.47	1.80
CD 367	0	38.4	1.54	0.40
	-5	9.5	0.73	0.77
	-10	3.2	0.40	1.25

<sup>a</sup> k<sub>a</sub> and k<sub>d</sub> values were calculated from the kinetic data reported in Figure 5. <sup>b</sup> Not determined.

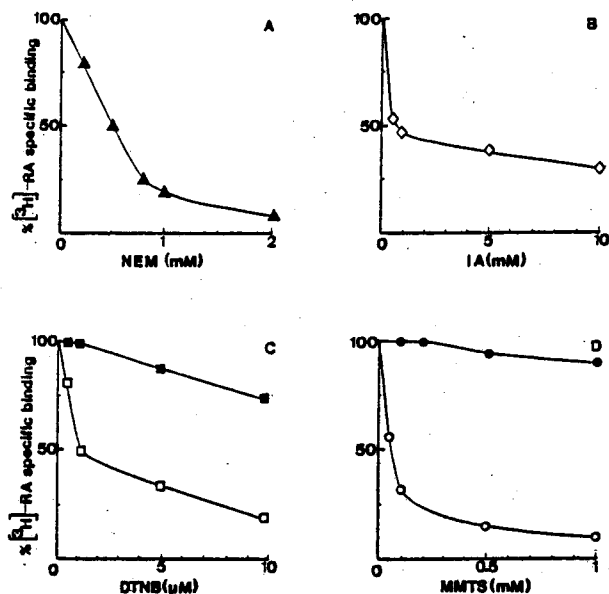


FIGURE 6: Inhibition of [<sup>3</sup>H]RA binding activity with sulfhydryl reagents. Crude bacterial extracts were incubated for 5 min at 0 °C with varying concentrations of sulfhydryl-modifying reagents: NEM (▲), IA (◇), DTNB (□), or MMTS (○). [<sup>3</sup>H]RA (20 nM) was then added, and specific [<sup>3</sup>H]RA binding was assayed by charcoal adsorption after a further 16-h incubation at 0 °C. Reversal by βME (■) or by DTT (●) of the DTNB- and MMTS-mediated [<sup>3</sup>H]-RA binding inhibition is represented on panels C and D, respectively. In both cases, the reducing agent was added at the end of the 5-min preincubation in the presence of DTNB or MMTS.

Exploration on a larger temperature range was precluded by practical limitations: at temperatures higher than 0 °C, association rates were too fast to be accurately measured, and below -15 °C, binding assays gave nonreproducible results, a problem probably related to the increasing viscosity of the incubation medium at very low temperatures.

**Effects of Sulfhydryl-Modifying Agents on [<sup>3</sup>H]RA Binding in Crude Bacterial Extracts.** Figure 6 shows the concentration dependence effects of four sulfhydryl reagents on retinoid binding. Among these reagents, DTNB appeared to be the most efficient (50% reduction in RA-specific binding at a 1 μM concentration), whereas IA was less active. The maximal effect was obtained at a DTNB concentration of 100 μM (data not shown). Since IA and NEM are not highly specific for the sulfhydryl groups of cysteine but can also react with the amine groups of lysine, we also used two other reagents, DTNB and MMTS, which are very specific for sulfhydryl groups. The pronounced effect obtained with DTNB and MMTS and its almost complete reversal with reducers like β-mercaptoethanol and dithiothreitol acting through thiol-disulfide interchanges strongly suggests that one or several SH groups are involved in the retinoid-binding activity of hRAR $\alpha$ . Moreover, sodium arsenite was also tested

in the 0–100 mM range but was inefficient at inactivating the retinoid-binding activity of the receptor (data not shown), suggesting that vicinal dithiols may not be involved in the interaction of the receptor with its retinoid ligand. When crude bacterial extracts were incubated with 20 nM [<sup>3</sup>H]RA for 2 h and treated with increasing concentrations of NEM (0–2 mM) for 5 min at 0 °C, we did not observe any significant reduction in the retinoid-binding activity. Thus, preformed [<sup>3</sup>H]RA-hRAR $\alpha$  LBD complexes appeared insensitive to NEM treatment, suggesting that the ligand could protect the essential sulfhydryl group(s) from alkylation. This protection effect was further documented by experiments using a retinoid exchange assay as described in experimental procedures: [<sup>3</sup>H]-RA could be exchanged with unlabeled RA in preformed RA-hRAR $\alpha$  LBD complexes, even when these complexes had been submitted to NEM treatment (data not shown). These results suggest that the essential sulfhydryl group(s) could lie in the retinoid binding site itself.

A further indirect evidence sustaining this hypothesis was afforded by preliminary experiments performed with *N*-aryl- and *N*-alkylmaleimides of various chain lengths.

Among them, *N*-nonylmaleimide appeared to be the most efficient (50% reduction in RA-specific binding at about 15 μM), whereas *N*-propyl-, *N*-hexyl-, and *N*-benzylmaleimides were less active, i.e., the same inactivation effect was obtained at about 35 μM for *N*-hexyl- and *N*-benzylmaleimides or at about 200 μM for *N*-propylmaleimide. The higher efficiency of *N*-nonylmaleimide could be explained by hydrophobic interactions between the surroundings of the sulfhydryl group(s) to be alkylated and the side chain of the maleimide (Formstecher *et al.* 1984). This result is compatible with a location of these sulfhydryl group(s) in the retinoid binding groove, which is expected to be globally hydrophobic. However, a precise interpretation of these data needs further work.

## DISCUSSION

Availability of substantial quantities of RAR protein appears to be essential for investigating thoroughly their structure and function, particularly their DNA- and ligand-binding domains. Purification of RARs from natural tissues or cells is difficult to achieve because of their low natural abundance (Nervi *et al.* 1989). Therefore, only limited attempts have been reported (Kagechika *et al.* 1988; Sani *et al.* 1990). Recent reports have demonstrated that functional RARs displaying intact DNA and ligand-binding properties (Crettaz *et al.* 1990; Yang *et al.* 1991; Keidel *et al.* 1992) could be expressed in *E. coli*. However, no purification data were reported. Using a fusion expression vector, we have produced in *E. coli* and purified a truncated hRAR $\alpha$  including the E and F domains. This choice offers two advantages: (i) the reasonable size of the fusion protein limits problems of insolubility and (ii) a functional truncated receptor represents a valuable tool for further structural studies on the retinoid-binding site. Purification was achieved by using the properties of the affinity tail GST which could be retained on an immobilized glutathione affinity matrix. This system was already used to produce and purify recombinant proteins, but the published data concerning purification and production yield are scarce and incomplete (Smith & Johnson, 1988; Zhu *et al.* 1989; Guan & Dixon, 1991). The hRAR $\alpha$  LBD can be cleaved from the fusion protein and still retains its ligand-binding capacity.

The functional properties of the hRAR $\alpha$  LBD were examined to determine whether the bacterially-expressed truncated receptor could bind its cognate ligand with the same

affinity as the native receptor. The data obtained are close to those found by others, who expressed the hRAR $\alpha$  LBD with a different bacterial expression system (Crettaz *et al.* 1990); but  $K_d$  was higher than the values reported by Yang *et al.* (1991) and Keidel *et al.* (1992), who expressed the full-length hRAR $\alpha$  in *E. coli*. Thus, the conditions used for ligand-binding measurements which differ throughout these studies can explain these discrepancies. A systematic study of the various technical parameters governing the dextran charcoal assay efficiency confirms this assumption (B. Sablonnière *et al.* unpublished data). Moreover,  $K_d$  values calculated with use of the rate constants  $k_a$  and  $k_d$  determined in kinetic experiments were lower than those obtained by measurement at equilibrium. We therefore believed that  $k_d/k_a$  values represent a better estimation of the actual dissociation constant. Of course, the binding kinetic parameters have been measured on the entire GST-hRAR $\alpha$  LBD and could not reflect correctly the behavior of the truncated receptor. This choice has been made owing to the high instability of the purified truncated receptor and to the very low yield of the thrombin cleavage of the crude recombinant protein. The  $K_d$  value of the full-length hRAR $\alpha$  in COS cells was in the same range as that in *E. coli* and was in agreement with previously published values determined from the cloned hRAR $\alpha$  expressed in eukaryotic cells (Brand *et al.* 1988; Cavey *et al.* 1990; Delesciuse *et al.* 1991). Thus, the differences in posttranslational modifications that occurred in *E. coli* versus eukaryotic cells were not detrimental to the expression of intact receptor molecules.

The fact that  $\Delta S^\ddagger$  is positive for the two tested ligands is further evidence that the driving forces for the formation of the transition state are mainly hydrophobic. Moreover, the higher value for  $\Delta S^\ddagger$  observed in case in CD367 as compared to RA clearly suggest, as expected, that stronger hydrophobic interactions would be involved in CD367 receptor binding. At low temperatures, the retinoid-receptor interaction is mainly entropy driven, as already described with the glucocorticoid receptor (Wolff *et al.* 1978; Eliard & Rousseau, 1984). Binding data reveal that only 1.5 nmol of functional GST-hRAR $\alpha$  LBD could be produced per liter of bacterial culture. This production can be compared to those described for the ligand-binding domains of other members of the nuclear receptor family: it is lower than that of the progesterone receptor (Power *et al.*, 1990; Eul *et al.* 1989) but in the same range as those of the androgen (Young *et al.* 1990) and the thyroid hormone receptors (Lin *et al.* 1990). These discrepancies in the expression level could be due either to the expression vector chosen or to differences in posttranslational modifications of the receptor. The peculiar lability of the ligand-binding activity of purified recombinant RAR $\alpha$  has already been stressed by others (Keidel *et al.* 1992). However, the expression level obtained here corresponds to a specific-binding activity of 12 pmol/mg from the crude bacterial extract, which is 40–50-fold more than the level found from natural cells (Nervi *et al.* 1989).

Interestingly, hRAR $\alpha$  ligand-binding activity appears to be sensitive to sulfhydryl-modifying reagents. These results clearly suggest that cysteines are involved in the binding of RA by the hRAR $\alpha$  ligand-binding domain. RAR susceptibility toward sulfhydryl-modifying reagents has already been mentioned by Sani *et al.* (1990), who reported that the [ $^3$ H]-RA binding activity of RARs from chick skin could be completely inhibited by *p*-(chloromercuri)benzenesulfonic acid. Sulfhydryl-modifying agents have also been reported to inhibit the ligand-binding activity of CRABP (Sani &

Banerjee, 1978) and of several members of the steroid receptor superfamily (Jansen *et al.* 1967; Young *et al.* 1975; Coty, 1980). The involvement of vicinal dithiol (Simons *et al.* 1990) and the role of a putative intramolecular disulfide bond (Bresnick *et al.* 1988) have been evoked for the glucocorticoid receptor. Direct identification of modified cysteine residues in the ligand-binding domain has been achieved by affinity labeling for the estrogen and glucocorticoid receptors (Simons *et al.* 1987; Carlstedt-Duke *et al.* 1988; Harlow *et al.* 1989) and further documented by the study of receptor mutants (Byravan *et al.* 1991). Contrasting with this clear demonstration of the paramount importance of thiol groups in the ligand-binding activity of steroid receptors, the study of the role of these groups in RAR function is just beginning. Our data suggest that an overall hydrophobicity of the sulfhydryl-modifying agent is necessary to improve its binding to the receptor. Thus, an essential thiol group of the receptor located in a short proximity or inside the ligand-binding site is probably responsible for the observed results. These results are reminiscent of those previously observed with the glucocorticoid receptor (Formstecher *et al.* 1984). The hRAR $\alpha$  LBD contains six cysteine residues, and work is now in progress to identify further their respective implication in RA binding.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. R. M. Evans for his kind gift of the pHK1 and pRSV-GR expression vectors. We also thank Dr. G. Ringold for pSVM-dhfr. We would like to acknowledge Mr. L. Dujardin and Ms. F. Delporte for skillful technical help and Ms. S. Tournay for her excellent secretarial assistance. We are also indebted to Dr. B. Shroot for the generous gift of CD367.

#### REFERENCES

- Amatruda, T. T., & Koeffler, H. P. (1986) in *Retinoids and cell differentiation* (Sherman, M. L., Ed.) pp 79–103, CRC Press, Boca-Raton, FL.
- Asselineau, D., Bernard, B. A., Bailly, C., & Darmon M. (1989) *Dev. Biol.* 133, 322–335.
- Benbrook, D. E., Lernhardt, E., & Pfahl, M. (1988) *Nature* 333, 669–672.
- Bollag, W., & Hartmann, H. R. (1983) *Cancer Surv.* 2, 293–314.
- Bradford, M. (1986) *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brand, N., Petkovitch, M., Krust, A., Chambon, P., De thé, H., Marchio, A., Tiollais, P., & Dejean, A. (1988) *Nature* 332, 850–853.
- Bresnick, E. H., Sanchez, E. R., Harrison, R. W., & Pratt, W. P. (1988) *Biochemistry* 27, 2866–2872.
- Brockes, J. P. (1990) *Nature* 345, 766–768.
- Byravan, S., Milhon, J., Rabindran, S. K., Olinger, B., Garabedian, M. J., Danielsen, M., & Stallcup, M. (1991) *Mol. Endocrinol.* 5, 752–758.
- Carlstedt-Duke, J., Strömstedt, P. E., Persson, B., Cederlund, E., Gustafsson, J. A., & Jörnvall, A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6842–6846.
- Cava, M. P., Deana, A. A., Muth, K., & Mitchell, M. J. (1961) *Org. Synth.* 41, 93–95.
- Cavey, M. T., Martin, B., Carlavan, L., & Shroot, B. (1990) *Anal. Biochem.* 186, 19–23.
- Chambon, P., Zelent, A., Petkovitch, M., Mendelsohn, C., Leroy, P., Krust, A., Kastner, P., & Brand, N. (1991) in *Retinoids 10 years on* (Saurat, S. H., Ed.), pp 10–27, Karger, Basel.
- Chen, C., & Okayama, H. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7, 2745–2752.
- Chomienne, C., Ballerini, P., Balitrand, P., Amar, M., Bernard, J. F., Boivin, P., Daniel, M. T., Berger, R., Castaigne, S., & Degos, L. (1989) *Lancet*, 746–747.

- Coty, W. A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8035-8037.
- Crettaz, M., Baron, A., Siegenthaler, G., & Hunziker, W. (1990) *Biochem. J.* 272, 391-397.
- de Thé, A., Marchio, A., Tiollais, P., Dejean, A. (1987) *Nature* 330, 624-629.
- de Thé, H., Vivanco-Ruiz, M., Tiollais, P., Stunnenberg, H., & Dejean, A. (1990) *Nature* 343, 177-180.
- Delescluse, C., Cavey, M.T., Martin, B., Bernard, B.A., Reichert, J., Maignan, J., Darmon, M., & Shroot, B. (1991) *Mol. Pharmacol.* 40, 556-562.
- Durston, A. J., Timmerman, J. P. M., Hage, W. J., Hendricks, H. F. J., De Vries, W. J., Heideveld, M., & Nieuwkoop, P. D. (1989) *Nature* 340, 140-144.
- Eichele, G. (1989) *Trends Genet.* 5, 246-251.
- Eliard, P. H., & Rousseau, G. G. (1984) *Biochem. J.* 218, 395-404.
- Eul, J., Meyer, M. E., Tora, L., Bocquel, M. T., Quirin-Stricker, C., Chambon, P., & Gronemeyer, H. (1989) *EMBO J.* 8, 83-90.
- Evans, R. M. (1988) *Science* 240, 889-895.
- Formstecher, P., Dumur, V., Idziorek, T., Danze, P. M., Sablonniere, B., & Dautrevaux, M. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 802, 306-313.
- Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P., & Evans, R. M. (1987) *Nature* 330, 624-629. Green, S., & Chambon, P. (1988) *Trends Genet.* 4, 309-314.
- Guan, K. L., & Dixon, J. E. (1991) *Anal. Biochem.* 192, 262-267.
- Hamada, K., Gleason, S. L., Levi, B. Z., Hirshfeld, S., Apella, E., & Ozato, K. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8289-8293.
- Harlow, K. W., Smith, D. N., Katzenellenbogen, J. A., Greene, G. L., & Katzenellenbogen, B. S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 17476-17485.
- Heitz, J. R., Anderson, C. D., & Anderson, B. M. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 127, 627-636.
- Janssen, E. V., Hurst, D. J., De Sombre, E. R., & Jungblut, P. W. (1967) *Science* 158, 385-387.
- Kagechika, H., Hashimoto, Y., Kawachi, E., & Shudo, K. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 503-508.
- Keidel, S., Rupp, E., & Szardenings, M. (1992) *Eur. J. Biochem.* 204, 1141-1148.
- Krust, A., Kastner, P., Petkovitch, M., Zelent, A., & Chambon, P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5310-5314.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
- Lehmann, J. M., Dawson, M. L., Hobbs, P. D., Husmann, M., & Pfahl, M. (1991) *Cancer Res.* 51, 4804-4809.
- Leroy, P., Krust, A., Zelent, A., Mendelsohn, C., Garnier, J. M., Kastner, P., Dierich, A., & Chambon, P. (1991) *EMBO J.* 10, 59-69.
- Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazner, S., Bosakowski, T., Huseilton, C., Delenby, G., Speck, J., Kratzseisen, A., Rosenberg, M., Lovey, A., & Grippo, J. F. (1992) *Nature* 335, 359-361.
- Lin, K. H., Fukuda, T., & Cheng, S. Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 5159-5165.
- Kippman, S. M., Kessler, J. F., & Meyskens, F. L. (1987) *Cancer Treat. Rep.* 71, 395-405.
- Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A., & Evans, R. M. (1990) *Nature* 345, 224-229.
- Moon, R. C., & Mehta, R. G. (1990) in *Chemistry and biology of synthetic Retinoids* (Dawson, M. L., & Okamura, W. H., Eds.) pp 501-518, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., & Chambon, P. (1993) *EMBO J.* 12, 2349-2360.
- Nervi, C., Grippo, J. F., Sherman, M., George, M. D., & Jetten, A. M. (1989) *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 86, 5854-5858.
- Nicholson, R. C., Mader, S., Nagpal, S., Leid, M., Rochette-Egly, C., & Chambon, P. (1990) *EMBO J.* 9, 4443-4454.
- Paulsen, D. E., Langille, R. M., Dress, V., & Solursh, M. (1988) *Differentiation* 39, 123-130.
- Peck, G. L. (1983) *Cancer Surv.* 2, 315-326.
- Petkovitch, M., Brand, N. J., Krust, A., & Chambon, P. (1987) *Nature* 330, 444-450.
- Porath, J. (1963) *Pure Appl. Chem.* 6, 233-241.
- Power, R. F., Conneely, O. M., McDonnell, D. P., Clark, J. H., Butt, T. R., Shrader, W. T., & O'Malley, B. W. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1419-1424.
- Sablonniere, B., Economidis, I. V., Lefebvre, P., Place, M., Richard, C., Formstecher, P., Rousseau, G. G., & Dautrevaux, M. (1988) *Eur. J. Biochem.* 177, 371-382.
- Sablonniere, B., Dallery, N., Danzé, P. M., Hublau, P., Formstecher, P., & Dautrevaux, M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* (in press).
- Sani, B. P., & Banerjee, C. K. (1978) *Biochem. J.* 273, 643-649.
- Sani, B. P., Singh, R. K., Reddy, L. G., & Gaub, M. P. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 107-113.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Yang, N., Klierer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Verma, I. M., & Evans, R. M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 6092-6096.
- Shapiro, S. S. (1980) in *Retinoids and Cell Differentiation* (Sherman, M. I., Ed.) pp 29-60, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Simons, P. C., & Vander Jagt, D. L. (1977) *Anal. Biochem.* 82, 334-341.
- Simons, P. C., Pumphrey, J. G., Rudikoff, S., & Eisen, H. J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9676-9680.
- Simons, S. S., Chakraborti, P. K., & Cavanaugh, A. H. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1938-1945.
- Smith, D. B., & Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67, 31-40.
- Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1984) in *The Retinoids* (Sporn, M. B., Roberts, A. B., & Goodman, D. S., Eds.) Vol. 2, pp 235-279, Academic Press, Orlando, FL.
- Sporn, M. B., Dunlop, N. M., Newton, D. L., & Smith, J. M. (1976) *Fed. Proc.* 35, 1332-1340.
- Sucov, H. M., Murakami, K. K., & Evans, R. M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5392-5398.
- Summerbell, D., & Maden, M. (1990) *Trends Neurosci.* 13, 142-147.
- Umesono, M., Murakami, K. K., Thompson, C. C., & Evans, R. M. (1991) *Cell* 65, 1255-1266.
- Vasios, G. W., Gold, J. D., Petkovitch, M., Chambon, P., & Gudas, L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9099-9103.
- Wolff, M., Baxter, J. D., Kollman, A., Lee, D. L., Kuntz, I. D., Bloom, E., Matulich, D. T., & Morrins, J. (1978) *Biochemistry* 17, 3201-3208.
- Yang, N., Schüle, R., Mangelsdorf, D., & Evans, R. M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3559-3563.
- Young, H. A., Parks, W. P., & Scolnick, E. M. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3060-3064.
- Young, C. Y. F., Giu, S., Perscott, J. L., Tindall, D. J. (1990) *Mol. Endocrinol.* 4, 1841-1849.
- Zelent, A., Krust, A., Petkovitch, M., Kastner, P., Chambon, P. (1989) *Nature* 339, 714-717.
- Zhu, Z., Andrisani, O. M., Pot, D. A., Dixon, J. E. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 6550-6556.

### C) DISCUSSION:

Nous avons donc exprimé les domaines E/F de RAR $\alpha$ , fusionnés à la glutathion-S-transférase, puis isolés par clivage à la thrombine. Après adsorption sur la colonne de glutathion immobilisé, la protéine recombinante est purifiée à 90 % d'homogénéité avec une activité spécifique de 100 pmol/mg et un rendement de purification de 10 %.

Pendant la réalisation de notre travail, d'autres résultats concernant l'expression de RAR ou de RXR ont été publiés. Plusieurs équipes ont utilisé le système *Escherichia coli* afin de disposer du matériel nécessaire à leurs études de relations structure-affinité. Les résultats rapportés concernent essentiellement des valeurs de constante d'affinité mais il existe peu de données sur le taux de fonctionnalité ou la purification des récepteurs exprimés.

Ces auteurs ont exprimé soit un récepteur entier (Yang *et al.*, 1991; Keidel *et al.*, 1992; Fukasawa *et al.*, 1993; Repa *et al.*, 1993; Lombardo *et al.*, 1994), soit le domaine de liaison au ligand seul (Crettaz *et al.*, 1990; Fukasawa *et al.*, 1993). La production de RAR $\alpha$  recombinant est estimée à 20 % des protéines totales par Yang *et al.* (1991). Crettaz *et al.* (1990) observent que 1 à 5 % seulement de la protéine surexprimée se trouve dans la fraction soluble. RAR $\beta$  fusionné à la protéine de liaison du maltose peut être purifié en une seule étape par chromatographie d'affinité mais les auteurs sont confrontés à un problème de contamination par une protéine de plus faible poids moléculaire que la protéine de fusion, dont l'expression résulterait d'une terminaison précoce de la transcription ou d'une dégradation protéolytique (Lombardo *et al.*, 1994). Nous avons également été confrontée à ce problème.

Les RAR et RXR ont également été surexprimés dans les cellules d'insectes grâce au système baculovirus, avec des rendements similaires aux autres récepteurs stéroïdiens:  $2 \cdot 10^6$  molécules par cellule, soit 2000 fois plus que l'expression naturelle, pour Reddy *et al.* (1992), 0,05 à 0,2 % des protéines totales pour Ross *et al.* (1992) et Allegretto *et al.* (1993). RAR $\gamma$  est purifié 300 fois en trois étapes (Reddy *et al.*, 1992). Les trois formes de RAR également exprimées dans baculovirus sont purifiées par chromatographie d'affinité avec un taux de purification variant de 65 à 94 fois et un rendement de 2,3 à 49 % suivant le récepteur (Bourguet *et al.*, 1992). Exprimés dans les levures, RAR et RXR représentent 0,1 à 0,5 % des protéines solubles (Allegretto *et al.*, 1993).

La mesure de l'activité de liaison de notre protéine recombinante révèle que 1,5 nmol seulement de protéine de fusion fonctionnelle peut être produite par litre de culture. Ce rendement est inférieur à celui obtenu pour le PR par Power *et al.* (1990) et Eul *et al.* (1989), mais il est du même ordre que celui observé pour AR (Young *et al.*, 1990) ou TR (Lin *et al.*, 1990). Les RAR et RXR exprimés dans les levures, et non purifiés, présentent une assez bonne fonctionnalité puisque 30 à 60% des récepteurs recombinants sont fonctionnels (Allegretto *et al.*, 1993). Par contre, Reddy *et al.* (1992) montrent que l'activité spécifique pour RAR $\gamma$  purifié rend compte d'une pureté de 10 %, alors qu'elle peut être estimée à 50 % en analysant les protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration au bleu de Coomassie. La purification entraîne souvent une perte importante de la fonctionnalité du récepteur. Parfois, cette purification nécessite une étape de dénaturation. Le problème de renaturation se pose alors.

La plupart des études de relation structure-affinité ou structure-activité ont été réalisées à l'aide de récepteurs entiers exprimés dans les cellules de mammifères COS (Cavey *et al.*, 1990; Crettaz *et al.*, 1990; Delescluse *et al.*, 1991; Apfel *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1992; Allenby *et al.*, 1993), CV-1 (Lehmann *et al.*, 1991), ou HeLa (Hashimoto *et al.*, 1990). La transfection permet d'augmenter de 40 (Delescluse *et al.*, 1991) à 140 fois le nombre de sites de liaison (Cavey *et al.*, 1990).

Les constantes d'affinité mesurées pour les rétinoïdes naturels ou synthétiques varient plus ou moins selon les protocoles utilisés par les auteurs pour la mesure de l'activité de liaison. Le tableau 2 compare nos résultats aux constantes de dissociation (en nM) mesurées pour l'acide rétinoïque par les différentes équipes.

La constante de dissociation que nous avons mesurée se place dans les mesures rapportées par les différents auteurs. Elle est inférieure à celle mesurée par Delescluse *et al.* (1991) ou Bernard *et al.* (1992). Elle est proche de celle rapportée par Crettaz *et al.* (1990), Cavey *et al.* (1990) ou Fukasawa *et al.* (1993) mais plus élevée que celle de Yang *et al.* (1991), Keidel *et al.* (1992) ou Allegretto *et al.* (1993). Ces auteurs ont exprimé le récepteur entier dans *E. coli* (Yang *et al.*, 1991; Keidel *et al.*, 1992) ou dans des cellules d'insectes (Allegretto *et al.*, 1993). La différence observée ne peut être attribuée à une différence de modifications post-traductionnelles puisque Keidel *et al.* et Allegretto *et al.* obtiennent des Kd très proches avec des systèmes d'expression différents (procaryotes et eucaryotes). Cette différence peut être due aux conditions expérimentales de l'étude de l'activité de liaison mais également à une différence d'affinité du domaine E seul par rapport au récepteur entier. Cela a été observé pour les domaines E/F d'autres récepteurs

Système d'expression	RAR $\alpha$	RAR $\beta$	RAR $\gamma$	Référence
<i>Escherichia coli</i>	9 (HBD)			Résultat personnel
	6,9 (fusion)			"
	6,2 (HBD)	8 (HBD)		Crettaz <i>et al.</i> , 1990
	2,1			Yang <i>et al.</i> , 1991
	0,67			Keidel <i>et al.</i> , 1992
	6 (HBD)	0,27 (HBD)	0,27	Fukasawa <i>et al.</i> , 1993
	0,4	0,8	3,3	Repa <i>et al.</i> , 1993
Cellules de mammifères		0,34		Lombardo <i>et al.</i> , 1994
	10			Cavey <i>et al.</i> , 1990
	6,1	7,6		Crettaz <i>et al.</i> , 1990
	13	5,5	3,5	Delescluse <i>et al.</i> , 1991
Cellules d'insectes	15,5	4,5	3	Bernard <i>et al.</i> , 1992
			0,15	Reddy <i>et al.</i> , 1992
			2,1	Ross <i>et al.</i> , 1992
	0,37	0,37	0,22	Allegretto <i>et al.</i> , 1993

Tableau 2: Constantes d'affinité (nM) de l'acide rétinoïque pour les différents RAR recombinants

nucléaires. Pour le TR, le domaine D est d'ailleurs indispensable à une bonne activité de liaison de la partie C-terminale (Horowitz *et al.*, 1989).

Tous les systèmes d'expression utilisés présentent bien sûr des avantages et des inconvénients. Les problèmes de solubilité et de fonctionnalité sont rencontrés dans tous les cas, avec des degrés variables. Un point très important à signaler est que le faible taux de fonctionnalité ne s'accompagne pas d'une faible affinité du récepteur recombinant pour les ligands. Le récepteur recombinant fonctionnel, même s'il se trouve en faible quantité, présente une très bonne activité de liaison. Cela constitue évidemment une qualité essentielle à l'utilisation des protéines exprimées.



CHAPITRE 4:

*CARACTERISATION D'ACIDES AMINÉS  
IMPLIQUES DANS LA LIAISON  
RARE- $\alpha$ -LIGAND.*

## A) INTRODUCTION :

L'objectif de notre travail, et donc le but de la mise au point de la purification du domaine E de RAR $\alpha$ , est la détermination des acides aminés du site actif. Nous avons débuté l'étude du rôle des cystéines et des arginines dans l'interaction récepteur-ligand par les techniques classiques de biochimie, c'est-à-dire en observant l'effet des réactifs spécifiques de ces groupes d'acides aminés. L'identification de la (ou des) cystéine(s) potentiellement située(s) dans le site actif a ensuite été abordée par l'utilisation d'une technique plus récente, la spectrométrie de masse en mode électrospray.

## B) RESULTATS ET DISCUSSION :

### 1) *Les cystéines :*

Dans l'article précédent, nous avons mis en évidence une diminution plus ou moins importante de l'activité de liaison en présence de réactifs spécifiques des thiols. Nous avons également montré que le ligand protège le site actif vis-à-vis de ces réactifs. Sani *et al.* (1990) ont rapporté une inhibition complète de la liaison en présence d'acide p-chloromercuribenzène sulfonique. Dans notre étude, le DTNB s'est montré le plus actif, alors que l'iodoacétamide est moins puissante.

Il est possible de préciser l'environnement des cystéines modifiées en comparant l'effet de maléimides substituées par un groupement plus ou moins hydrophobe sur l'activité de liaison. Dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes, cette approche a permis de montrer que les thiols modifiés par les maléimides se trouvent dans un environnement hydrophobe et supposé être le site actif du domaine E de ce récepteur (Formstecher *et al.*, 1984). Dans le cas de la protéine de fusion utilisée, les N-alkylamides testées présentent un effet d'autant plus important que la chaîne du groupement substituant est longue. Ce phénomène a d'ailleurs été observé pour les trois RAR exprimés dans le système baculovirus (Fig. 28). L'absence d'inactivation par la phénylmaléimide à ces concentrations peut s'expliquer par la rigidité de la molécule bicyclique. Les réactifs présentant un caractère hydrophobe plus important sont donc plus actifs. Ces résultats préliminaires sur l'importance des thiols dans la liaison RAR-ligand suggèrent qu'une (ou des) cystéine(s), située(s) à proximité ou dans le site de liaison, est (sont) responsable(s) des effets observés.

L'identification de cette (ces) cystéine(s) peut être abordée de différentes façons : par mutagenèse dirigée ou par analyse des peptides obtenus après coupure

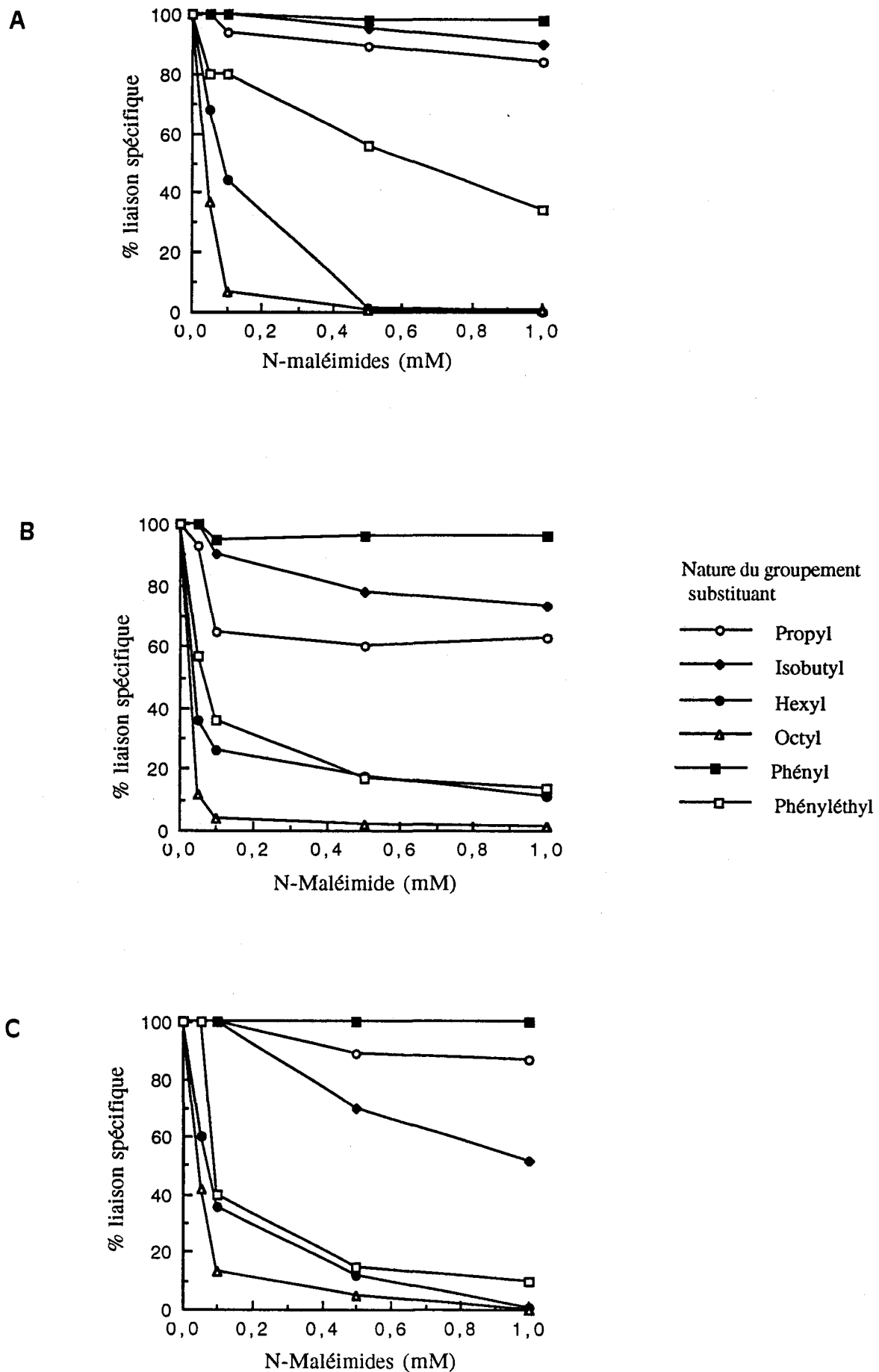


Fig.28: Effet des N-maléimides sur l'activité de liaison des RAR alpha (A), beta (B) et gamma (C).

enzymatique ou chimique de la protéine modifiée par un réactif spécifique des thiols ou par marquage d'affinité. Notre équipe a choisi de tenter une approche indirecte qui utilise la Spectrométrie de Masse (SM).

#### a) Principe de notre démarche :

Le service commun de physicochimie de l'Université de Lille II dispose d'un spectromètre de masse en mode électrospray qui permet de déterminer la masse moléculaire des macromolécules et en particulier des polypeptides avec une très grande précision. Le principe de ce type de SM repose sur l'application d'une différence de potentiel élevée entre le site d'injection et l'orifice du spectromètre. Cette différence de potentiel provoque la formation d'un faisceau de gouttelettes (ou "spray") très chargées (positives ou négatives selon le mode choisi). L'évaporation du solvant des gouttelettes s'accompagne de la formation d'ions. Ceux-ci sont alors introduits dans l'analyseur où ils vont être séparés en fonction du rapport  $m/z$  avant d'atteindre le détecteur. Le principal avantage de cette technique est la formation d'ions multichargés  $(M+nH)^{n+}$  en mode positif et  $(M-nH)^{n-}$  en mode négatif. Comme le spectromètre de masse mesure des rapports  $m/z$ , une protéine de 30000 Da, et chargée 30 fois par exemple, apparaîtra sur le spectre à une valeur de 1001 u.m.a., ce qui est à la portée de l'analyseur utilisé (la valeur limite étant 2400 u.m.a.).

La première étape de notre travail consistait en la détermination de la masse moléculaire de notre protéine avant et après alkylation en absence ou en présence du ligand. Cette étape devait nous permettre de déterminer le nombre de résidus de cystéine situés dans le site actif et protégés de l'alkylation par le ligand.

La seconde étape consistait en l'hydrolyse enzymatique ou chimique de la protéine alkylée en présence ou non du ligand. Après purification des peptides obtenus, la comparaison de leur masse, après alkylation en absence ou en présence du ligand, devait nous permettre de localiser les cystéines protégées par le ligand et supposées essentielles à l'activité de liaison.

#### b) Résultats de la spectrométrie de masse :

Les nombreux essais de détermination de la masse moléculaire de la protéine de fusion GST-RAR $\alpha$ LBD se sont avérés infructueux. Nous avons également utilisé, sans davantage de succès, une autre protéine recombinante : le domaine E fusionné à un peptide contenant six résidus d'histidine dont le vecteur d'expression a été construit par Bruno Lefebvre, étudiant en thèse au laboratoire. Cette protéine,

$\Delta$ N186-462 peut être purifiée à homogénéité sous forme dénaturée en une seule étape par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel immobilisé.

Avec l'aide du Docteur D. Belaïche, nous avons d'abord mis au point les conditions de préparation des échantillons en vue de l'analyse en spectrométrie de masse. En effet, cette technique exige l'absence de sels. Avant d'être lyophilisé, l'échantillon protéique est dialysé pendant au moins 48 h contre une solution d'HCl 0,01 N régulièrement renouvelée. Ces conditions permettent d'éviter l'agrégation de la protéine, qui se produit lorsque la dialyse est effectuée contre de l'eau.

Nous avons ensuite été confrontée à un problème de solubilité des protéines dans le tampon généralement utilisé en spectrométrie de masse (acétonitrile 20 %, acide formique 0,1 %). De nombreuses conditions ont été testées. Le pourcentage d'acétonitrile ou d'acide formique a été augmenté. Les protéines n'ont pu être solubilisées dans l'hexafluoro-2-propanol, dans un mélange propanol/acide trifluoroacétique (TFA), ou dans le DMSO. Elles ne sont, en fait, solubles que dans une solution d'acide formique à 90 %, ce qui est heureusement tout à fait compatible avec la technique utilisée.

La mise au point de ces conditions n'a pas suffi à obtenir un spectre permettant de déterminer la masse moléculaire des protéines alkylées ou non. Il est très difficile d'expliquer les raisons de cet échec. La technique de spectrométrie de masse utilisée (électrospray en mode positif) est basée sur la protonation des résidus basiques. La protéine de fusion GST-RAR $\alpha$ LBD contient 77 résidus susceptibles d'être ionisés (plus la fonction NH<sub>2</sub> de l'extrémité N-terminale), la protéine  $\Delta$ N186-462 en comporte 36. Ce nombre élevé de résidus basiques est tout à fait favorable à une bonne ionisation de la protéine, même si le nombre maximum de charges observées est souvent inférieur au nombre théorique. Des essais ont également été effectués en mode négatif, sans plus de résultats. Un tel échec pour la détermination de la masse moléculaire d'une protéine est peu fréquent mais le problème a été rencontré dans d'autres cas, sans qu'il puisse vraiment être expliqué (Briand, Van Dorsselaer, communications personnelles).

Nous avons alors abordé l'étude au niveau de la seconde étape. La protéine  $\Delta$ N186-462 a été soumise à une coupure par le bromure de cyanogène. Celui-ci coupe les liaisons peptidiques en C-terminal des résidus de méthionine (excepté les liaisons Met-Thr). Les sites de coupure théorique dans la protéine  $\Delta$ N186-462 et les masses moléculaires, déduites de la séquence, des peptides attendus sont récapitulés dans la figure 29 et le tableau 3.

L1

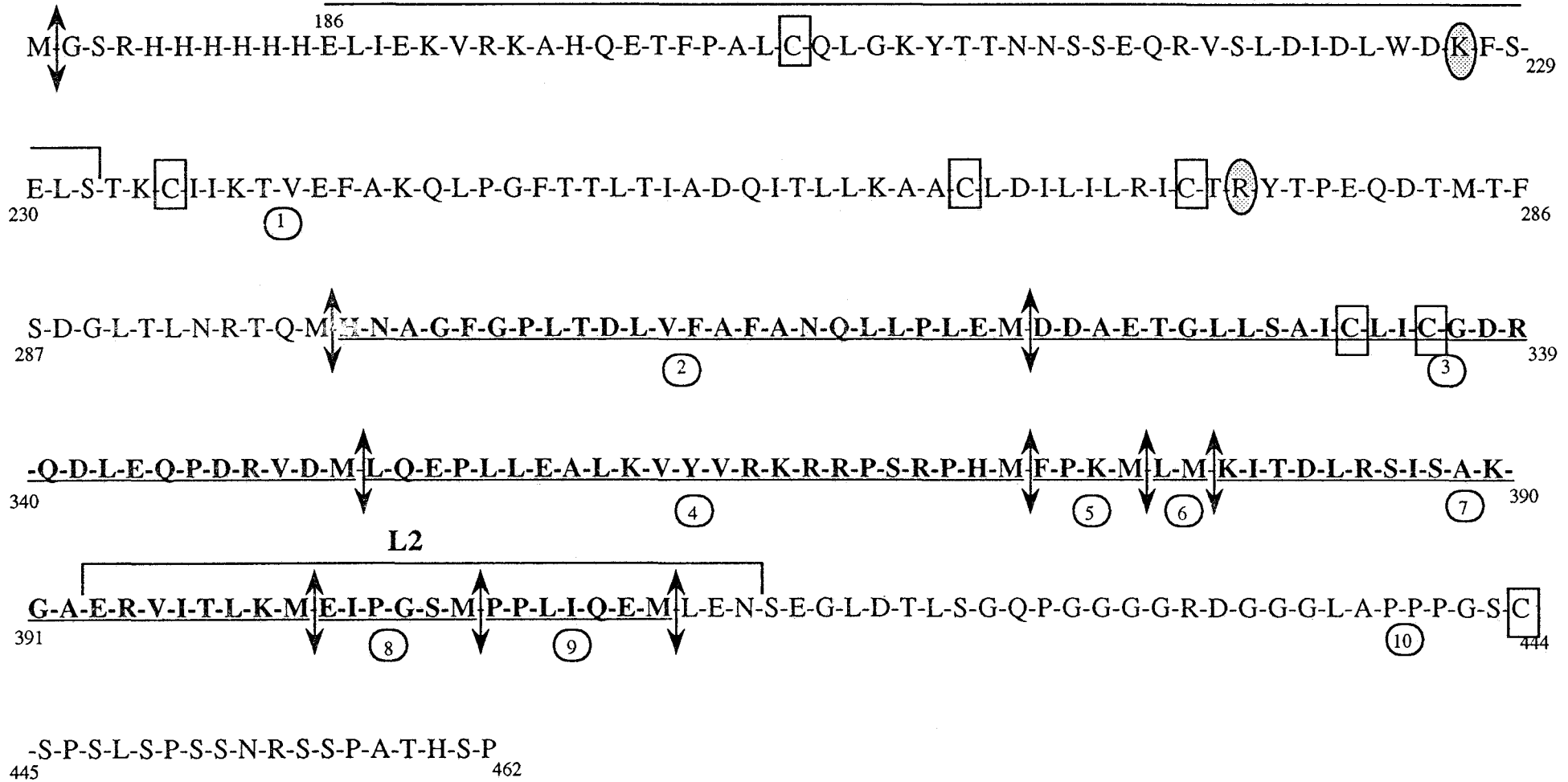


Fig. 29: Séquence de la protéine  $\Delta$ N186-462.  $\updownarrow$  Sites de coupure théorique par le BrCN et numérotation (x) des peptides correspondants. Ceux qui ont été identifiés en spectrométrie de masse sont soulignés et en gras. L1 et L2: régions du domaine E responsables de la fixation du ligand (voir figure 14).

(O) Résidus correspondant aux Arg et Lys de RAR $\beta$  supposées essentielles à la liaison

Peptide	Masse attendue	Masse observée
1	13982	ND
2	2569	2569 et 2585
3	3144	3142
4	2769	2769
5	474	474
6	215	215
7	2282	2282
8	585	585
9	779	779
10	4631	ND

Tableau 3: Masses moléculaires des peptides attendus après coupure de la protéine  $\Delta$ N186-462 par le Bromure de Cyanogène.

L'hydrolysats obtenu a été analysé en spectrométrie de masse de trois façons différentes. Une première analyse a été effectuée sur l'hydrolysats brut. Une aliquote de cet hydrolysats a fait l'objet d'une séparation par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse. Les fractions recueillies ont été lyophilisées puis soumises à l'analyse en SM. Enfin, nous avons réalisé un essai en couplage direct CLHP-SM.

La figure 30 représente le spectre obtenu avec l'hydrolysats brut. Sur ce spectre, les masses et le degré de protonation des peptides correspondant aux pics sont précisés. L'analyse de ce spectre a permis d'identifier sept fragments : les peptides 2, 3, 4, 5, 7, 8 et 9. Les masses observées sont récapitulées dans le tableau 3. Nous pouvons remarquer que toutes les masses observées correspondent aux masses attendues excepté pour le peptide 3 où une différence de deux unités est observée. Cette différence peut être due à la formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines que contient ce peptide. Soulignons également que le peptide 2 a donné deux spectres différents, l'un correspondant à la masse attendue, le second à une masse supérieure de 16 unités. Ce deuxième spectre correspond très probablement à une forme oxydée du peptide.

Les mêmes peptides ont pu être identifiés après fractionnement par CLHP en phase inverse. L'analyse en couplage direct a permis d'identifier un peptide supplémentaire, le peptide 6, mais le spectre du peptide 4 n'a pu être obtenu.

Les figures 31 à 39 reproduisent les spectres correspondant aux différents peptides identifiés. La figure 40 représente le spectre du courant ionique total enregistré au niveau du détecteur. Les masses des peptides identifiés dans chaque pic sont précisées.

Nous avons donc pu obtenir à ce jour le spectre de masse de 8 peptides sur les 10 attendus. Leur localisation est présentée dans la figure 29. Nous n'avons malheureusement pas obtenu les spectres des peptides N-terminal (résidus 186 à 297) et C-terminal (résidus 414 à 462) de masse respective 13982 Da et 4631 Da. Cela est d'autant plus regrettable que le premier d'entre eux contient quatre cystéines. Le peptide 1 contient 21 acides aminés basiques susceptibles d'être ionisés. Ce nombre élevé de charges est favorable à l'obtention d'un spectre, puisque l'ionisation de sept résidus suffisent à obtenir un rapport  $m/z$  dans la gamme détectée. Par contre, le peptide 10 ne contient que trois résidus basiques. Ce peptide ne contient également que quatre résidus acides, mais un essai en mode négatif pourrait néanmoins être tenté. Les essais en cours visent à purifier ces peptides afin d'obtenir



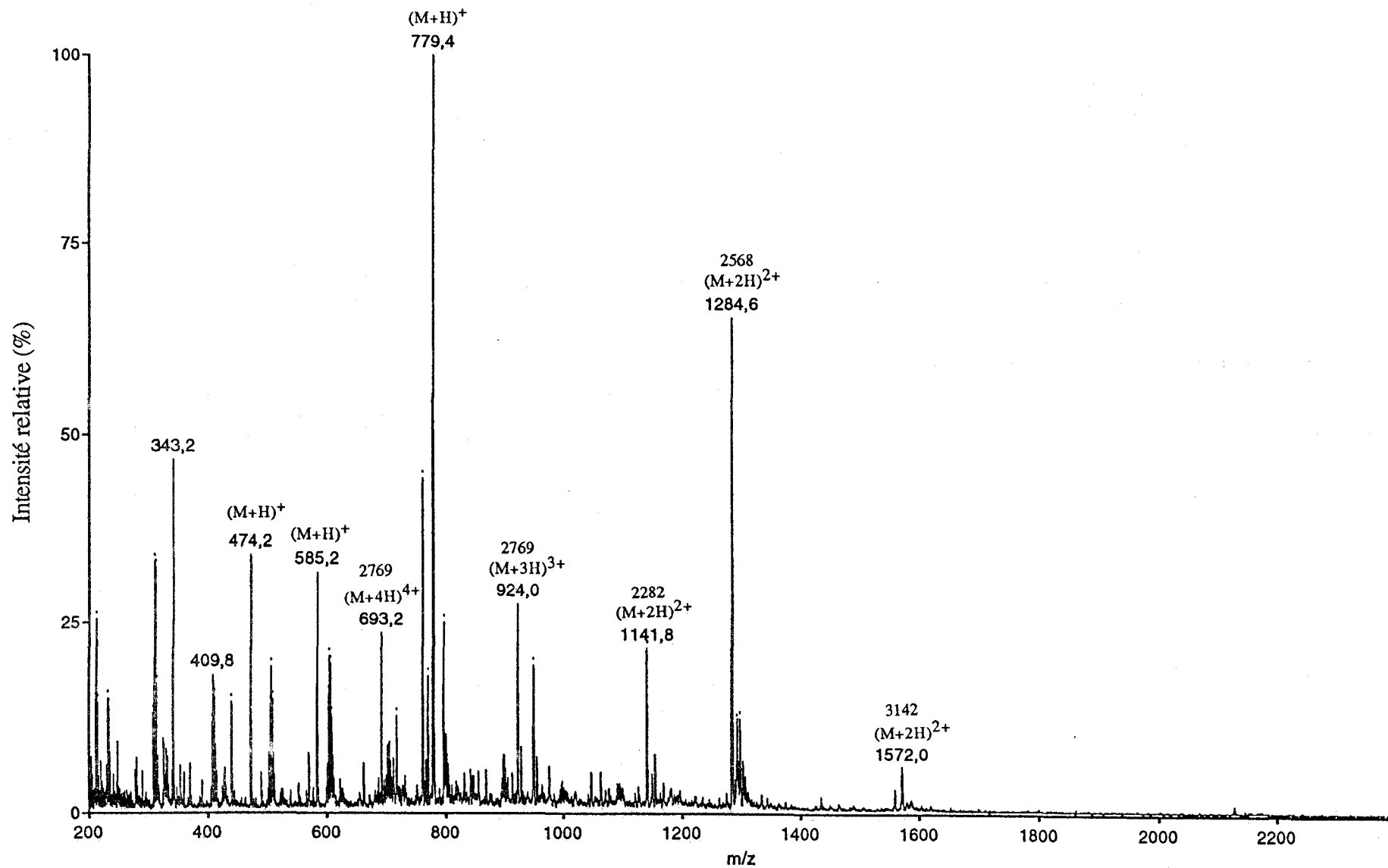


Fig. 30: Spectre de masse de l'hydrolysate brut de la protéine ΔN186-462.

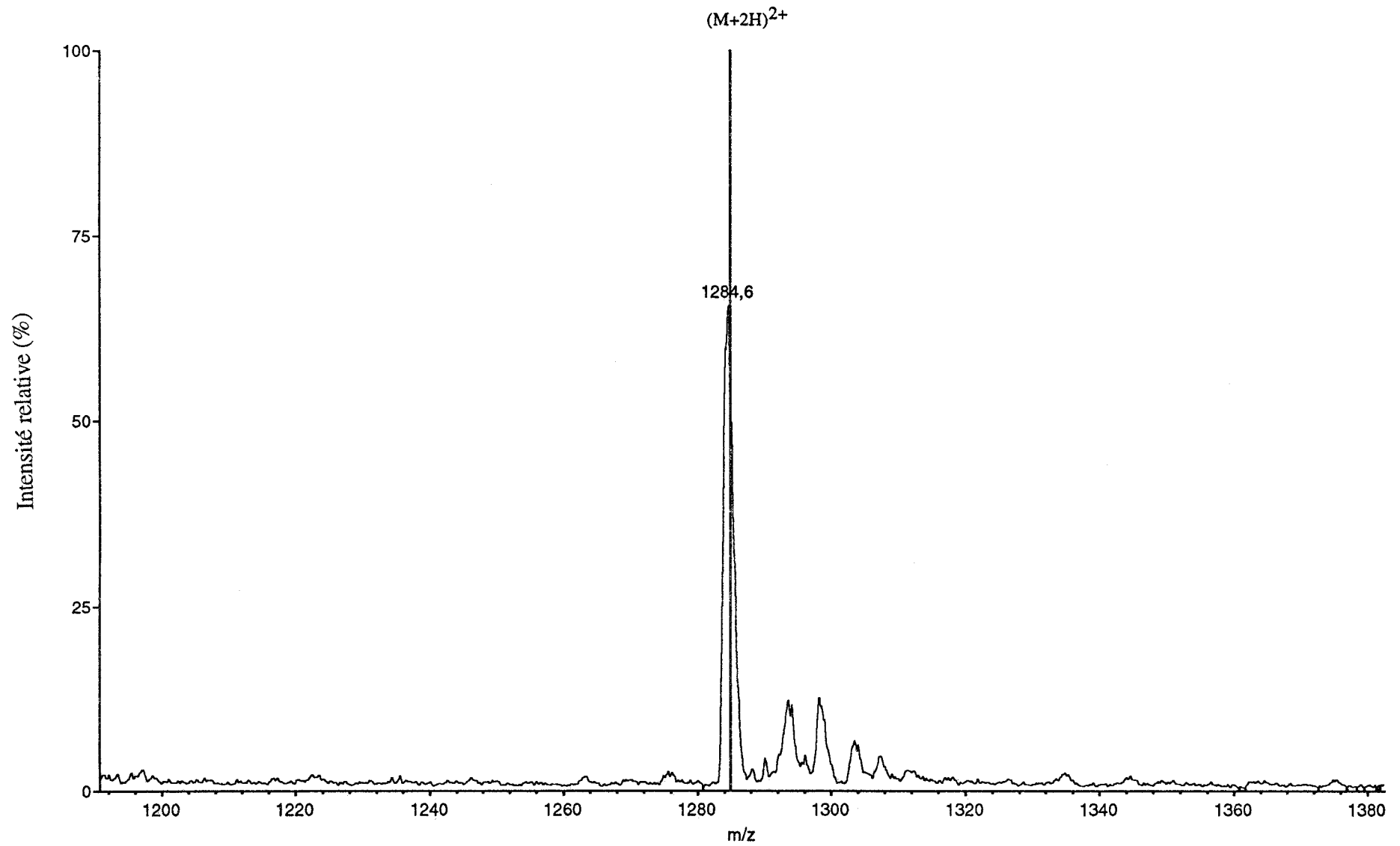


Fig. 31 : Spectre de masse du peptide 2. Masse observée: 2569.

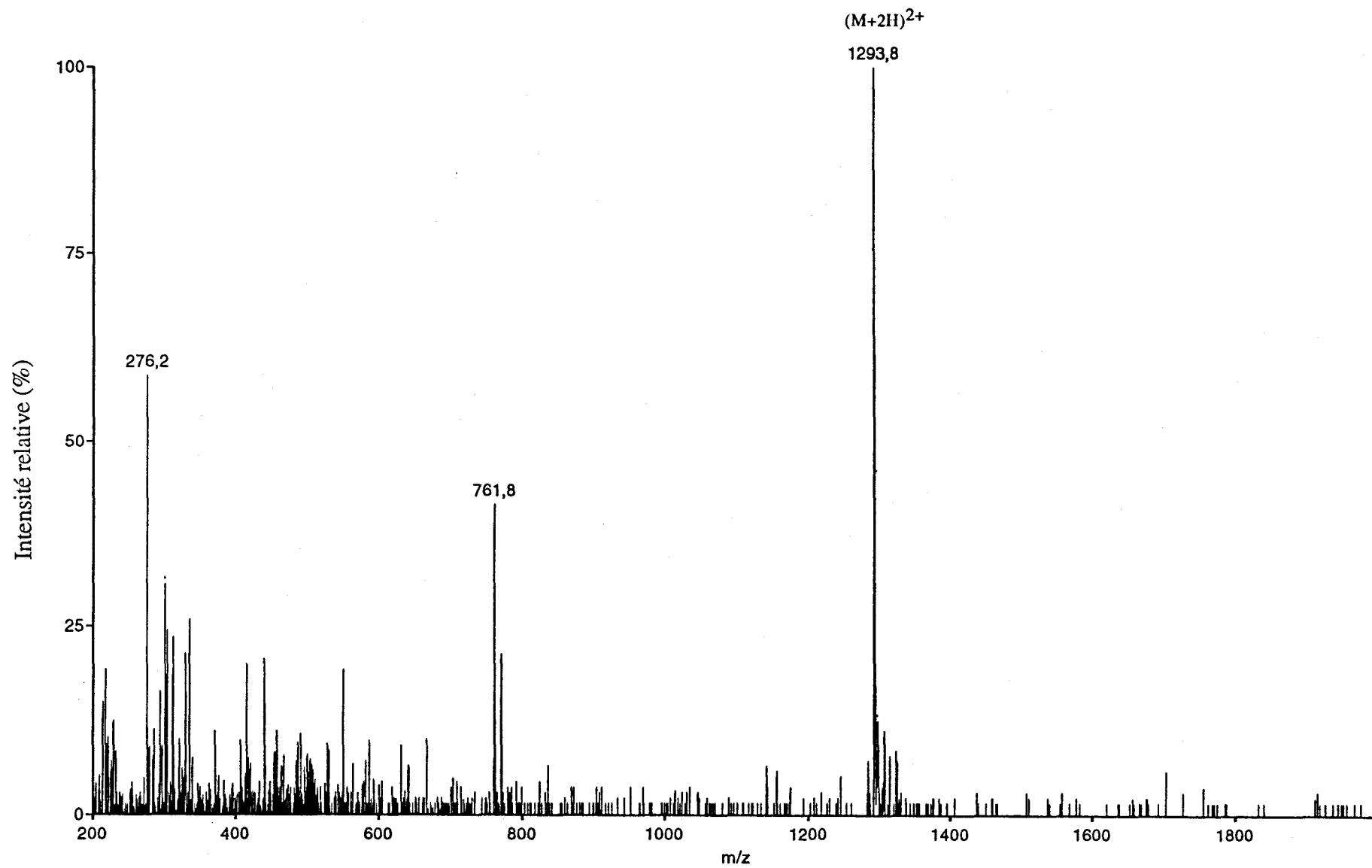


Fig. 32: Spectre de masse du peptide 2 oxydé. Masse observée: 2585



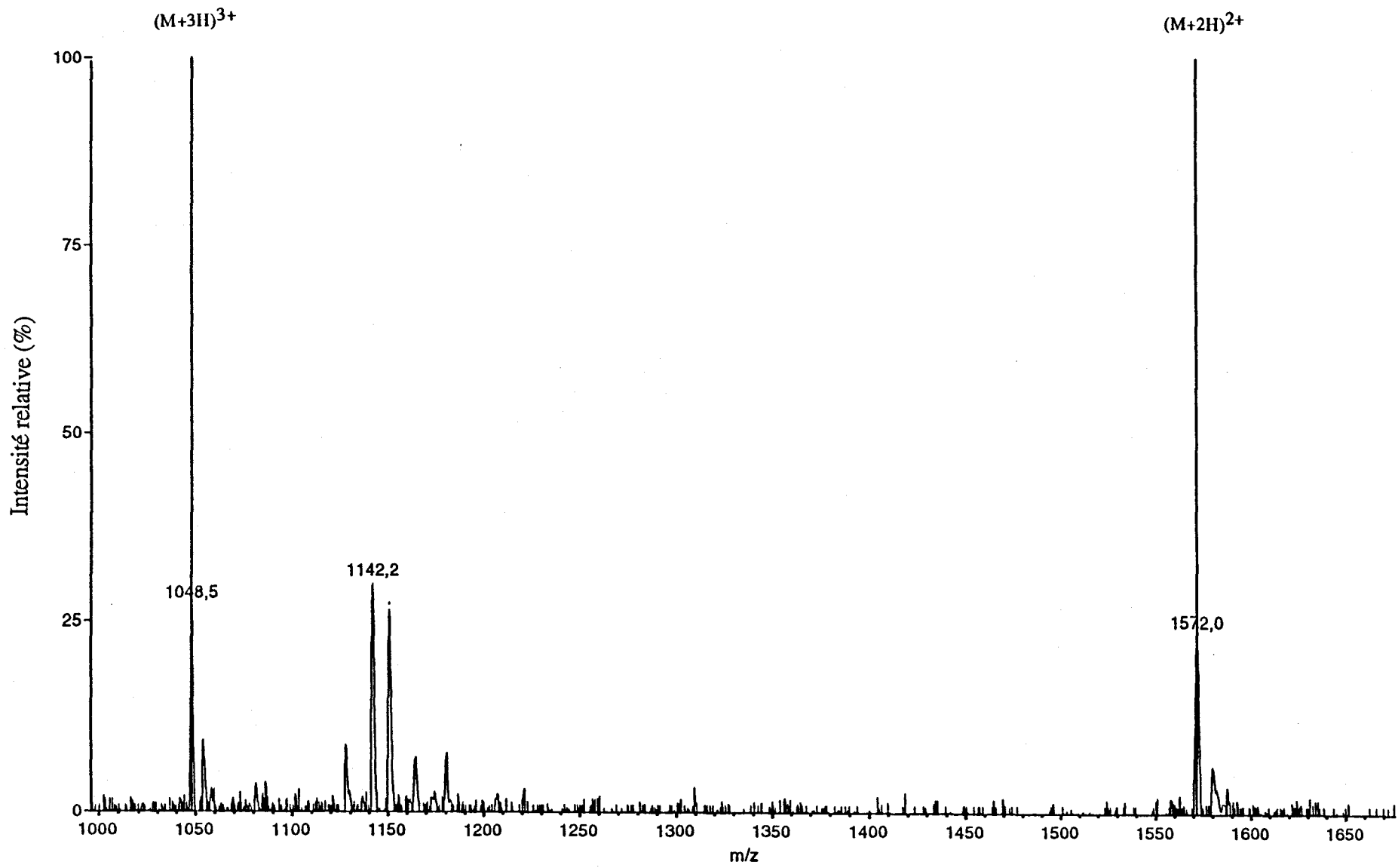


Fig. 33: Spectre de masse du peptide 3. Masse observée: 3142.

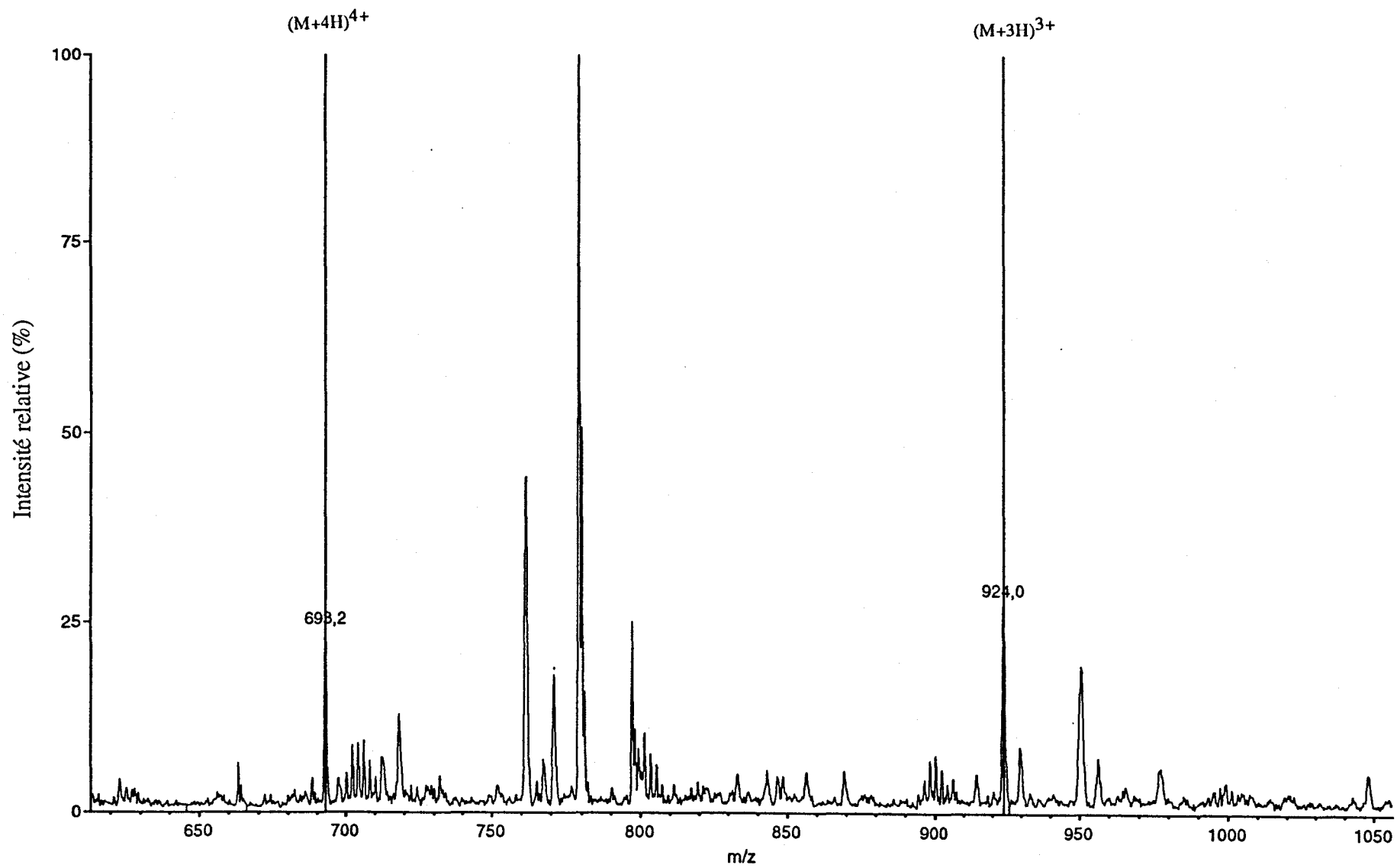


Fig. 34: Spectre de masse du peptide 4. Masse observée: 2769.

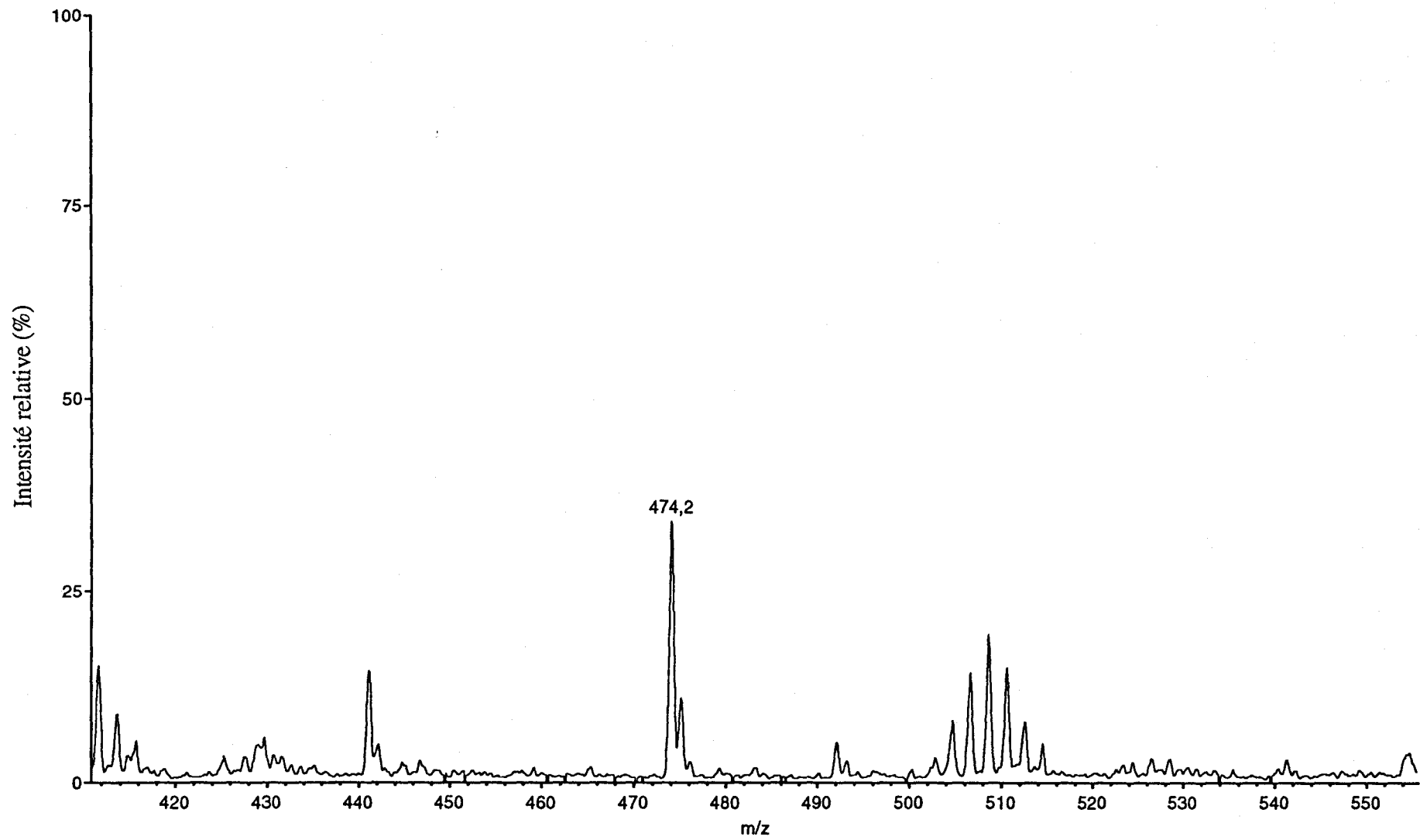


Fig. 35: Spectre de masse du peptide 5. Masse observée: 474,2.

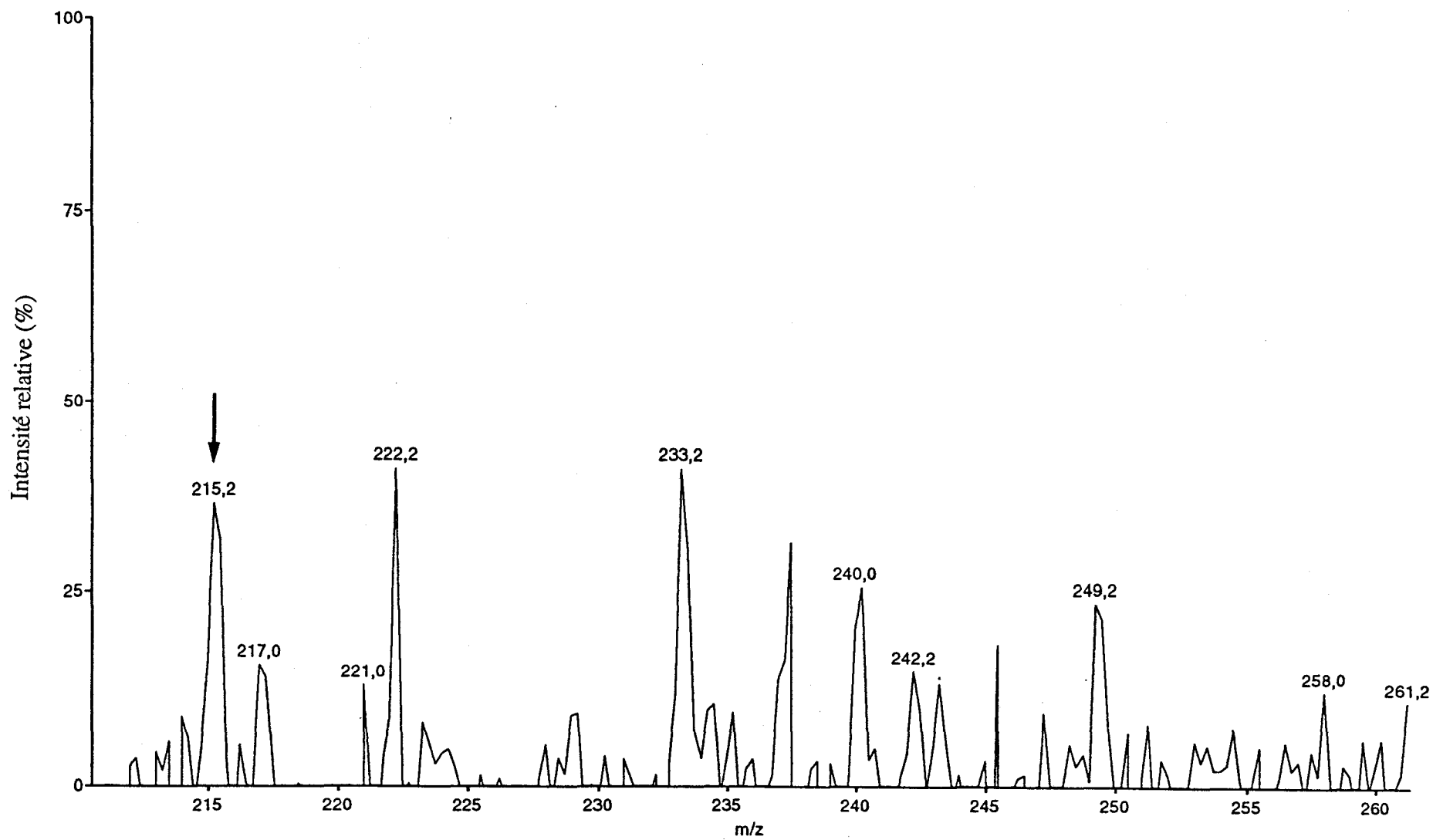


Fig. 36: Spectre de masse du peptide 6. Masse observée: 215,2.



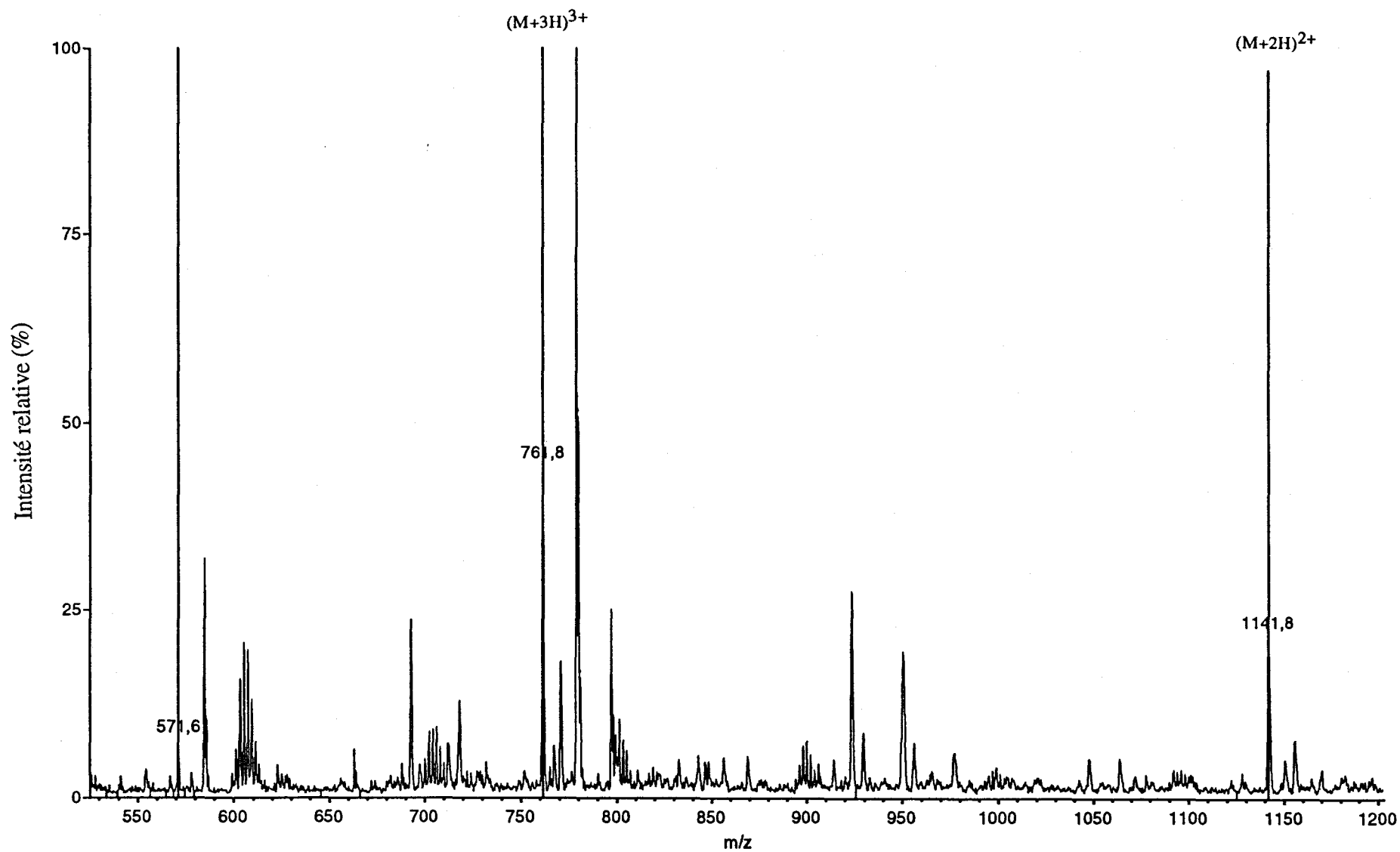


Fig. 37: Spectre de masse du peptide 7. Masse observée: 2282.



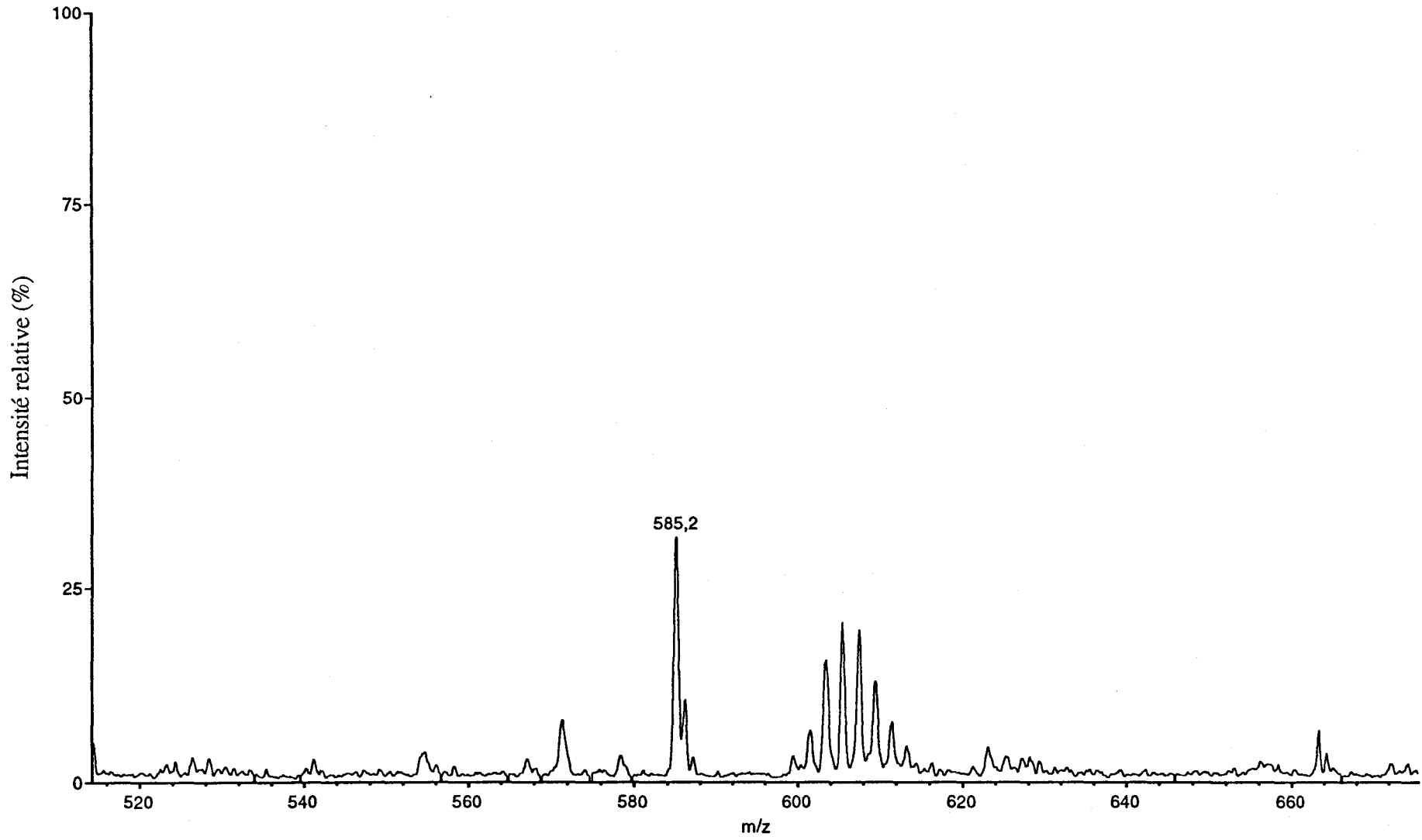


Fig. 38: Spectre de masse du peptide 8. Masse observée: 585,2.

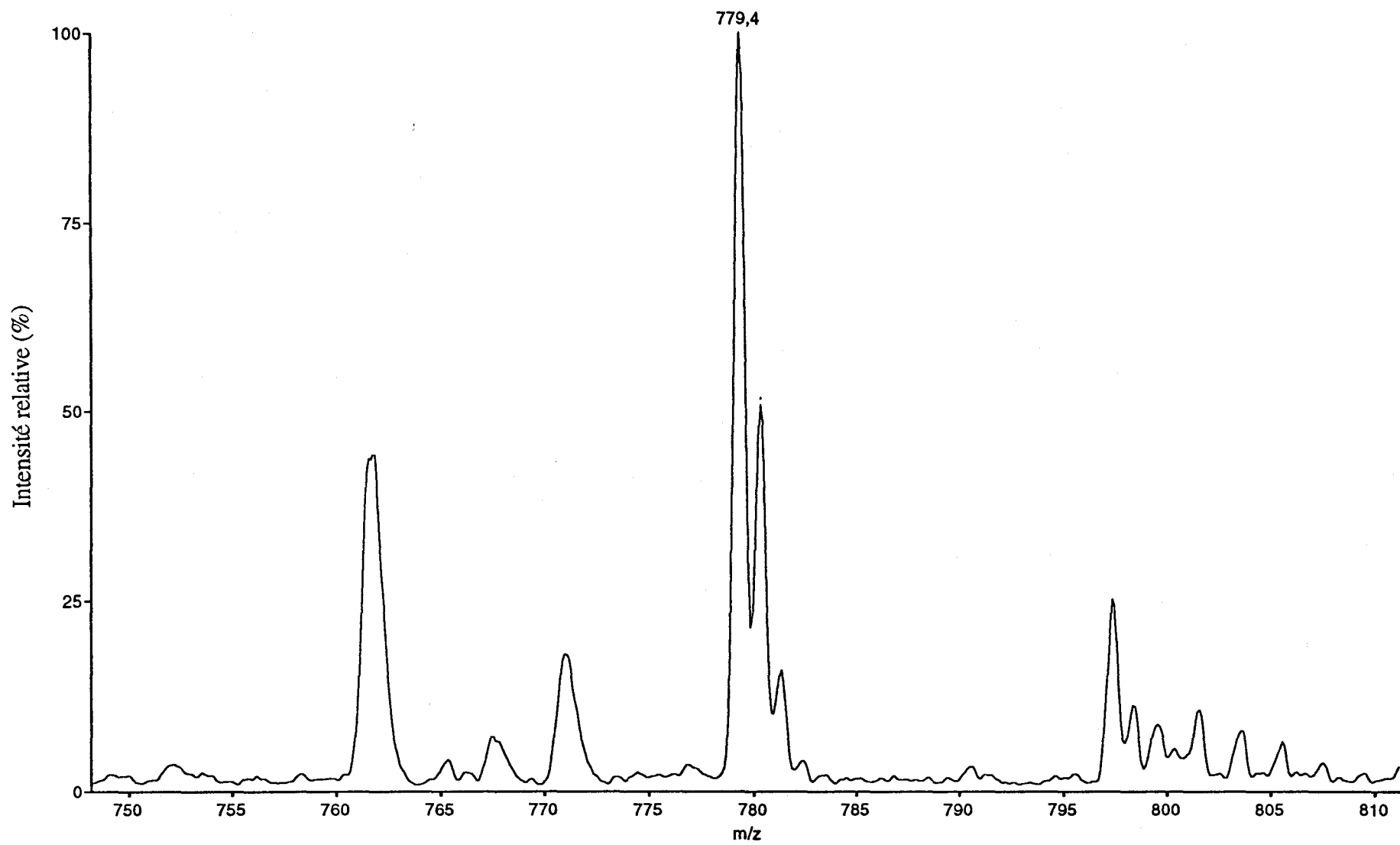


Fig. 39: Spectre de masse du peptide 9. Masse observée: 779,4.

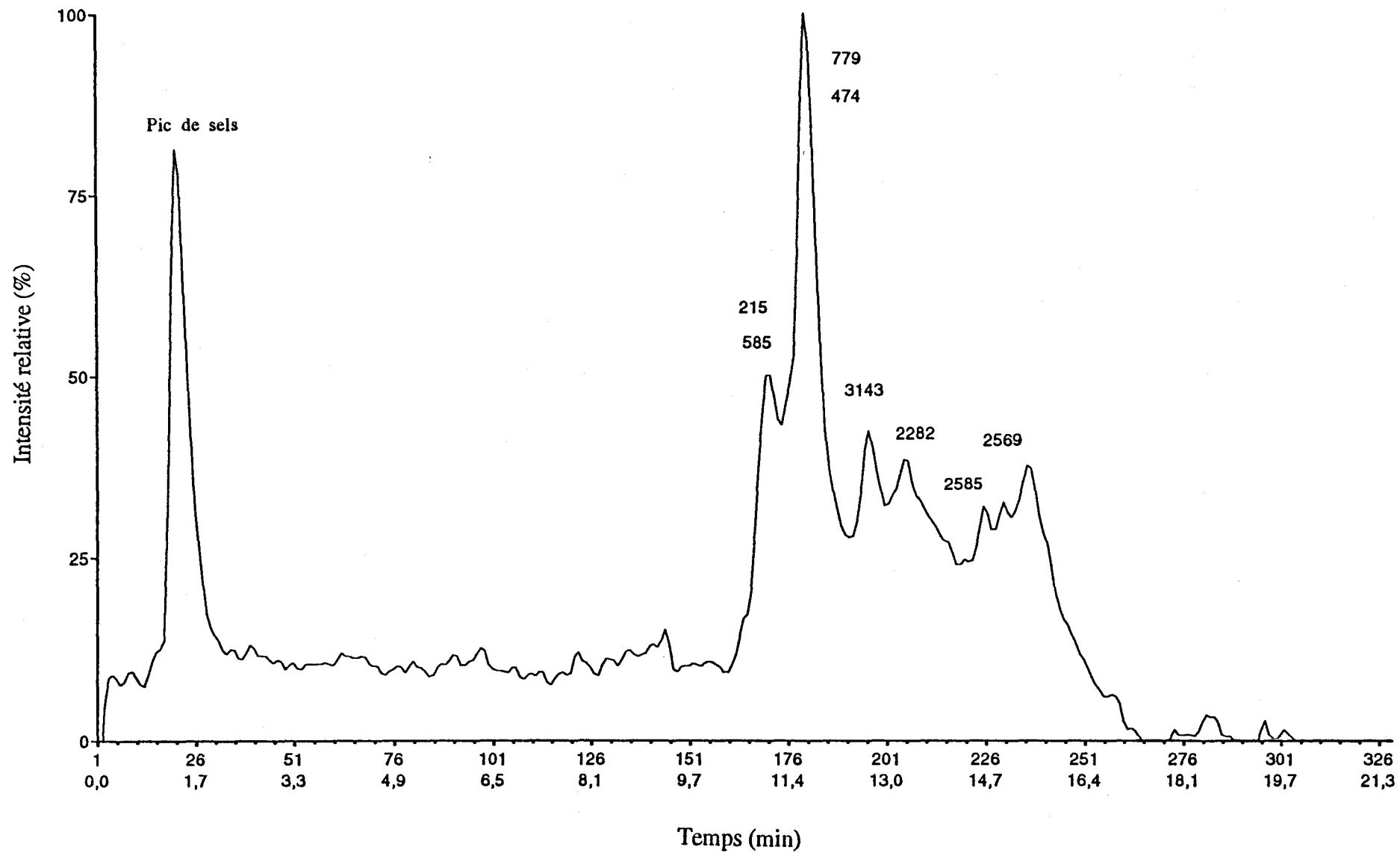


Fig. 40: Spectre du courant ionique total. La masse des peptides identifiés dans chaque pic est indiquée.

le matériel nécessaire à des essais de coupure chimique ou enzymatique. Il sera ainsi possible d'analyser la totalité de la protéine.

Ces premiers résultats sont très encourageants. Cette technique peut donc être utilisée pour l'analyse des peptides obtenus après coupure chimique de la protéine  $\Delta N186-462$ . Elle sera appliquée à l'étude de la protéine alkylée avant ou après fixation du ligand. Il sera ainsi possible d'identifier les cystéines du site actif du domaine E de RAR $\alpha$ . Des essais sont actuellement en cours.

## 2) *Les arginines :*

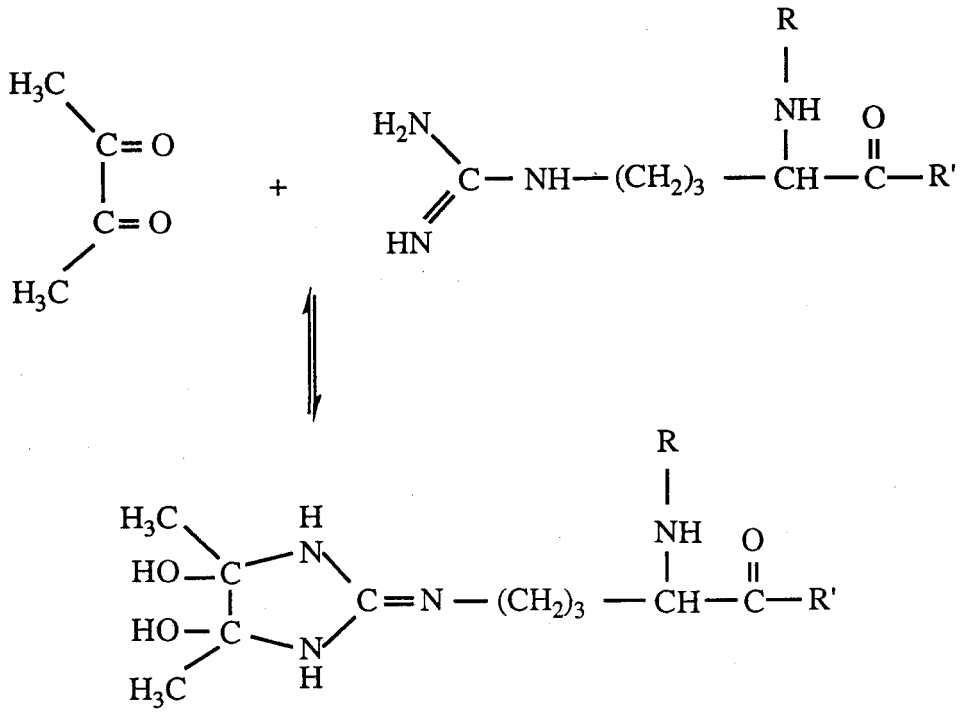
Les études de relation structure-affinité ont montré que la fonction acide des ligands rétinoides est indispensable à une bonne affinité (Crettaz *et al.*, 1990 ; Shimazawa *et al.*, 1991). Cette fonction acide interagit très probablement avec des acides aminés chargés positivement du site de liaison du récepteur. La détermination de la structure cristallographique de la protéine épидидymaire de liaison des acides rétinoïques a d'ailleurs permis de montrer que le carboxylate de ces molécules interagit avec des résidus chargés positivement (une arginine et deux lysines) du site de liaison (Newcomer, 1993).

Nous avons débuté l'étude de l'implication des arginines dans l'interaction RAR $\alpha$ -ligand à l'aide de réactifs spécifiques de cet acide aminé.

Nous avons utilisé deux réactifs spécifiques des résidus arginines : la butanedione et le para-hydroxyphénylglyoxal dont le mécanisme d'action est décrit dans la figure 41. L'incubation de l'extrait bactérien avec des concentrations millimolaires du dérivé du glyoxal pendant une heure, avant l'incubation avec le ligand, résulte en une diminution concentration-dépendante de l'activité de liaison spécifique de l'acide rétinoïque et du CD367 (Fig. 42). La liaison du CD367 est légèrement moins sensible que celle de l'acide rétinoïque. Le para-hydroxyphénylglyoxal, à une concentration de 5 mM, abolit totalement la liaison de l'acide rétinoïque ; à 10 mM, il inactive 92 % de la liaison du CD367.

La pré-incubation de l'extrait bactérien avec le CD367 ou l'acide rétinoïque réduit fortement l'effet du glyoxal. Les complexes RAR-CD367 ou RAR-acide rétinoïque présentent la même résistance face au traitement par le réactif. La pré-incubation du récepteur avec un ligand permet de conserver 50 % de l'activité de liaison en présence de glyoxal 10 mM.

A.



B.

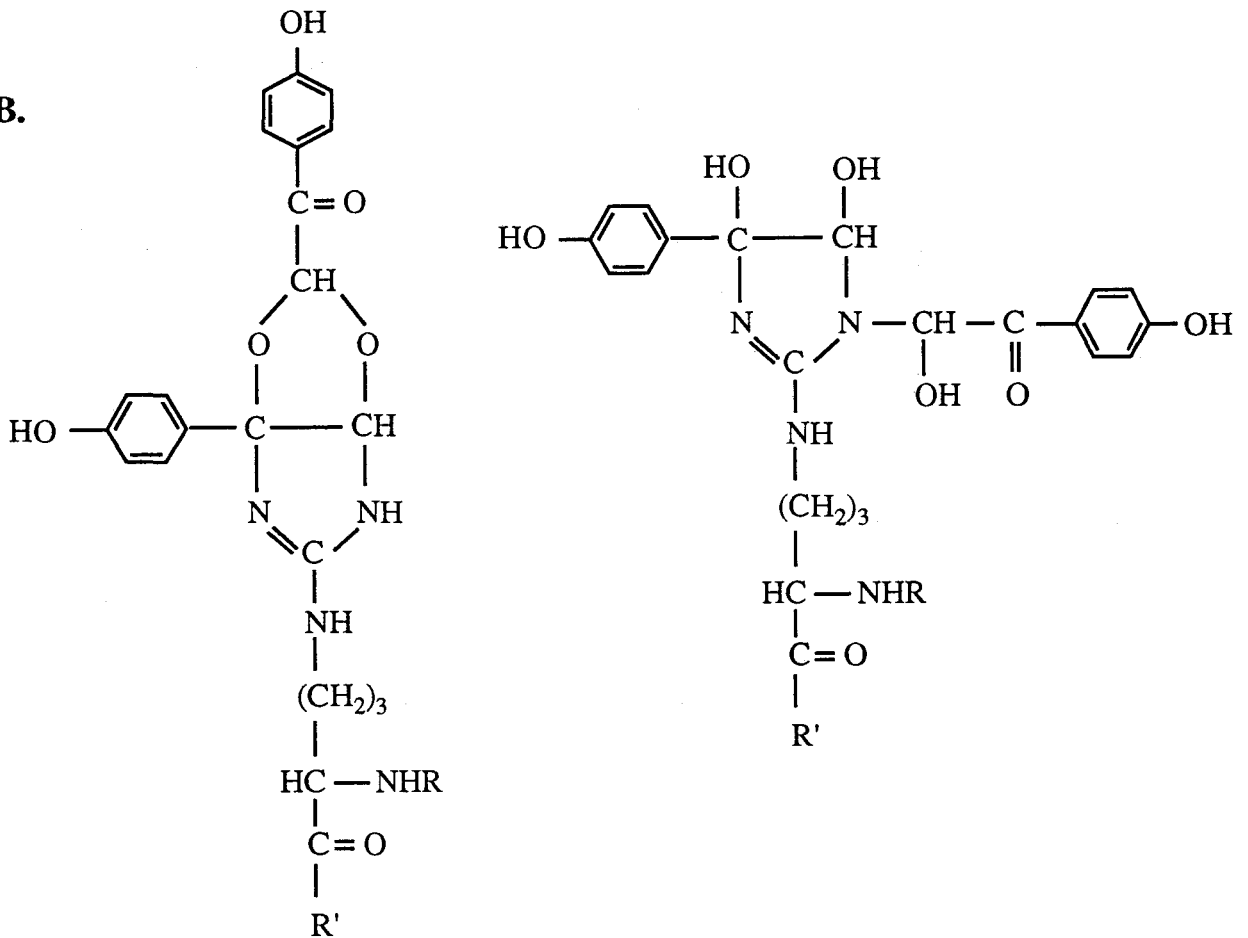


Fig. 41: A. Mécanisme d'action de la butanedione avec l'arginine. B. Dérivés suggérés pour l'action du p-hydroxyphénylgyoxal avec l'arginine.

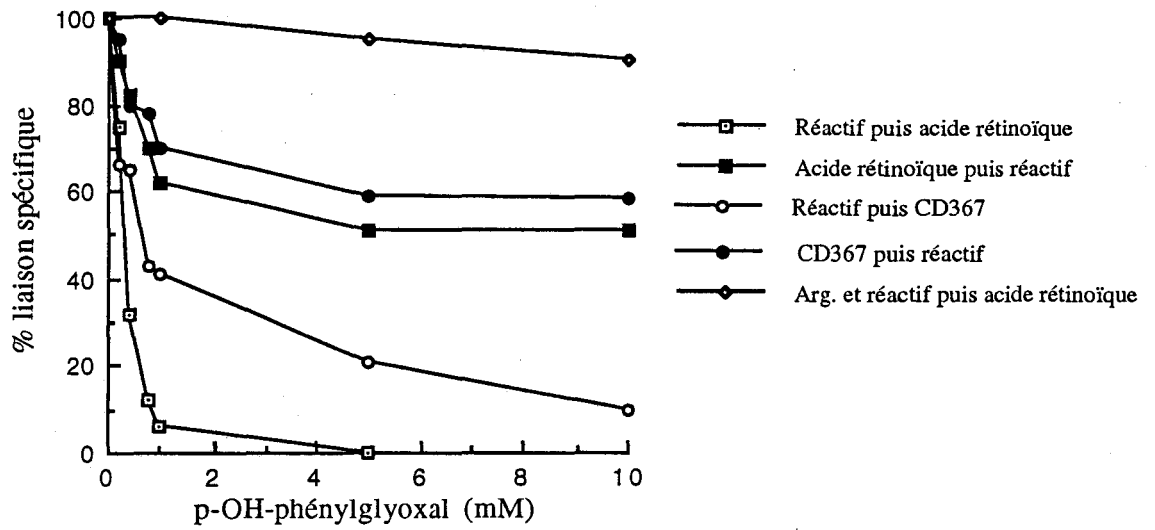


Fig. 42: Effet du pOH-phénylgyoxal avant ou après liaison du ligand.

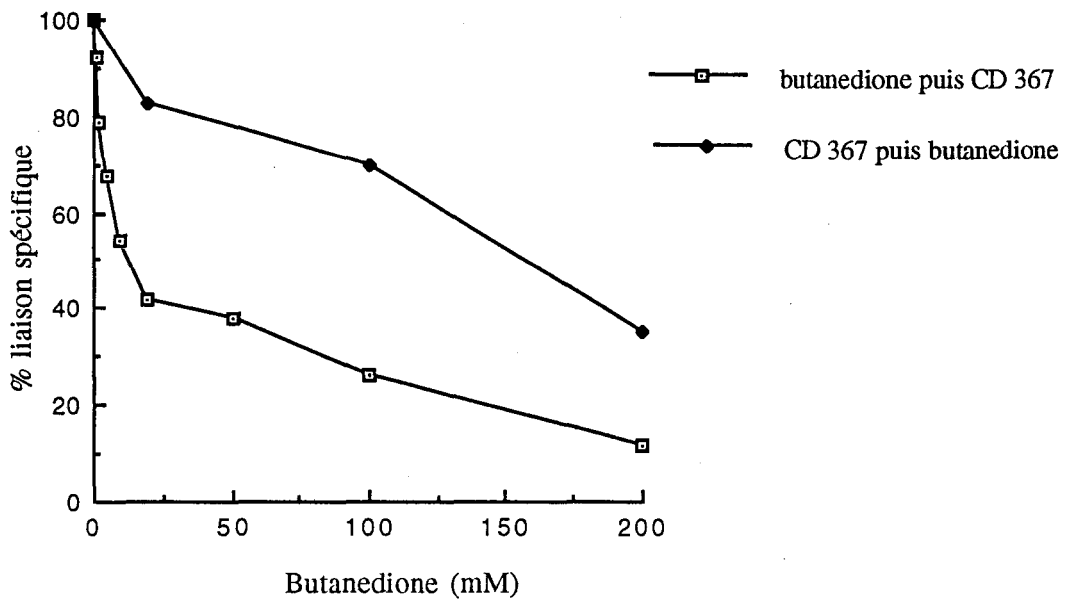


Fig. 43: Effet de la butanedione sur la liaison CD367-RAR avant ou après liaison du CD367

La protection partielle, mais nette, du site de liaison par le ligand suggère que certaines arginines modifiées par le réactif en absence du ligand soient localisées près ou dans ce site. Le changement de conformation induit par la fixation du ligand et le ligand lui-même diminuent l'accessibilité et la réactivité des acides aminés vis-à-vis du para-hydroxyphénylglyoxal.

Des résultats similaires peuvent être observés avec la butanedione (Fig. 43). L'inactivation de la liaison du CD367 par ce réactif nécessite des concentrations supérieures au dérivé du glyoxal. La butanedione, à une concentration de 10 mM, inactive près de 45 % de la liaison. A 100 mM, 25 % seulement de l'activité de liaison sont conservés. Cette différence de l'effet des réactifs spécifiques des arginines peut être due à un encombrement stérique apporté par la butanedione, moindre par rapport au réactif cyclique p-hydroxyphénylglyoxal. Nous observons également une protection du site de liaison par le CD367. Pour une concentration en butanedione inférieure à 100 mM, la pré-incubation avec le ligand permet de conserver au moins 70 % de la liaison spécifique.

Afin d'étudier la spécificité de l'action du p-hydroxyphénylglyoxal, nous l'avons pré-incubé avec l'arginine à une concentration de 30 mM avant de le mettre au contact de l'extrait bactérien. Dans ces conditions, l'effet du réactif est inhibé pour les concentrations les plus faibles. A une concentration de 10 mM, on observe uniquement 20 % d'inactivation de la liaison de l'acide rétinoïque (Fig. 42). Nous pouvons donc attribuer la majorité de l'effet du dérivé du glyoxal à une réaction spécifique avec les résidus arginines du récepteur. L'inactivation partielle observée pour une concentration en réactif de 10 mM peut être due à une instabilité de la protéine en présence du complexe arginine-glyoxal formé ou à une compétition entre le ligand et ce complexe pour le site actif du domaine E.

L'absence d'une protection complète du site actif par le ligand vis-à-vis des réactifs des arginines peut également être attribuée à une instabilité de la protéine en présence de ces réactifs, qui provoquerait la dissociation du ligand.

Ces premiers résultats suggèrent qu'une arginine est impliquée dans l'interaction récepteur-ligand. D'ailleurs, Tairis *et al.* (1994) ont tout récemment mis en évidence l'importance de deux résidus basiques, dont une arginine, pour l'activité de liaison de RAR $\beta$ . Il s'agit de la lysine 220 et de l'arginine 269 dont la double mutation entraîne une augmentation d'un facteur 580 du Kd des complexes RAR $\beta$ -acide rétinoïque. Ces deux résidus sont conservés aux positions 227 et 276 de RAR $\alpha$  (Fig. 29). Seule la lysine se trouve dans la région L1. Il serait très intéressant de voir si l'arginine 276 est modifiée par les réactifs que nous avons utilisés ici. Remarquons

cependant que la séquence  $\Delta N186-462$  comporte 15 résidus arginines, l'application de la méthode employée pour les cystéines s'avérera sans doute délicate.



CHAPITRE 5:

*OPTIMISATION DE LA DETERMINATION  
DES PARAMETRES DE  
LIAISON LIGAND-RECEPTEUR.*

## A) INTRODUCTION :

L'étude de l'activité de liaison nécessite la séparation du ligand libre du ligand lié. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées dans ce but : la filtration sur membrane, la chromatographie à haute performance d'exclusion de taille, la liaison à l'hydroxylapatite et l'adsorption par le charbon-dextran. Cette dernière technique, simple et rapide, est très utilisée.

D'une manière générale, l'hydrophobicité de l'acide rétinoïque et des rétinoïdes favorise leur adsorption non spécifique aux autres protéines et aux parois des tubes d'incubation. Afin que l'étude de l'activité de liaison soit réalisée dans les meilleures conditions, nous avons voulu étudier l'influence de différents paramètres sur la précision et la reproductibilité des mesures effectuées à l'aide du charbon-dextran.

Nous avons utilisé pour cela la protéine de fusion GST-RAR $\alpha$ LBD non purifiée pour éviter les problèmes d'instabilité de l'activité de liaison du récepteur purifié. Nous avons étudié l'efficacité du charbon à piéger le ligand libre en fonction de sa concentration ou de celle du ligand, ainsi qu'en fonction du temps d'incubation. Nous avons également observé l'effet de la composition du tampon d'incubation ou de la concentration en protéine.

D'autre part, nous avons comparé la technique du charbon dextran à la gel filtration et étudié l'influence du pH sur la liaison RAR-ligand.

## B) RESULTATS :

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication suivante :

"Physicochemical parameters affecting the charcoal adsorption assay for quantitative retinoid-binding measurement."

Sablonnière, B., Dallery, N., Grillier, I., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1994). *Anal. Biochem.* **217** : 110-118.

## Physicochemical Parameters Affecting the Charcoal Adsorption Assay for Quantitative Retinoid-Binding Measurement

B. Sablonnière,<sup>1</sup> N. Dallery, I. Grillier, P. Formstecher, and M. Dautreaux

Laboratoire de Biochimie Structurale, C/JF INSERM 92-03, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

Received May 20, 1993

The different parameters affecting the accuracy and reliability of the dextran-coated charcoal adsorption assay for characterization of retinoic acid receptors ligand binding activity were investigated. Using dextran-coated charcoal (DCC) at a final 10 mg/ml concentration, an efficient adsorption of free [<sup>3</sup>H]retinoic acid was observed with a yield in the range 99.2 to 99.8% for ligand concentrations varying from 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-4</sup> M. Nonspecific adsorption of retinoic acid reached 50% to polystyrene and silanized glass and 70% to uncoated glass. Results obtained by the DCC method and by gel-filtration assay were correlated; however, the DCC assay appeared easier to perform and gave more reproducible results. When a careful measurement of free retinoid concentration was performed, the apparent equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ) of retinoic acid was 3.1 ± 0.4 nM and the  $K_D$  of CD367, a synthetic retinoid, was 1.8 ± 0.3 nM. Optimal pH for the binding of [<sup>3</sup>H]retinoic acid or [<sup>3</sup>H]CD367 was in the range 7.5 to 8.5. Under the conditions described for the adsorption assay, bound retinoid measurement was linearly related to the protein concentration between 0.05 and 0.25 mg/ml. At a lower protein concentration, addition of bovine serum albumin exerted a stabilizing effect on retinoid binding, allowing an accurate measurement of the number of specific binding sites. Using retinoic acid as ligand, bacterial extracts often resulted in a level of nonspecific binding in the range 10–25%. It could be lowered (4–10%) when resorting to [<sup>3</sup>H]CD367. The extent of nonspecific binding could be significantly reduced when organic solvents (dimethylformamide or dimethyl sulfoxide) were added at a 3–6% final concentration during the adsorption step with charcoal, whereas gelatin was inefficient. The DCC adsorption assay used under optimized conditions provides a rapid and useful method for

an accurate and quantitative measurement of retinoic acid receptors. © 1994 Academic Press, Inc.

The charcoal assay is widely used for the determination of steroid receptor binding activity. This nonequilibrium method depends on the fact that a suspension of activated charcoal adsorbs free but not macromolecule-bound steroid (1–3). Following binding of tritiated steroids to cell extracts, the unbound steroid can be retained on the charcoal which is then removed by centrifugation.

This separation technique requires a careful standardization in order to yield reproducible and exact results. Such studies have already been performed in the case of almost all steroid receptors (4 and references therein). A dextran-charcoal technique has also been described for quantitating 1,25-dihydroxyvitamin D in plasma (5).

The effects of retinoic acid are mediated by two classes of receptors, the retinoic acid receptors (RAR $\alpha$ ,<sup>2</sup> RAR $\beta$ , and RAR $\gamma$ ) and the retinoid X receptors (RXRs), which belong to the steroid/thyroid hormone receptor superfamily (6–12). RARs and RXRs are organized in several domains. Two main receptor functions, i.e., ligand binding and DNA binding, are fulfilled by the E and C domains, respectively. Owing to the natural low abundance of RARs in target tissues, and to the frequent colocalization in the same tissues of different RARs subtypes, recombinant RARs overexpressed either in *Escherichia coli* or in eukaryotic cells are increasingly used for the study of the ligand-binding specificity

<sup>2</sup> Abbreviations used: RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor; DCC, dextran-coated charcoal; GST, glutathione S-transferase; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; DTT, dithiothreitol; BSA, bovine serum albumin; DMF, dimethylformamide; DMSO, dimethyl sulfoxide.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: 33 20 62 68 68.

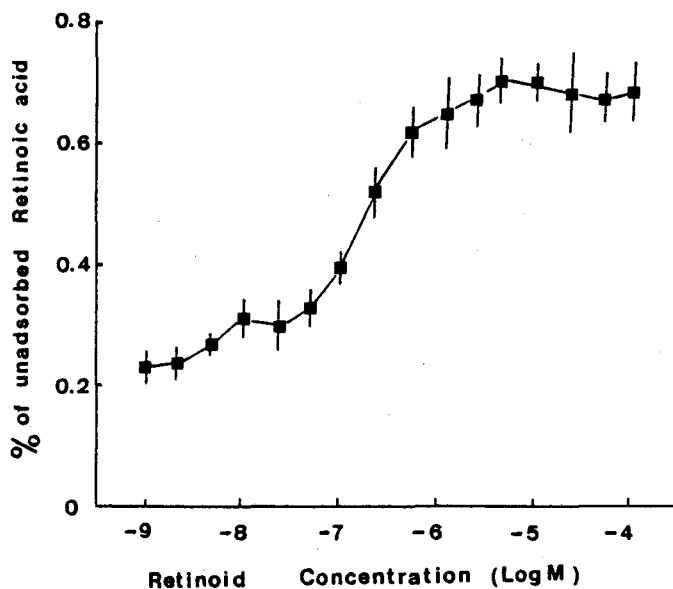


FIG. 1. Measurement of the capacity of dextran-charcoal to adsorb retinoic acid. To 0.5-ml aliquots of ligand-binding buffer containing  $10^{-8}$  M [ $^3$ H]RA were added varying amounts of unlabeled ligand giving a total retinoid concentration ranging from  $10^{-9}$  to  $2 \times 10^{-4}$  M. The amount of free retinoic acid resistant to charcoal adsorption was measured as described under Materials and Methods and expressed in percentage versus total retinoic acid added. Each point was assayed in quadruplicate (mean  $\pm$  SD).

of each RAR subtype. First results in this field have been reported, affording the critical information that some of the existing retinoids displayed a partial RAR subtype binding specificity (13–15). Clearly, an accurate and easy assay of the binding parameters of synthetic retinoids is required for the design of more specific ligands, one of the main goals of the research in the retinoid field. Different methods for studying retinoid binding affinities to cellular retinoic acid binding protein (16) or to RARs (17–21) have been used but their accuracy and reproducibility can be compromised by several factors: (i) a low abundance of RARs in natural cells and tissues resulting in a low ratio of specific versus nonspecific binding sites; (ii) the chemical instability of the natural ligand, retinoic acid (RA); (iii) the difficulty of designing a perfect method to separate free from bound ligand. The first point has been solved since the introduction of recombinant techniques allowing the overexpression of RARs (18–20). The second drawback can be eliminated by using CD367, a stable synthetic ligand of the three RAR subtypes (21). Finally, different techniques to separate bound from free ligand have been used, including membrane filter assay (22), high-performance size-exclusion chromatography (21), hydroxyapatite binding assay (23), and dextran-coated charcoal adsorption (18–20). Owing to its simplicity and rapidity,

this last technique also appears attractive for the retinoid-binding activity assay. However, no systematic study has been performed to optimize the experimental conditions of the use of DCC for the selective adsorption of free retinoids in biological extracts containing RARs. In this report, the different physicochemical parameters affecting the DCC assay of recombinant human RARs expressed in *E. coli* were determined and optimized assay conditions are proposed.

#### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.**  $^3$ H-labeled all-*trans* retinoic acid ( $^3$ H]RA, 55.8 Ci/mmol) was from New England Nuclear.  $^3$ H]CD 367 (52.8 Ci/mmol) and unlabeled CD 367 (4-[5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl 2-anthracenyl]-benzoic acid) were obtained from Dr. B. Shroot (CIRD, Sophia Antipolis, Valbonne, France). Ultrogel ACA 202 was from Industrie Biologique Française (Villeneuve-la-Garenne, France). Other chemicals were of commercial grade. The plasmid pHK1 containing the full-length hRAR $\alpha$  coding sequence was obtained from Dr. R. M. Evans (Howard Hughes Medical Institute, La Jolla, CA). The expression vector pGEX-2T was from Pharmacia-LKB, France.

**Overexpression of hRAR $\alpha$  in *E. coli*.** The cDNA sequence of hRAR $\alpha$  from the pHK1 vector, corresponding to amino acids 186–462, was digested and inserted into the pGEX-2T expression vector (24). This resulting plasmid contains the cDNA sequence encoding the E and F domains of hRAR $\alpha$  in frame with the sequence coding the glutathione S-transferase (GST) giving rise to the fusion protein (GST hRAR $\alpha$ LBD). The expression plasmid was transformed into *E. coli* JM 109 cells. Individual colonies were then incubated into 10 ml LB medium containing 50  $\mu$ g/ml ampicillin and cultured overnight at 37°C. Each culture was further diluted with fresh medium plus ampicillin and incubated with vigorous agitation until an OD<sub>600</sub> of 0.8 was reached, before adding isopropyl-thiogalactoside to 0.2 mM. After a further 3 h growth, cells were pelleted by centrifugation and the pellet was suspended in 2.5% of the original volume of the lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.00/10 mM EDTA/10% (w/v) saccharose/0.4 mg/ml lysozyme, including a protease inhibitor cocktail of 1 mM PMSF, 20  $\mu$ g/ml leupeptin, and 20  $\mu$ g/ml aprotinin). The lysis was then completed by a cycle of freeze/thawing and by the addition of Triton X-100 (0.1% final concentration). Homogenization was performed on ice by mild sonication and centrifugation was used to separate soluble proteins from cell debris. The supernatant was saved and referred to as crude bacterial extract for subsequent ligand-binding assay.

**Preparation of dextran-charcoal suspension.** Charcoal (1.5 g) (Norit A, Sigma Chemical Co.) was sus-

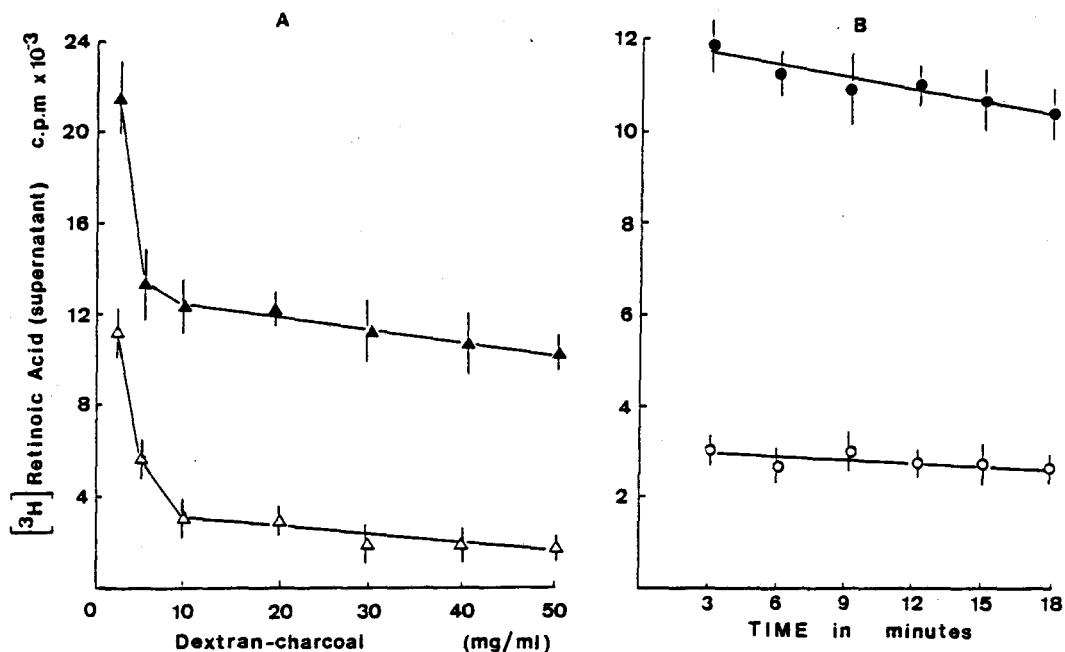


FIG. 2. (A) Effect of the amount of charcoal on the measurement of retinoid binding. Diluted bacterial extracts were incubated at 0°C with  $3 \times 10^{-8}$  M [ $^3$ H]RA in the absence (▲, ●) or presence (△, ○) of a 200-fold excess of unlabeled retinoic acid. Following 120 min of incubation, 0.1 ml of a dextran-charcoal suspension at the desired concentration was mixed with 0.2 ml of incubates and charcoal-resistant radioactivity was determined after 10 min of contact, as described under Materials and Methods. (B) Effect of varying the time of adsorption with charcoal on the measurement of retinoid binding. The experiment was performed under the same conditions as in (A), except that the charcoal-resistant radioactivity was measured by centrifugation after increasing adsorption times. Each point is given as the mean  $\pm$  SD of five separate experiments.

pended in a polypropylene tube with 50 ml of distilled water, stirred for 10 s, and centrifuged at 500g for 10 min. Then, the supernatant was discarded and this washing procedure was repeated three times to remove light particles. The charcoal pellet was further suspended at a 3% (w/v) concentration in 20 mM Tris-HCl, pH 8.00/1 mM EDTA/1 mM DTT and stirred for 15 min and 0.3% (w/v) Dextran T-70 (Pharmacia) was added with continuous stirring for 30 min. Following this step, the dextran-charcoal suspension was ready to use and could be kept in the cold room for 7 days.

**Dextran-charcoal adsorption assay.** Bacterial extracts were diluted to the desired protein concentration in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.00/150 mM NaCl/1 mM DTT). Various amounts of tritiated and unlabeled retinoid in ethanol were added to polystyrene incubation tubes (12  $\times$  75 mm) and evaporated under nitrogen, and diluted bacterial extracts were immediately added. Tubes were then stirred for 5 s and protected from direct light exposure. Incubation was carried out at 0°C for 2 h. Total retinoid concentration was determined by counting aliquots of incubates for radioactivity before separation of bound retinoid. The amount of retinoid specifically bound by the bacterial extract was measured as follows: 0.2-ml samples of in-

cubates were distributed in duplicate into conical polystyrene tubes (12  $\times$  75 mm), stirred vigorously for 5 s in the presence of 0.1 ml chilled charcoal-dextran suspension, and left for 10 min at 0°C. Tubes were then centrifuged at 6000g for 5 min and 0.15-ml supernatants samples were counted for radioactivity. Nonspecific binding was usually measured in the presence of a 200-fold excess of nonradioactive retinoids.

**Miscellaneous.** Protein concentration was determined using the method of Bradford (25). Radioactivity was measured in a 1214 Rack beta liquid scintillation counter (LKB-Wallac, Sweden), using Aqualyte as scintillation cocktail.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Efficiency of Adsorption of Free Retinoid on DCC*

The capacity of dextran-charcoal suspension to retain the excess of free retinoid at the concentration of retinoids usually employed for ligand-binding (i.e., in the range  $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M) was studied as follows. Aliquots of ligand-binding buffer solution containing a constant amount of [ $^3$ H]RA and increasing concentrations of nonradioactive retinoic acid (up to  $2 \times 10^{-4}$  M)

TABLE 1

Comparison of Charcoal Assay and Gel Filtration for Specific Binding Measurement of [<sup>3</sup>H]RA to the Recombinant hRAR $\alpha$

[ <sup>3</sup> H]RA (nM)	Retinoid-binding activity (nM)					
	Charcoal adsorption			Gel filtration		
	TB	NSB	TB-NSB	TB	NSB	TB-NSB
1	0.77	0.07	0.70 $\pm$ 0.04*	0.46	0.06	0.4 $\pm$ 0.1*
5	3.56	0.26	3.3 $\pm$ 0.2*	2.73	0.33	2.4 $\pm$ 0.4*
20	7.34	0.54	6.8 $\pm$ 0.4	8.15	0.75	7.4 $\pm$ 0.9

Note. Bacterial extracts were diluted to 1/10 and incubated for 2 h at 0°C with three different concentrations of [<sup>3</sup>H]RA and in the absence or presence of a 200-fold excess of unlabeled ligand. Aliquots (0.5 ml) were assayed both by the DCC assay and by gel filtration through a BioGel ACA 202 column (1  $\times$  9.5 cm, flow rate 0.3 ml/min) which was eluted with ligand-binding buffer. TB, total retinoid-binding activity; NSB, nonspecific binding activity; TB-NSB, specific-binding activity. Each calculated value of the retinoid specific-binding activity represents the mean  $\pm$  SEM of four experiments.

\* Differences were considered significant if the Wilcoxon test gave a probability (*P*) of less than 0.05.

were treated with a 3% dextran-charcoal suspension under the same conditions described under Materials and Methods, but in the absence of any added bacterial extract. The results, presented in Fig. 1, show that the amount of unadsorbed free retinoic acid increases slightly with retinoid concentration, reaching a maximum at about  $2 \times 10^{-5}$  M. Thus for retinoid concentrations varying between  $10^{-9}$  and  $2 \times 10^{-4}$  M, the capacity of adsorption never falls below 99.2%. This adsorption yield is important to consider when carrying a saturation experiment in retinoid binding assays. At a free retinoid concentration of  $10^{-9}$  M, an error of at least  $2 \times 10^{-12}$  M (i.e., 0.2%) is made in each determination of the bound retinoid, i.e.,  $4 \times 10^{-12}$  M for the determination of the specific sites concentration (which is calculated by difference between two charcoal assays performed in the presence or absence of an excess of unlabeled ligand). When assuming that about 10% of receptor sites become saturated at a free retinoid concentration of  $10^{-9}$  M (see Fig. 3), it follows that a relative error of

$$\frac{4 \times 10^{-12}}{10^{-10}} = 4\%$$

is made in the assay of the receptor sites concentration for a sample containing a total receptor site concentration of  $10^{-9}$  M. This error increases with increasing ligand concentration, reaching 30% at a free retinoid of  $5 \times 10^{-8}$  M, which corresponds to a full saturation of the  $10^{-9}$  M available receptor sites. Clearly, in samples con-

taining less than  $10^{-9}$  M binding sites, an accurate assay becomes very difficult, as reported by Hashimoto *et al.* (17) for nuclear extracts of HL-60 cells containing only  $3 \times 10^{-11}$  M retinoic acid receptor sites.

#### Nonspecific Adhesion of Free Retinoids

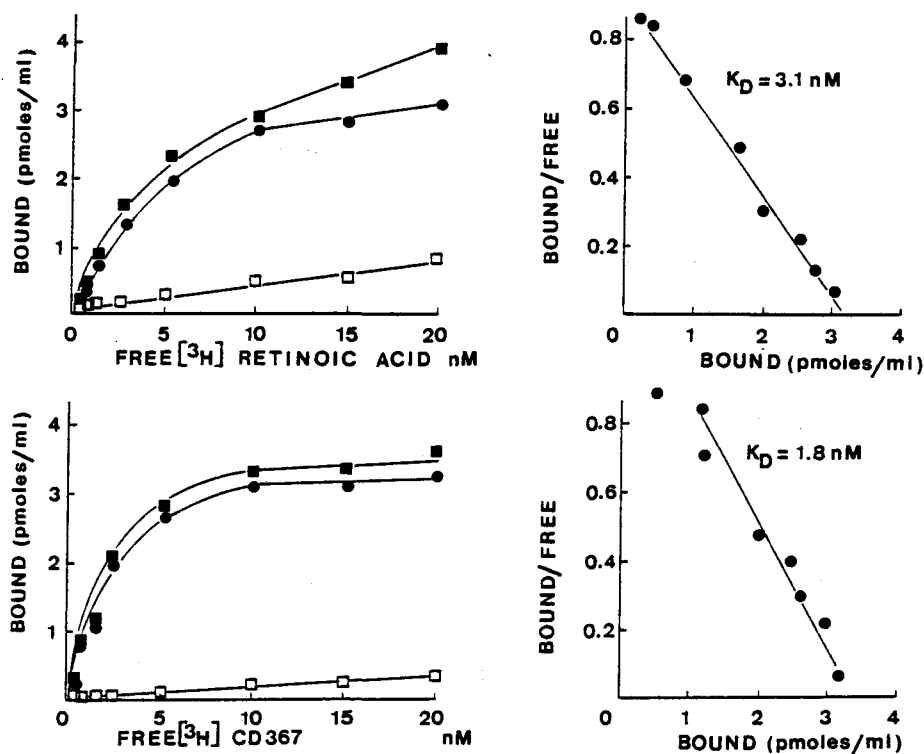
Retinoids are highly hydrophobic ligands which are expected to stick to the walls of the incubation tubes and therefore to be only partly solubilized in the medium. Thus, three types of incubation tubes made of glass, silanized glass, or polystyrene were compared for their ability to adsorb the ligands. Varying amounts of tritiated retinoids (0.1 to 10 pmol) were added to these tubes and mixed with 0.5 ml of ligand buffer solution. Following 5 s of vigorous agitation, aliquots of these incubates were counted for radioactivity. Under these conditions, we measured that nonspecific adsorption did not vary with free ligand concentration in the range  $0.1-10 \times 10^{-9}$  M and reached 50% of the total ligand to polystyrene and silanized glass and 70% to uncoated glass. In the case of CD367, nonspecific adsorption reaches 60% to silanized glass, 80% to polystyrene tubes, and 90% to uncoated glass-tubes. Thus, nonspecific adsorption can be determined when performing a saturation binding assay by measuring the difference between the total added tritiated ligand and the effective total tritiated retinoid concentration in the medium, which must be measured by counting aliquots of incubates before DCC assay (and never calculated assuming a complete solubilization of the added ligand).

#### Effect of Varying Dextran-Charcoal Concentration

The efficiency of free retinoid removal was tested at different concentrations of charcoal. When a diluted bacterial extract (0.3 mg/ml protein concentration) was saturated with tritiated retinoic acid, the adsorption of free ligand was efficient at a final concentration of 10 mg/ml, (Fig. 2A). Above this value, the amount of radioactivity removed by charcoal remains approximately constant. This result indicates a good adsorption capacity for the retinoids at the concentration used, a capacity similar to those observed for the glucocorticoids (3).

#### Effect of the Time of Adsorption with the Dextran-Charcoal Suspension

Following vigorous agitation of the diluted bacterial extracts containing the receptor, with a fixed concentration of dextran-charcoal suspension (3% w/v), the effect of the incubation time in the presence of charcoal was studied. As shown in Fig. 2B, the results demonstrate that, first, 3 min of contact was enough to ensure an efficient charcoal adsorption of free retinoids; second, a slight dissociation of bound retinoid did occur



**FIG. 3.** Saturation binding curves and Scatchard analysis. Diluted bacterial extracts were incubated for 120 min at 0°C in the presence of various <sup>3</sup>H-labeled retinoid concentrations. Specific and nonspecific binding were assayed by the DCC method. Saturation curves (left) and Scatchard plots (right) are represented for both [<sup>3</sup>H]RA (upper) and [<sup>3</sup>H]CD367 (lower).  $K_D$ , Dissociation constants calculated from the slope of the regression curve drawn by the least-squares method.

with increasing time. Reducing time to values shorter than 3 min sharply reduces the adsorption efficiency and gives unreproducible results (data not shown). The second fact could be explained by the high rate of dissociation of the overexpressed hRAR $\alpha$  we used, giving a  $k_d$  (rate constant for dissociation) of  $1.75 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  at 0°C (24), and by the conditions of nonequilibrium which promote the dissociation of bound retinoic acid.

#### Comparison of Charcoal Assay and Gel Filtration for Measurement of Specific Binding of Retinoic Acid

Bacterial extracts diluted to 1/5 in binding buffer were incubated with  $3 \times 10^{-8} \text{ M}$  [<sup>3</sup>H]RA for 2 h at 0°C in the absence or presence of a 200-fold excess of unlabeled retinoic acid. Aliquots of these incubates were further assayed for ligand-binding activity using both the charcoal method and gel filtration through an ACA 202 column. As shown in Table 1, the amount of specifically bound retinoic acid found by charcoal adsorption was similar to that estimated by gel filtration. In fact, at a free retinoid concentration of 1 and  $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ , the ligand-binding activity determined by gel filtration was significantly lower than that measured by the DCC assay. This could be explained by the higher imprecision

in the determination of bound ligand using gel filtration and to its overestimation by the DCC assay. In fact, the charcoal technique was more convenient to use, giving more reproducible results, and appeared better adapted to large series of ligand-binding measurements. *In vitro* binding affinities of retinoids have been determined with overexpressed hRAR $\alpha$  using high-performance size-exclusion chromatography as the separation method (18). With this technique, accurate measurements could be done in less than 15 min, but they required suitable HPLC equipment and more time to perform when studying large series of samples.

#### Scatchard Analysis

Bacterial extracts diluted to 1:50 (0.15 mg/ml protein concentration) in ligand binding buffer were incubated with  $0.1\text{--}30 \times 10^{-9} \text{ M}$  [<sup>3</sup>H]RA or [<sup>3</sup>H]CD367 for 2 h at 0°C in silanized glass tubes. The amount of bound retinoid was measured using the DCC assay and the total available ligand concentration was measured by counting aliquots of incubates before the DCC assay, in order to take nonspecific adsorption of free ligand into consideration. As shown in Fig. 3, the apparent equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ) of retinoic acid was  $3.1 \pm 0.4$

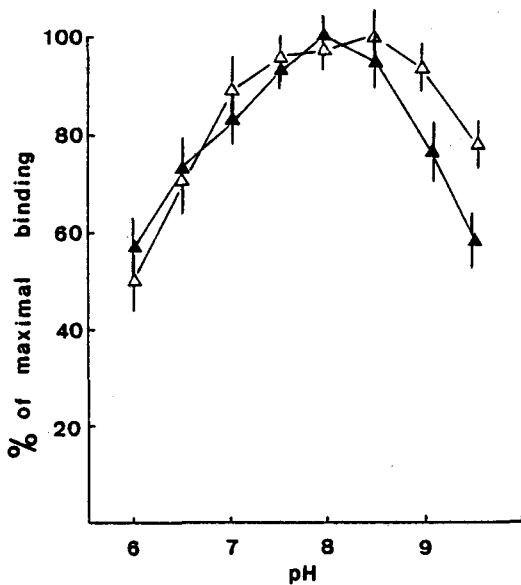


FIG. 4. Influence of pH on retinoid binding to the recombinant hRAR $\alpha$ . Aliquots of bacterial extracts were diluted with 0.1 M phosphate buffer samples adjusted at various pHs. They were then incubated with  $3 \times 10^{-9}$  M of [ $^3$ H]RA or [ $^3$ H]CD 367 in the presence or in the absence of a 500-fold excess of the corresponding unlabeled retinoid. The amount of specific binding was determined by the charcoal technique. The values obtained with retinoic acid ( $\blacktriangle$ ) or with CD367 ( $\triangle$ ) were plotted as percentage of the maximal binding.

nM (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ) and the  $K_D$  of CD367 was 1.8  $\pm$  0.3 nM (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). These values are twofold lower than those we have previously obtained (24), which gave  $K_D$  values of 7 and 4 nM, respectively. These discrepancies can be explained by the error made in the determination of the free retinoid concentration as discussed above.

#### *Effect of pH on Retinoid Binding to the Recombinant Receptor*

The influence of pH on the binding of [ $^3$ H]RA and [ $^3$ H]CD367 to the overexpressed receptor was studied between pH 6 and 9.5. The optimal pH for the binding of retinoic acid was in the range 7.5–8.5 with a maximum at pH 8.0. The maximum of CD367 binding activity was less sharp, ranging between 7.5 and 8.5 with an apparent maximum observed value at around 8.5 (Fig. 4). Below pH 6 and above pH 9.5, the binding activities sharply decreased, suggesting that the receptor undergoes rapid denaturation (data not shown).

#### *Effect of Protein Concentrations on the Amount of Specifically Bound Retinoid*

The retinoid-binding assay was most often used as a qualitative method to ensure the affinity of RARs (7–

10). However, it can also be used as a quantitative assay to determine the concentration of functional receptors obtained with an overexpression system. In such an assay, the protein concentration of the extract is of critical importance. As shown on Fig. 5, the quantitative determination of specifically bound [ $^3$ H]retinoic acid depends on the protein concentration of the bacterial extract. We have determined that under the conditions described for the charcoal assay, bound retinoid measurement was linearly related to the protein concentration between 0.05 and 0.25 mg/ml. However, below and above these values, the relationship was no longer linear. The absence of any detectable specific binding at protein concentration lower than 0.05 mg/ml could be caused by adsorption of retinoid–receptor complexes to charcoal itself, or to nonspecific adsorption of low amounts of protein to the tube wall, or to both phenomena. At high protein concentrations (0.25 to 0.4 mg/ml), the lack of linearity was probably due to an excess of binding sites versus the available free retinoid, since increasing the total retinoid concentration (30 to 500  $\times 10^{-9}$  M) in the incubation tubes improved the linearity in this interval (data not shown).

When different concentrations of BSA (0.1 to 1.0 mg/ml) were added to the dextran–charcoal suspension, an excellent linearity was obtained between 0 and 0.25 mg/ml protein concentration (Fig. 5). Moreover, we observed that BSA has a stabilizing effect on the ligand-binding activity and probably reduces the loss of receptor protein in very dilute samples. The same stabilizing effect was observed for the three different ligand concentrations tested ( $2 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-9}$ , and  $2 \times 10^{-9}$  M). This parameter is important to allow an accurate measurement of the amount of functional receptor, particularly in case of recombinant receptors. Changing BSA for another protein such as  $\gamma$ -globulin, as proposed (20), did not alter the results.

#### *Effect of the Composition of the Incubation Buffer on the Measurement of both Total and Nonspecific Binding Activities*

In our hands, nonspecific binding observed when assaying [ $^3$ H]retinoic acid binding activity of hRAR $\alpha$  with DCC accounted for 10 to 25% of the total binding sites (see Fig. 3). Similar values, in the range 7–40%, have been reported by others for the assay of recombinant hRARs, whatever the separation technique used to remove the excess of free retinoid (17–20). Various additives have been proposed in order to reduce nonspecific binding including gelatin (18,19) and  $\gamma$ -globulin (20). We tested the effect of gelatin as follows: bacterial extracts were diluted 20-, 40-, or 80-fold in the ligand-



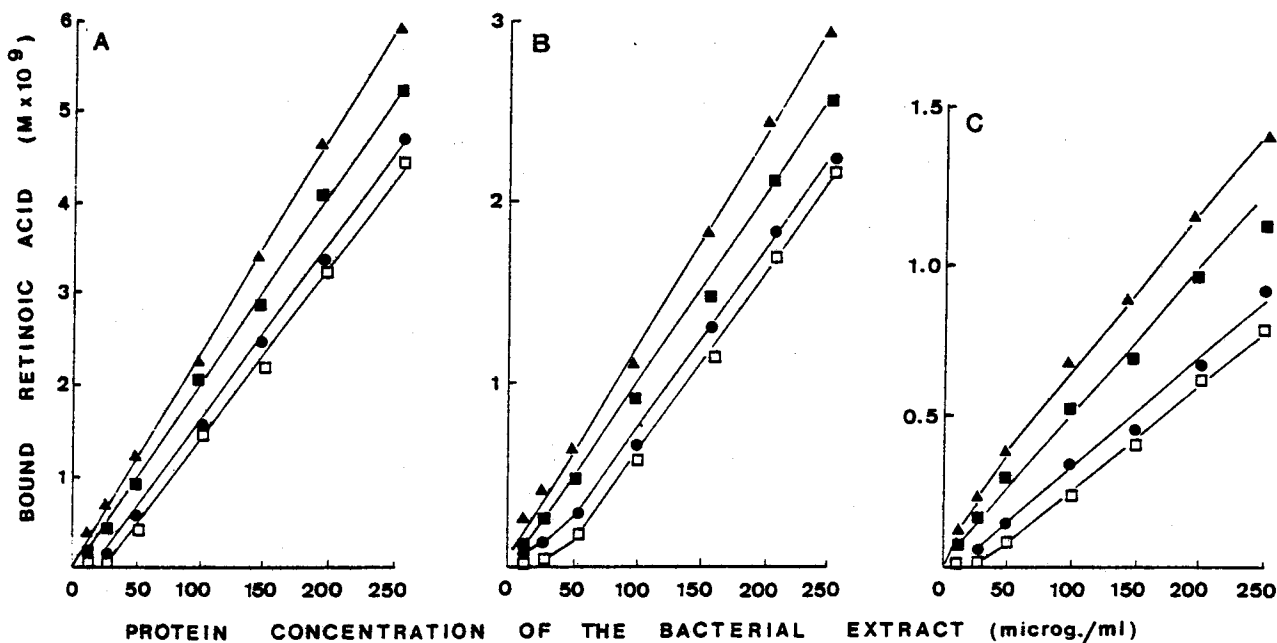


FIG. 5. Effect of protein concentration of the bacterial extract on specific retinoid-binding activity. A crude bacterial extract (8 mg/ml protein concentration) was diluted to varying concentrations. Different aliquots were then incubated with  $2 \times 10^{-8}$  M (A),  $5 \times 10^{-9}$  M (B), and  $2 \times 10^{-9}$  M (C) retinoic acid and further assayed for specific retinoid-binding as described under Materials and Methods. Dextran-charcoal assay was performed in two parallel experiments without ( $\square$ ) or with 0.1 ( $\bullet$ ), 0.3 ( $\blacksquare$ ), or 1 mg/ml ( $\blacktriangle$ ) added bovine serum albumin.

binding buffer in the presence or in the absence of 0.5% (w/v) gelatin, and then aliquots were incubated with [ $^3$ H]RA followed by retinoid-binding assay as described. Surprisingly, adding gelatin did enhance total and nonspecific binding without having an important effect upon specific binding (Table 2). A possible explanation is that gelatin was trapping retinoic acid, a phenomenon resulting in reduced efficiency of the retinoid adsorption by charcoal.

Some organic solvents, owing to their dipolar structure can affect the overall organization of water bonding to solute molecules. Moreover, we have shown previ-

ously that acetonitrile can increase the dissociation rate constant of the ligand-glucocorticoid receptor complexes (26). Organic solvents globally increase the ligand exchange kinetics of both nonspecific and specific binding sites. A significant reduction of nonspecific binding can therefore be expected in their presence, when assayed using nonequilibrium techniques like the DCC assay. Two different solvents, dimethylformamide (DMF) and dimethyl sulfoxide (DMSO), were tested for their ability to reduce nonspecific binding activity (Table 3). Bacterial extracts diluted to a protein concentration of 0.2 mg/ml were incubated for 2 h with [ $^3$ H]RA or

TABLE 2  
Effect of Gelatin on the Measurement of Total and Nonspecific Retinoid-Binding Activity

Protein concentration of the bacterial extract (mg/ml)	Ligand-binding activity (nm) <sup>a</sup>					
	-Gelatin			+Gelatin		
	TB	NSB	NSB/TB	TB	NSB	NSB/TB
0.4	4.50	0.72	0.16	4.70	1.55	0.33
0.2	3.50	0.70	0.20	3.80	1.29	0.34
0.1	1.60	0.75	0.47	2.50	1.50	0.60

Note. TB, Total retinoid-binding activity; NSB, nonspecific binding activity; NSB/TB, ratio of the nonspecific to total binding activity.  
<sup>a</sup> Ligand-binding activity was measured using [ $^3$ H]RA as described under Materials and Methods and expressed in nanomoles per liter. Results are the mean of triplicate experiments.

TABLE 3  
Effect of the Addition of Dimethylformamide (DMF) and Dimethyl sulfoxide (DMSO)  
on the Dextran-Charcoal Adsorption Assay

	Solvent added						
	None	DMF (%)			DMSO (%)		
		1	3	6	1	3	6
RA							
TB	4.1	4.2	3.8	4.0	4.1	4.2	
NSB	0.82	0.88	0.57	0.72	0.70	0.97	
100 × NSB/TB	20	21	15*	18	17*	23	
CD367							
TB	3.3	3.1	3.2	3.0	3.0	3.4	
NSB	0.20	0.15	0.17	0.09	0.17	0.20	
100 × NSB/TB	6.0	5.0*	5.3	3.1*	5.8	6.0.	

Note. TB, Total retinoid-binding activity. NSB, nonspecific retinoid-binding activity. NSB/TB, ratio of the nonspecific to total binding activity. The retinoid binding activity was measured using [<sup>3</sup>H]RA or [<sup>3</sup>H]CD367 as described and expressed in nanomoles per liter. Each point represents the average of triplicate measurements.

\* Significantly different from controls ( $P < 0.05$ ).

[<sup>3</sup>H]CD367 and submitted to total and nonspecific ligand-binding assay. The results were compared by using DCC suspensions containing varying amounts (1–6%) of the two indicated solvents. When compared to a control performed in the absence of any added organic solvent, addition of 3% DMF did significantly reduce nonspecific binding of retinoic acid whereas 6% of the same solvent was needed to reduce nonspecific binding of the retinoid CD367. When used under the same conditions, DMSO was effective only in reducing nonspecific binding of retinoic acid, at a 3% concentration.

At concentrations above 6%, addition of both solvents increases the nonspecific to total retinoid-binding ratio as a result of a significant decrease in total retinoid binding activity (data not shown). It is likely that, in this case, a partial inactivation of the receptor itself did occur.

Finally, we observe that when using retinoic acid, regardless of the conditions used, bacterial extracts often resulted in a level of nonspecific binding in the range 10–25%. Nonspecific binding was most often lower (4–10%) when resorting to CD367, a chemically stable retinoid compound.

As a whole, our study of the influence of various parameters on the dextran-charcoal assay for retinoids demonstrated that this separation technique is very efficient in retaining the excess of free retinoid and allows a precise measurement of the concentration of specific binding sites above  $10^{-9}$  M. A second parameter affecting saturation binding measurements is the accurate determination of the free retinoid concentration which depends on the adhesive properties of retinoids. This problem could be partially overcome by using silanized

glass or polystyrene and by measuring the effective total ligand concentration of incubates before the DCC assay.

The adsorption of free ligand by dextran-charcoal is rapid (less than 3 min), offering a convenient technique which can be easily performed with large series of tubes. It is more accurate than separation obtained by gel filtration and faster than high-performance size-exclusion chromatography.

The protein concentration of the samples is one of the most critical parameters to check in order to measure accurately the number of specific binding sites. Especially when the protein concentration is lower than 50 µg/ml, BSA must be added to the charcoal buffer to reduce nonspecific loss of receptor protein during the adsorption step with dextran-charcoal. In conclusion, we recommend an optimized procedure as follows. First, the binding buffer should be kept around pH 7.5–8.0 and the total protein concentration should be maintained between 0.05 and 0.25 mg/ml. Second, a minimal 3-min adsorption time with charcoal at a final concentration of 10 mg/ml is a good compromise. Finally, CD367 is preferable as tritiated retinoid when one wants to limit nonspecific binding. Otherwise, DMF or DMSO can be added at a 3% concentration to reduce nonspecific binding of retinoic acid.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the University of Lille II, by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CJF 92-03), and by l'Association de la Recherche sur le Cancer. The help of Ms. F. Delporte is gratefully acknowledged. We thank Ms. S. Tourney for her excellent secretarial assistance and Dr. B. Shroot for generous gift of CD367.

## REFERENCES

1. Murphy, B. E. P. (1967) *J. Clin. Endocrinol.* **27**, 973.
2. Baxter, J. D., and Tomkins, G. M. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 932.
3. Rousseau, G. G., Baxter, J. D., and Tomkins, G. M. (1972) *J. Mol. Biol.* **67**, 99-115.
4. Schrader, W. T. (1975) in *Methods in Enzymology* (O'Malley, B. N., and Hardman, J. D., Eds.), Vol. 36, pp. 187-211, Academic Press, New York.
5. Dokoh, S., Pike, J. W., Chandler, J. S., Mancini, J. M., and Haussler, M. (1981) *Anal. Biochem.* **116**, 211-222.
6. Giguere, V., Ong, S. E., Segui, P., and Evans, R. M. (1987) *Nature* **330**, 624-629.
7. Petkovitch, M., Brand, N. J., Krust, A., and Chambon, P. (1987) *Nature* **330**, 444-450.
8. Benbrook, D., Lernhardt, E., and Pfahl, M. (1988) *Nature* **333**, 669-672.
9. Brand, N. J., Petkovitch, M., Krust, A., Chambon, P., de Thé, H., Marchio, A., Tiollais, P., and Dejean, A. (1988) *Nature* **332**, 850-853.
10. Krust, A., Kastner, P., Petkovitch, M., Zelent, A., and Chambon, P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 329-333.
11. Zelent, A., Krust, A., Petkovitch, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1989) *Nature* **339**, 714-717.
12. Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A., and Evans, R. M. (1990) *Nature* **345**, 224-229.
13. Lehmann, J. M., Dawson, M. L., Hobbs, P. D., Husmann, M., and Pfahl, M. (1991) *Cancer Res.* **51**, 4804-4809.
14. Delescluse, C., Cavey, M. T., Martin, B., Bernard, B. A., Reichert, U., Maignan, J., Darmon, M., and Shroot, B. (1991) *Mol. Pharmacol.* **40**, 556-562.
15. Bernard, B. A., Bernardon, J. M., Delescluse, C., Martin, B., Lenoir, M. C., Maignan, J., Charpentier, B., Pilgrim, W. R., Reichert, U., and Shroot, B. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 977-983.
16. Trown, P. W., Palleroni, A. V., Bohoslawec, O., Richelo, B. N., Halpern, J. M., Gizzi, L. M., Geiger, R., Lewinski, C., Machlin, L. J., Jetten, A., and Jetten, M. E. R. (1980) *Cancer Res.* **40**, 212-220.
17. Hashimoto, Y., Kagechika, H., Kawachi, H., and Shudo, K. (1988) *Jpn. J. Cancer Res.* **79**, 473-483.
18. Yang, N., Schüle, R., Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3559-3563.
19. Crettaz, M., Baron, A., Siegenthaler, G., and Hunziker, W. (1990) *Biochem. J.* **272**, 391-397.
20. Keidel, S., Rupp, E., and Szardenings, M. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 1141-1148.
21. Cavey, M. T., Martin, B., Carlavan, I., and Shroot, B. (1990) *Anal. Biochem.* **186**, 19-23.
22. Yarus, M., and Berg, P. (1970) *Anal. Biochem.* **35**, 450-465.
23. Wecksler, W. R., and Norman, A. W. (1979) *Anal. Biochem.* **92**, 314-323.
24. Dallery, N., Sablonnière, B., Grillier, I., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 12428-12436.
25. Bradford, M. (1986) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
26. Danzé, P. M., Richard, C., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1990) *Steroids* **55**, 10-16.

### C) DISCUSSION :

Nous avons pu montrer que le charbon-dextran, à une concentration finale de 10 mg/ml, présente une très bonne efficacité puisqu'il adsorbe plus de 99,2 % du ligand libre, pour des concentrations de ligand atteignant  $10^{-4}$  M. Cependant, ce rendement d'adsorption doit être pris en compte lors des expériences réalisées en conditions de saturation car il introduit une erreur dans la détermination du nombre de sites de liaison. Cette erreur est d'autant plus importante que le nombre de sites est faible.

La concentration en protéines de l'échantillon étudié est un facteur important à considérer lorsque l'on étudie l'activité de liaison à des fins quantitatives. En effet, on peut observer une relation linéaire entre la liaison mesurée et le taux de protéines pour des concentrations comprises entre 0,05 et 0,25 mg/ml. L'absence de liaison spécifique pour les concentrations inférieures à 0,05 mg/ml peut être due à l'adsorption des complexes formés par le charbon. La présence de sérumalbumine stabilise les complexes récepteur-ligand et permet d'observer une linéarité pour les échantillons très dilués. L'excès de sites récepteurs par rapport au ligand libre disponible peut être responsable de la perte de la linéarité pour les échantillons plus concentrés.

La liaison non spécifique représente 10 à 25 % de la liaison totale et peut même atteindre 40 %. La liaison non spécifique diminue en présence de DMF ou DMSO à une concentration de 3 % alors que celle du CD367 n'est réduite qu'en présence de DMF à 6 %.

L'hydrophobicité des ligands favorise leur adsorption sur la paroi des tubes. Cette adsorption non spécifique peut être très importante et doit être prise en compte au moment de la détermination de l'activité de liaison en mesurant la quantité exacte de ligand tritié en solution dans l'incubat.

En tenant compte de ces observations, nous avons procédé à une nouvelle détermination de la constante d'affinité de l'acide rétinolique et du CD367. Les valeurs mesurées sont deux fois plus faibles que celles obtenues auparavant (voir premier article). Récemment, d'autres auteurs ont également insisté sur l'intérêt de l'optimisation de la technique de mesure de l'activité de liaison. En effet, le groupe de Heyman a optimisé la mesure de l'activité de la liaison RXR-acide 9-cis rétinolique. La méthode de séparation utilisée est l'hydroxylapatite. L'incubation du récepteur avec le ligand et la séparation du ligand libre du ligand lié se font en présence d'un détergent, le CHAPS, à une concentration finale de 0,5 %. La liaison non spécifique est alors réduite, ce qui leur permet d'améliorer d'un facteur 6 à 9 la valeur du  $K_d$  mesurée (Allegretto *et al.*, 1993).

La technique du charbon est donc une méthode très efficace de séparation du ligand libre du lié, plus précise que la gel filtration et plus rapide que la chromatographie d'exclusion de taille à haute performance.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'acide rétinoïque tout-trans et ses dérivés suscitent un grand intérêt dans l'étude de la morphogenèse et dans le domaine thérapeutique, en particulier en cancérologie et en dermatologie. La compréhension du mécanisme moléculaire d'action des rétinoïdes et la synthèse de dérivés agonistes ou antagonistes spécifiques d'un récepteur nécessitent de bien connaître le domaine de fixation au ligand des RAR.

La surexpression du domaine E de RAR $\alpha$  dans un système bactérien nous a permis de procéder à sa purification et à sa caractérisation biochimique. Nous disposons du matériel nécessaire à l'étude des acides aminés impliqués dans l'interaction récepteur-ligand.

L'utilisation des réactifs spécifiques des thiols suggèrent qu'une cystéine est localisée dans ou à proximité du site actif du domaine E de RAR $\alpha$ . La vérification de cette hypothèse a été abordée par une approche indirecte. Celle-ci est basée sur la différence des masses moléculaires des peptides issus du domaine E selon qu'il est alkylé en présence ou en absence de ligand. Nous disposons de résultats certes préliminaires mais très encourageants. La première étape de la suite de ce travail sera d'obtenir le spectre de masse de tous les peptides obtenus après coupure par le bromure de cyanogène. Le peptide situé à l'extrémité N-terminale est d'autant plus important qu'il possède quatre résidus cystéines. Des essais de purification de ce peptide par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel seront entrepris. Cela s'avère tout à fait envisageable puisqu'il comporte le motif composé des six histidines nécessaire à l'adsorption sur la colonne. Le peptide purifié sera ensuite soumis à une coupure enzymatique ou chimique. L'hydrolysate obtenu sera analysé en spectrométrie de masse.

Nous proposons également de soumettre la protéine  $\Delta$ N186-462 à d'autres coupures telle que la coupure à l'acide acétique 0,25 N. On procédera ensuite aux mêmes essais après alkylation en absence et en présence du ligand. Là se pose évidemment le problème de la fonctionnalité du récepteur purifié. Pour notre étude, ce problème pourra être contourné en incubant le récepteur avec le ligand et en l'alkylant avant purification. L'incubation avec le ligand peut même être réalisée dans la culture de bactéries elle-même sans que cela nuise à leur croissance. Ce problème de fonctionnalité limite encore les études telles que la détermination de la structure tridimensionnelle par cristallographie.

La technique mise au point pour les réactifs des thiols pourra être appliquée aux réactifs spécifiques d'autres acides aminés. Il sera ainsi possible d'identifier les résidus localisés dans le site actif. Ce travail devra être complété par des expériences de mutagenèse dirigée, les différentes techniques d'étude du rôle de ces acides aminés étant tout à fait complémentaires.

La comparaison du mode d'interaction des différents ligands agonistes, plus ou moins spécifiques, et antagonistes présente un intérêt considérable. Elle pourrait être abordée par cette technique, basée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse.



## **APPENDICE TECHNIQUE**

**Expression et purification de la protéine  $\Delta$ N186-462:****Matériel:** Résine Ni-NTA (Quiagen)Souche bactérienne recombinante (M15 transformée par le vecteur d'expression pQ9- $\Delta$ N186-462) fournie par B. Lefebvre.**Tampons:** Tampon A: Chlorhydrate de guanidine 6 MNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M

Tris 0,01 M

 $\beta$ -mercaptoéthanol 20 mM

pH ajusté à 8,00 avec NaOH

Tampons B à E: Urée 8 M

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M

Tris 0,01 M

 $\beta$ -mercaptoéthanol 20 mM

B: pH ajusté à 8,00 avec NaOH

C: pH ajusté à 6,3 avec HCl

D: pH ajusté à 5,9 avec HCl

E: pH ajusté à 4,5 avec HCl

Tampon F: Chlorhydrate de guanidine 6 M

Acide acétique 0,2 M.

***Mode opératoire:*****Expression de la protéine:**

Une colonie de bactéries recombinantes est précultivée en milieu LB en présence d'ampicilline (100 mg/l) et de kanamycine (25 mg/l) jusqu'à saturation. Elle est diluée dans un litre de milieu de façon à obtenir une DO<sub>600</sub> égale à 0,2 et remise en culture à 37 °C sous agitation. Lorsque la DO<sub>600</sub> est comprise entre 0,8 et 1, l'induction est réalisée par addition d'IPTG à une concentration finale de 0,5 mM. La culture se poursuit 5 h, elle est alors centrifugée à 4000 rpm à 4 °C pendant 30 min. Le culot est repris par 10 ml de tampon A, agité et laissé à température ambiante pendant 1 h. Il est ensuite centrifugé à 15000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est recueilli.

**Purification de la protéine:*****Préparation de la résine:***

1 ml de résine est lavé par 10 ml d'eau avant d'être lavé successivement par 10 ml de tampon A, 4 ml de B, 8 ml de C, 3 ml de F puis 4 ml de tampon A.

***Purification:***

Les 10 ml de surnageant sont déposés sur la colonne (débit: 0,1 ml/min). La résine est ensuite lavée par 20 ml de tampon A, 10 ml de B, 12 ml de C puis 20 ml de D. L'élution est effectuée par 5 ml de tampon E.

**Coupage de la protéine  $\Delta$ N186-462 par le bromure de cyanogène:**

La protéine purifiée est dialysée pendant 48 h contre une solution d'HCl 0,01 N puis lyophilisée. Elle est ensuite soumise à une digestion par le bromure de cyanogène dans un tampon d'acide formique à 70 %, avec un rapport de 100 moles de réactif par mole de méthionine, pendant 24 h à température ambiante. La réaction est stoppée par dilution au cinquième dans l'eau.

Après lyophilisation de l'hydrolysate, les peptides, repris dans l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1 %, sont séparés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (colonne C18, Bondapak Waters). L'élution est réalisée par un gradient d'acétonitrile de 0 à 90 % dans le TFA à 0,1 % avec un débit de 1 ml/min. Des fractions de 1 ml sont recueillies, lyophilisées et analysées en spectrométrie de masse.

**Modification des arginines par les réactifs spécifiques:**

Tampons : Tampon borate pour l'étude de l'effet de la butanedione

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 50 mM

NaCl 150 mM

DTT 1mM

pH 8,5. à réajuster pendant la réaction avec NaOH 5 N

Tampon phosphate pour l'étude de l'effet du p-hydroxyphénylgyoxal

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 9

NaCl 150 mM

DTT 1 mM

***Mode opératoire:***

Les extraits bruts contenant la protéine GST-hRAR $\alpha$ LBD sont préparés suivant le mode opératoire décrit dans le premier article avec une modification: le Tris est remplacé par NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Les extraits bruts sont dilués dans le tampon adéquat pour obtenir une concentration de 0,25 mg/ml. Des aliquotes sont traitées aux concentrations suivantes: 0-10 mM pour le glyoxal ; 0-200 mM pour la butanedione. La réaction avec le glyoxal se fait à l'abri de la lumière. Après une heure d'incubation à température ambiante avec les réactifs, les aliquotes sont incubées pendant une nuit à 4 °C avec le ligand radioactif en présence ou non d'un excès de ligand froid en vue de mesurer la liaison spécifique, comme décrit dans le second article.

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS**

	Page
<b><u>Revue générale :</u></b>	
Fig. 1 : Rétinoïdes naturels actifs (A) ou non (B) sur RAR et RXR.	12
Fig. 2 : Rétinoïdes de synthèse de première (1), deuxième (2) et troisième (3) générations.	14
Fig. 3 : Mécanisme moléculaire d'action des acides 9-cis et tout-trans rétinoïques (d'après Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1994).	17
Fig. 4 : Structure générale et organisation fonctionnelle des récepteurs nucléaires.	20
Fig. 5 : Stratégies utilisées pour la caractérisation d'un gène nouvellement cloné (d'après Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1994).	22
Fig. 6 : Homologies de séquence entre les différentes formes de RAR (A) et RXR (B) et d'autres récepteurs nucléaires (d'après Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1994).	24
Fig. 7 : Localisation des différentes "boîtes" du domaine C.	30
Fig. 8 : Différents RARE caractérisés (d'après Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1994).	33
Fig. 9 : Différents RXRE caractérisés (d'après Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1994).	35
Fig. 10 : Application de la règle 1-2-3-4-5 à différents HRE caractérisés (d'après Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1994).	37
Fig. 11 : Interactions des homodimères RXR/TR ou RXR/RAR avec leur élément de réponse. Modèles proposés par Kurokawa <i>et al.</i> (1993) ; Perlmann <i>et al.</i> (1993).	40
Fig. 12 : Interactions des homodimères RXR/TR ou RXR/RAR avec leur élément de réponse. Modèles proposés par Zechel <i>et al.</i> (1994b).	42
Fig. 13 : Ligands des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens.	46
Fig. 14 : Anatomie du domaine E des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens (d'après Forman et Samuels, 1990).	47
Fig. 15 : Rétinoïdes de synthèse sélectifs. La sélectivité est précisée pour chaque molécule	49
Fig. 16 : Rétinoïdes de synthèse spécifiques des RXR.	50
Fig. 17 : Anti-oestrogènes (A) et antagonistes sélectifs de RAR $\alpha$ (B) ou RAR $\alpha$ - $\beta$ (C)	52
Fig. 18 : Localisation des cystéines des différents récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens. Les cystéines conservées chez plusieurs récepteurs sont encadrées. Toutes les cystéines de RAR $\alpha$ sont conservées chez RAR $\beta$ et RAR $\gamma$ sauf la Cys 444.	54
Fig. 19 : A : Marqueurs d'affinité électrophiles, B : Marqueurs de photoaffinité des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens.	57
Fig. 20 : Marqueur de photoaffinité de RAR $\alpha$ : ADAM-3.	63
Fig. 21 : Mutations touchant le domaine E du récepteur des androgènes.	73
Fig. 22 : Mutations associées à la résistance généralisée aux hormones thyroïdiennes. La numérotation correspond à la séquence de l'ADNc de Weinberger <i>et al.</i> , 1986.	76
Fig. 23 : Domaine E de hER : résultats des études de marquage d'affinité et des	

récepteurs mutants.	79
Fig. 24 : Résultats des différentes études du GR. La séquence correspond au GR de souris. La numérotation correspondant au GR humain (h) ou de rat (r) est précisée.	80
Fig. 25 : Résultats des différentes études du domaine E du récepteur humain de la progestérone.	81
Fig. 26 : Représentation schématique de la structure du domaine E de hTR $\beta$ 1 proposée par Cheng <i>et al.</i> (1994). Les extrémités N- et C-terminales sont notées N et C	85
Fig. 27 : Représentation du complexe CRBP-rétinol d'après Cowan <i>et al.</i> (1993).	87
Tableau 1 : Différents RAR et RXR caractérisés (d'après Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1994).	25

### **Résultats et Discussion :**

Fig. 28 : Effet des N-maléimides sur l'activité de liaison des RAR $\alpha$ (A), $\beta$ (B) et $\gamma$ (C).	115
Fig. 29 : Séquence de la protéine $\Delta$ N186-462. Sites de coupure théorique par le BrCN et numérotation des peptides correspondants. Ceux qui ont été identifiés en spectrométrie de masse sont soulignés et en gras. L1 et L2 : régions du domaine E responsables de la fixation du ligand (voir figure 14). Résidus correspondant aux Arg et Lys de RAR $\beta$ supposées essentielles à la liaison	118
Fig. 30 : Spectre de masse de l'hydrolysât brut de la protéine $\Delta$ N186-462.	121
Fig. 31 : Spectre de masse du peptide 2. Masse observée : 2568.	122
Fig. 32 : Spectre de masse du peptide 2 oxydé. Masse observée : 2585.	123
Fig. 33 : Spectre de masse du peptide 3. Masse observée : 3142.	124
Fig. 34 : Spectre de masse du peptide 4. Masse observée : 2769.	125
Fig. 35 : Spectre de masse du peptide 5. Masse observée : 4742.	126
Fig. 36 : Spectre de masse du peptide 6. Masse observée : 215,2.	127
Fig. 37 : Spectre de masse du peptide 7. Masse observée : 2282.	128
Fig. 38 : Spectre de masse du peptide 8. Masse observée : 585,2	129
Fig. 39 : Spectre de masse du peptide 9. Masse observée : 779,4.	130
Fig. 40 : Spectre du courant ionique total. La masse des peptides identifiés dans chaque pic est indiquée.	131
Fig. 41 : A. Mécanisme moléculaire d'action de la butanedione avec l'arginine. B. Dérivés suggérés pour l'action du p-hydroxyphénylglyoxal avec l'arginine.	133
Fig. 42 : Effet du pOH-phénylglyoxal avant ou après liaison du ligand	134
Fig. 43 : Effet de la butanedione sur la liaison CD367-RAR avant ou après liaison du CD367.	134
Tableau 2 : Constantes d'affinité (nM) de l'acide rétinoïque pour les différents RAR recombinants.	111
Tableau 3 : Masses moléculaires des peptides attendus après coupure de la protéine $\Delta$ N186-462 par le bromure de cyanogène.	119

## **BIBLIOGRAPHIE**



ALLAN, G.F., LENG, X., TSAI, S.Y., WEIGEL, N.L., EDWARDS, D.P., TSAI, M.-J., and O'MALLEY, B.W. (1992a).

Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation.

*J. Biol. Chem.* **267** : 19513-19520.

ALLAN, G.F., TSAI, S.Y., TSAI, M.-J., and O'MALLEY, B.W. (1992b).

Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 11750-11754.

ALLEGRETTO, E.A., MAC CLURG, M.R., LAZARCHIK, S.B., CLEMM, D.L., KERNER, S.A., ELGORT, M.G., BOEHM, M.F., WHITE, S.K., PIKE, J.W., and HEYMAN, R.A. (1993).

Transactivation properties of retinoic acid and retinoid X receptors in mammalian cells and yeast. Correlation with hormone binding and effects of metabolism.

*J. Biol. Chem.* **268** : 26625-26633.

ALLENBY, G., BOCQUEL, M.-T., SAUNDERS, M., KAZMER, S., SPECK, J., ROSENBERGER, M., LOVEY, A., KASTNER, P., GRIPPO, J.F., CHAMBON, P., and LEVIN, A.A. (1993).

Retinoic acid receptors and retinoid X receptors : interactions with endogenous retinoic acids.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 30-34.

ALNEMRI, E.S., MAKSYMOWYCH, A.B., ROBERTSON, N.M., and LITWACK, G. (1991a).

Characterization and purification of a functional rat glucocorticoid receptor overexpressed in a baculovirus system.

*J. Biol. Chem.* **266** : 3925-3936.

ALNEMRI, E.S., MAKSYMOWYCH, A.B., ROBERTSON, N.M., and LITWACK, G. (1991b).

Overexpression and characterization of the human mineralocorticoid receptor.

*J. Biol. Chem.* **266** : 18072-18081.

ALNEMRI, E.S., and LITWACK, G. (1993).

The steroid binding domain influences intracellular solubility of the baculovirus overexpressed glucocorticoid and mineralocorticoid receptors.

*Biochemistry* **32** : 5387-5393.

APFEL, C., BAUER, F., CRETZAZ, M., FORNI, L., KAMBER, M., KAUFMANN, F., LEMOTTE, P., PIRSON, W., and KLAUS, M. (1992).

A retinoic acid receptor  $\alpha$  antagonist selectively counteracts retinoic acid effects.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 7129-7133.

AU-FLIEGNER, M., HELMER, E., CASANOVA, J., RAAKA, B.M., and SAMUELS, H.H. (1993).

The conserved ninth C-terminal heptad in thyroid hormone and retinoic acid receptors mediates diverse responses by affecting heterodimer but not homodimer formation.

*Mol. Cell. Biol.* **13** : 5725-5737.

BEEKMAN, J.M., ALLAN, G.F., TSAI, S.Y., TSAI, M.-J., and O'MALLEY, B.W. (1993).

Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain.

*Mol. Endocrinol.* **7** : 1266-1274.

BELLINGHAM, D.L., and CIDLOWSKI, J.A. (1989).

Stable overproduction of intact glucocorticoid receptors in mammalian cells using a selectable glucocorticoid responsive dihydrofolate reductase gene.

*Mol. Endocrinol.* **3** : 1733-1747.

BENBROOK, D., LERNHARDT, E., and PFAHL, M. (1988).

A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma.

*Nature* **333** : 669-672.

BENHAMOU, B., GARCIA, T., LEROUGE, T., VERGEZAC, A., GOFFLO, D., BIGOGNE, C., CHAMBON, P., and GRONEMEYER, H. (1992).

A single amino acid that determines the sensitivity of progesterone receptors to RU486.

*Science* **255** : 206-209.

BERNARD, B.A., BERNARDON, J.-M., DELESCLUSE, C., MARTIN, B., LENOIR, M.-C., MAIGNAN, J., CHARPENTIER, B., PILGRIM, W.R., REICHERT, U., and SHROOT, B. (1992).

Identification of synthetic retinoids with selectivity for human nuclear retinoic acid receptor  $\gamma$ .

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186** : 977-983.

BHAT, M.K., PARKISON, C., MAC PHIE, P., LIANG, C.-M., and CHENG, S.-Y. (1993).

Conformational changes of human  $\beta 1$  thyroid hormone receptor induced by binding of 3,3',5-triiodo-L-thyronine.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195** : 385-392.

BINART, N., LOMBES, M., RAFESTIN-OBLIN, M.-E., and BAULIEU, E.-E. (1991).

Characterization of human mineralocorticosteroid receptor expressed in the baculovirus system.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 10681-10685.

BIRNBAUMER, M., SCHRADER, W.T., and O'MALLEY, B.W. (1983a).

Photoaffinity labeling of the chick progesterone receptor proteins. Similar hormone binding domains detected after removal of proteolytic interference.

*J. Biol. Chem.* **255** : 1637-1644.

BIRNBAUMER, M., SCHRADER, W.T., and O'MALLEY, B.W. (1983b).

Assessment of structural similarities in chick oviduct progesterone receptor subunits by partial proteolysis of photoaffinity-labeled proteins.

*J. Biol. Chem.* **258** : 7331-7337.

BLUMBERG, B., MANGELSDORF, D.J., DYCK, J.A., BITTNER, D.A., EVANS, R.M., and DE ROBERTIS, E.M. (1992).

Multiple retinoid-responsive receptors in a single cell : families of retinoid "X" receptors and retinoic acid receptors in the *Xenopus* egg.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 2321-2325.

BONIFER, C., DAHLMAN, K., STROMSTEDT, P.-E., FLOCK, J.-I., and GUSTAFSSON, J.-A. (1989).

DNA binding of glucocorticoid receptor protein A fusion proteins expressed in *E. coli*.

*J. Steroid Biochem.* **32** : 5-11.

BOOTHROYD, C.V., TEH, B.T., HAYWARD, N.K., HICKMAN, P.E., WARD, G.J., and CAMERON, D.P. (1991).

Single base mutation in the hormone binding domain of the thyroid hormone receptor  $\beta$  gene in generalized thyroid hormone resistance demonstrated by single stranded conformation polymorphism analysis.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178** : 606-612.

BORGNA, J.L., and SCALI, J. (1988).

Differential inhibition of estrogen and antiestrogen binding to the estrogen receptor by diethylpyrocarbonate.

*J. Steroid Biochem.* **31** : 427-436.

BOURGUET, W., SABLONNIERE, B., FORMSTECHE, P., CHEN, J.-Y., BERNIER, J.-L., and HENICHART, J.-P. (1992).

Synthesis of a biospecific adsorbent for the purification of the three human retinoic acid receptors by affinity chromatography.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187** : 711-716.

BOYLAN, J.F., LOHNES, D., TANEJA, R., CHAMBON, P., and GUDAS, L.J. (1993).

Loss of retinoic acid receptor  $\gamma$  function in F9 cells by gene disruption results in aberrant *Hoxa-1* expression and differentiation upon retinoic acid treatment.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 9601-9605.

BRAND, N., PETKOVICH, M., KRUST, A., CHAMBON, P., DE THE, H., MARCHIO, A., TIOLLAIS, P., and DEJEAN, A. (1988).

Identification of a second human retinoic acid receptor.

*Nature* **332** : 850-853.

BRESNICK, E.H., SANCHEZ, E.R., HARRISON, R.W., and PRATT, W.B. (1988).

Hydrogen peroxide stabilizes the steroid-binding state of rat liver glucocorticoid receptors by promoting disulfide bond formation.

*Biochemistry* **27** : 2866-2872.

BRINKMANN, A.O., KUIPER, G.G.J.M., DE BOER, W., MULDER, E., BOLT, J., VAN STEENBRUGGE, G.J., and VAN DER MOLEN, H.J. (1986).

Characterization of androgen receptors after photoaffinity labelling with [ $^3$ H]methyltrienolone (R1881).

*J. Steroid Biochem.* **24** : 245-249.

BRINKMANN, A.O., KUIPER, G.G.J.M., BOLT-DE VRIES, J., and MULDER, E. (1988).

*In situ* photolabelling of the human androgen receptor.  
*J. Steroid Biochem.* **30** : 257-261.

BROCKES, J. (1991).

We may not have a morphogen.

*Nature* **350** : 15.

BROWN, T.R., LUBAHN, D.B., WILSON, E.M., FRENCH, F.S., MIGEON, C.J., and CORDEN, J.L. (1990).

Functional characterization of naturally occurring mutant androgen receptors from subjects with complete androgen insensitivity.

*Mol. Endocrinol.* **4** : 1759-1772.

BROWN, M., and SHARP, P.A. (1990).

Human estrogen receptor forms multiple protein-DNA complexes.

*J. Biol. Chem.* **265** : 11238-11243.

BUCK, J., DERGUINI, F., LEVI, E., NAKANISHI, K., and HAMMERLING, U. (1991).

Intracellular signaling by 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol.

*Science* **254** : 1654-1656.

BUGGE, T.H., POHL, J., LONNOY, O., and STUNNENBERG, H.G. (1992).

RXR- $\alpha$ , a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors.

*EMBO J.* **11** : 1409-1418.

BUROLLAUD, T., DANZE, P.-M., TBARKA, N., FORMSTECHE, P., and DAUTREVAUX, M. (1993).

Binding of RU486 and deacetylcortisol to the glucocorticoid receptor is insensitive to sulfhydryl modifying agents.

*J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **44** : 217-225.

BURNSIDE, J., DARLING, D.S., and CHIN, W.W. (1990).

A nuclear factor that enhances binding of thyroid hormone receptors to thyroid hormone response elements.

*J. Biol. Chem.* **265** : 2500-2504.

BYRAVAN, S., MILHON, J., RABINDRAN, S.K., OLINGER, B., GARABEDIAN, M.J., DANIELSEN, M., and STALLCUP, M.R. (1991).

Two point mutations in the hormone-binding domain of the mouse glucocorticoid receptor that dramatically reduce its function.

*Mol. Endocrinol.* **5** : 752-758.

CARLSTEDT-DUKE, J., STROMSTEDT, P.-E., PERSSON, B., CEDERLUND, E., GUSTAFSSON, J.-A., and JORNVALL, H. (1988).

Identification of hormone-interacting amino acid residues within the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor in relation to other steroid hormone receptors.

*J. Biol. Chem.* **263** : 6842-6846.

CARSON-JURICA, M.A., SCHRADER, W.T., and O'MALLEY, B.W. (1990).

Steroid receptor family : structure and functions.

*Endocrine Rev.* **11** : 201-220.

CASANOVA, J., HOROWITZ, Z.D., COPP, R.P., MAC INTYRE, W.R., PASCUAL, A., and SAMUELS, H.H. (1984).

Photoaffinity labeling of thyroid hormone nuclear receptors. Influence of n-butyrate and analysis of the half-lives of the 57,000 and 47,000 molecular weight receptor forms.

*J. Biol. Chem.* **259** : 12084-12091.

CAVEY, M.T., MARTIN, B., CARLAVAN, I., and SHROOT, B. (1990).

*In vitro* binding of retinoids to the nuclear retinoic acid receptor  $\alpha$ .

*Anal. Biochem.* **186** : 19-23.

CHAKRABORTI, P.K., HOECK, W., GRONER, B., and SIMONS, S.S. (1990).

Localization of the vicinal dithiols involved in steroid binding to the rat glucocorticoid receptor.

*Endocrinology* **127** : 2530-2539.

CHAKRABORTI, P.K., GARABEDIAN, M.J., YAMAMOTO, K.R., and SIMONS, S.S. (1991).

Creation of "super" glucocorticoid receptors by point mutations in the steroid binding domain.

*J. Biol. Chem.* **266** : 22075-22078.

CHAKRABORTI, P.K., GARABEDIAN, M.J., YAMAMOTO, K.R., and SIMONS, S.S. (1992).

Role of cysteines 640, 656, and 661 in steroid binding to rat glucocorticoid receptors.

*J. Biol. Chem.* **267** : 11366-11373.

CHANG, C.H., LOBL, T.J., ROWLEY, D.R., and TINDALL, D.J. (1984).

Affinity labeling of the androgen receptor in rat prostate cytosol with 17 $\beta$ -[(bromoacetyl)oxy]-5 $\alpha$ -androstan-3-one.

*Biochemistry* **23** : 2527-2533.

CHANG, C., WANG, C., DE LUCA, H.F., ROSS, T.K., and SHIH, C.C.-Y. (1992).

Characterization of human androgen receptor overexpressed in the baculovirus system.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 5946-5950.

CHATTERJEE, V.K.K., NAGAYA, T., MADISON, L.D., DATTA, S., RENTOUMIS, A., and JAMESON, J.L. (1991).

Thyroid hormone resistance syndrome. Inhibition of normal receptor function by mutant thyroid hormone receptors.

*J. Clin. Invest.* **87** : 1977-1984.

CHEN, D., KOHLI, K., ZHANG, S., DANIELSEN, M., and STALLCUP, M.R. (1994).

Phenylalanine-780 near the C-terminus of the mouse glucocorticoid receptor is important for ligand binding affinity and specificity.

*Mol. Endocrinol.* **8** : 422-430.

CHENG, S.-Y., RANSOM, S.C., MAC PHIE, P., BHAT, M.K., MIXSON, A.J., and WEINTRAUB, B.D. (1994).

Analysis of the binding of 3,3',5-triiodo-L-thyronine and its analogues to mutant human  $\beta$ 1 thyroid hormone receptors : a model of the hormone binding site.

*Biochemistry* **33** : 4319-4326.

CHOMIENNE, C., BALLERINI, P., BALITRAND, P., AMAR, M., BERNARD, J.F., BOIVIN, P., DANIEL, M.T., BERGER, R., CASTAIGNE, S., and DEGOS, L. (1989). Retinoic acid therapy for promyelocytic leukaemia. *Lancet* **5** : 746-747.

COTY, W.A. (1980). Reversible dissociation of steroid hormone-receptor complexes by mercurial reagents. *J. Biol. Chem.* **255** : 8035-8037.

COWAN, S.W., NEWCOMER, M.E., and JONES, T.A. (1993). Crystallographic studies on a family of cellular lipophilic transport proteins : the refinement of P2 myelin protein and the structure determination and refinement of cellular retinol-binding protein in complex with all-trans retinol. *J. Mol. Biol.* **230** : 1225-1246.

CRETIAZ, M., BARON, A., SIEGENTHALER, G., and HUNZIKER, W. (1990). Ligand specificities of recombinant retinoic acid receptors RAR $\alpha$  and RAR $\beta$ . *Biochem. J.* **272** : 391-397.

CULIG, Z., HOBISCH, A., CRONAUER, M.V., CATO, A.C.B., HITTMAIR, A., RADMAYR, C., EBERLE, J., BARTSCH, G., and KLOCKER, H. (1993). Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol. Endocrinol.* **7** : 1541-1550.

DALMAN, F.C., STURZENBECKER, L.J., LEVIN, A.A., LUCAS, D.A., PERDEW, G.H., PETKOVICH, M., CHAMBON, P., GRIPPO, J.F., and PRATT, W.B. (1991). Retinoic acid receptor belongs to a subclass of nuclear receptors that do not form "docking" complexes with hsp90. *Biochemistry* **30** : 5605-5608.

DAMM, K., THOMPSON, C.C., and EVANS, R.M. (1989). Protein encoded by *v-erbA* functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature* **339** : 593-597.

DAMM, K., HEYMAN, R.A., UMESONO, K., and EVANS, R.M. (1993). Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 2989-2993.

DANIELIAN, P.S., WHITE, R., LEES, J.A., and PARKER, M.G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* **11** : 1025-1033.

DANIELSEN, M., NORTHROP, J.P., and RINGOLD, G.M. (1986). The mouse glucocorticoid receptor : mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins. *EMBO J.* **5** : 2513-2522.

DANIELSEN, M., HINCK, L., and RINGOLD, G.M. (1989). Mutational analysis of the mouse glucocorticoid receptor. *Cancer Res.* **49** : 2286s-2291s.

DANIELSEN, M. (1991).

Structure and function of the glucocorticoid receptor.

*Nuclear hormone receptors*. Ed Parker, M.G. Academic Press (New York) : 39-68.

DARMON, M., ROCHER, M., CAVEY, M.-T., MARTIN, B., RABILLOUD, T., DELESCLUSE, C., and SHROOT, B. (1988).

Biological activity of retinoids correlates with affinity for nuclear receptors but not for cytosolic binding protein.

*Skin Pharmacol.* **1** : 161-175.

DAWSON, M., CHAN, R.L.-S., DERDZINSKI, K., HOBBS, P.D., CHAO, W.-R., and SCHIFF, L.J. (1983).

Synthesis and pharmacological activity of 6-[(E)-2-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)ethen-1-yl]- and 6-(1,2,3,4-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethyl-6-naphthyl)-2-naphthalenecarboxylic acids.

*J. Med. Chem.* **26** : 1653-1656.

DAWSON, M.I., HOBBS, P.D., DERDZINSKI, K.A., CHAO, W.-R., FRENKING, G., LOEW, G.H., JETTEN, A.M., NAPOLI, J.L., WILLIAMS, J.B., SANI, B.P., WILLE, J.J., and SCHIFF, L.J. (1989).

Effect of structural modifications in the C7-C11 region of the retinoid skeleton on biological activity in a series of aromatic retinoids.

*J. Med. Chem.* **32** : 1504-1517.

DELESCLUSE, C., CAVEY, M.T., MARTIN, B., BERNARD, B.A., REICHERT, U., MAIGNAN, J., DARMON, M., and SHROOT, B. (1991).

Selective high affinity retinoic acid receptor  $\alpha$  or  $\beta$ - $\gamma$  ligands.

*Mol. Pharmacol.* **40** : 556-562.

DE LUCA, L.M. (1991).

Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia.

*FASEB J.* **5** : 2924-2933.

DE THE, H., VIVANCO-RUIZ, M.D.M., TIOLLAIS, P., STUNNENBERG, H., and DEJEAN, A. (1990).

Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor  $\beta$  gene.

*Nature* **343** : 177-180.

DI SORBO, D.M., PHELPS, D.S., and LITWACK, G. (1980).

Chemical probes of amino acid residues affect the active sites of the glucocorticoid receptor.

*Endocrinology* **106** : 922-929.

DOBSON, A.D.W., CONNEELY, O.M., BEATTIE, W., MAXWELL, B.L., MAK, P., TSAI, M.-J., SCHRADER, W.T., and O'MALLEY, B.W. (1989).

Mutational analysis of the chicken progesterone receptor.

*J. Biol. Chem.* **264** : 4207-4211.

DOLLE, P., RUBERTE, E., KASTNER, P., PETKOVICH, M., STONER, C.M., GUDAS, L.J., and CHAMBON, P. (1989).

Differential expression of genes encoding  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse.

*Nature* **342** : 702-705.

DOLLE, P., RUBERTE, E., LEROY, P., MORRIS-KAY, G., and CHAMBON, P. (1990).

Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis.

*Development* **110** : 1133-1151.

EISEN, H.J., SCHLEENBAKER, R.E., and SIMONS, S.S. (1981).

Affinity labeling of the rat liver glucocorticoid receptor with dexamethasone 21-mesylate. Identification of covalently labeled receptor by immunochemical methods.

*J. Biol. Chem.* **256** : 12920-12925.

EL-ASHRY, D., ONATE, S.A., NORDEEN, S.K., and EDWARDS, D.P. (1989).

Human progesterone receptor complexed with the antagonist RU 486 binds to hormone response elements in a structurally altered form.

*Mol. Endocrinol.* **3** : 1545-1558.

ELLINGER-ZIEGELBAUER, H., and DREYER, C. (1991).

A retinoic acid receptor expressed in the early development of *Xenopus laevis*.

*Genes & Dev.* **5** : 94-104.

ELLISTON, J.F., BEEKMAN, J.M., TSAI, S.Y., O'MALLEY, B.W., and TSAI, M.-J. (1992).

Hormone activation of baculovirus expressed progesterone receptors.

*J. Biol. Chem.* **267** : 5193-5198.

EUL, J., MEYER, M.E., TORA, L., BOCQUEL, M.T., QUIRIN-STRICKER, C., CHAMBON, P., and GRONEMEYER, H. (1989).

Expression of active hormone and DNA-binding domains of the chicken progesterone receptor in *E. coli*.

*EMBO J.* **8** : 83-90.

EVANS, R.M. (1988).

The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.

*Science* **240** : 889-895.

EYROLLES, L., KAWACHI, E., MATSUSHIMA, Y., NAKAJIMA, O., KAGECHIKA, H., HASHIMOTO, Y., and SHUDO, K. (1992).

Retinoid antagonists : molecular design based on the ligand superfamily concept.

*Med. Chem. Res.* **2** : 361-367.

EYROLLES, L., KAGECHIKA, H., KAWACHI, E., FUKASAWA, H., IJIMA, T., MATSUSHIMA, Y., HASHIMOTO, Y., and SHUDO, K. (1994).

Retinobenzoic acids. 6. Retinoid antagonists with a heterocyclic ring.

*J. Med. Chem.* **37** : 1508-1517.



- FAWELL, S.E., LEES, J.A., WHITE, R., and PARKER, M.G. (1990).  
Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor.  
*Cell* **60** : 953-962.
- FLEISCHHAUER, K., PARK, J.H., DI SANTO, J.P., MARKS, M., OZATO, K., and YANG, S.Y. (1992).  
Isolation of a full-length cDNA clone encoding a N-terminally variant form of the human retinoid X receptor  $\beta$ .  
*Nucl. Acids Res.* **20** : 1801.
- FOLKERS, G.E., VAN DER LEEDE, B.-J.M., and VAN DER SAAG, P.T. (1993).  
The retinoic acid receptor- $\beta$ 2 contains two separate cell-specific transactivation domains, at the N-terminus and in the ligand-binding domain.  
*Mol. Endocrinol.* **7** : 616-627.
- FORMAN, B.M., and SAMUELS, H.H. (1990).  
Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors : the regulatory zipper model.  
*Mol. Endocrinol.* **4** : 1293-1301.
- FORMSTECHEP, P., DUMUR, V., IDZIOREK, T., DANZE, P.-M., SABLONNIERE, B., and DAUTREVAUX, M. (1984).  
Inactivation of unbound rat liver glucocorticoid receptor by N-alkylmaleimides at sub-zero temperatures.  
*Biochim. Biophys. Acta* **802** : 306-313.
- FRITSCH, M., LEARY, C.M., FURLLOW, J.D., AHRENS, H., SCHUH, T.J., MUELLER, G.C., and GORSKI, J. (1992).  
A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain.  
*Biochemistry* **31** : 5303-5311.
- FUKASAWA, H., IJIMA, T., KAGECHIKA, H., HASHIMOTO, Y., and SHUDO, K. (1993).  
Expression of the ligand-binding domain-containing region of retinoic acid receptors  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  in *Escherichia coli* and evaluation of ligand-binding selectivity.  
*Biol. Pharm. Bull.* **16** : 343-348.
- FUQUA, S.A.W., FITZGERALD, S.D., CHAMNESS, G.C., TANDON, A.K., MAC DONNELL, D.P., NAWAZ, Z., O'MALLEY, B.W., and MAC GUIRE, W.L. (1991).  
Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity.  
*Cancer Res.* **51** : 105-109.
- GACHON, A.-M.F. (1994).  
Lipocalines et transport de ligands hydrophobes.  
*Méd. Sci.* **10** : 22-29.
- GIGUERE, V., HOLLENBERG, S.M., ROSENFELD, M.G., and EVANS, R.M. (1986).  
Functional domains of the human glucocorticoid receptor.  
*Cell* **46** : 645-652.

GIGUERE, V., ONG, E.S., SEGUI, P., and EVANS, R.M. (1987).  
Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid.  
*Nature* **330** : 624-629.

GIGUERE, V., ONG, E.S., EVANS, R.M., and TABIN, C.J. (1989).  
Spatial and temporal expression of the retinoic acid receptor in the regenerating amphibian limb.  
*Nature* **337** : 566-570.

GIGUERE, V., SHAGO, M., ZIRNGIBL, R., TATE, P., ROSSANT, J., and VARMUZA, S. (1990).  
Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor  $\gamma$  expressed in the mouse embryo.  
*Mol. Cell. Biol.* **10** : 2335-2340.

GODOWSKI, P.J., RUSCONI, S., MIESFIELD, R., and YAMAMOTO, K.R. (1987).  
Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement.  
*Nature* **325** : 365-368.

GOLDSTEIN, R.A., KATZENELLENBOGEN, J.A., LUTHEY-SCHULTEN, Z.A., SEIELSTAD, D.A., and WOLYNES, P.G. (1993).  
Three-dimensional model for the hormone binding domains of steroid receptors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 9949-9953.

GOVINDAN, M.V. (1990).  
Specific region in hormone binding domain is essential for hormone binding and trans-activation by human androgen receptor.  
*Mol. Endocrinol.* **4** : 417-427.

GRAHAM, M.L., KRETT, N.L., MILLER, L.A., LESLIE, K.K., GORDON, D.F., WOOD, W.M., WEI, L.L., and HORWITZ, K.B. (1990).  
T47D<sub>CO</sub> cells, genetically unstable and containing estrogen receptor mutations, are a model for the progression of breast cancers to hormone resistance.  
*Cancer Res.* **50** : 6208-6217.

GRAUPNER, G., MALLE, G., MAIGNAN, J., LANG, G., PRUNIERAS, M., and PFAHL, M. (1991).  
6'-substituted naphthalene-2-carboxylic acid analogs, a new class of retinoic acid receptor subtype-specific ligands.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179** : 1554-1561.

GREEN, S., and CHAMBON, P. (1988).  
Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation.  
*Trends Genet.* **4** : 309-314.

GROENHOUT, E.G., and DORIN, R.I. (1994).  
Generalized thyroid hormone resistance due to a deletion of the carboxy terminus of the c-erbA $\beta$  receptor.  
*Mol. Cell. Endocrinol.* **99** : 81-88.

GRONEMEYER, H., and GOVINDAN, M.V. (1986).  
Affinity labelling of steroid hormone receptors.  
*Mol. Cell. Endocrinol.* **46** : 1-19.

GRONEMEYER, H. (1988).  
Photoaffinity labeling of the chicken progesterone receptor.  
in "Affinity labelling and cloning of steroid and thyroid hormone receptors". Ed.  
Gronemeyer, H. Ellis Horwood (Chichester, England) : 167-185.

HAMADA, K., GLEASON, S.L., LEVI, B.-Z., HIRSCHFELD, S., APPELLA, E., and  
OZATO, K. (1989).  
H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both  
the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen  
response element.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 8289-8293.

HARLOW, K.W., SMITH, D.N., KATZENELLENBOGEN, J.A., GREENE, G.L., and  
KATZENELLENBOGEN, B.S. (1989).  
Identification of cysteine 530 as the covalent attachment site of an affinity-labeling  
estrogen (ketononestrol aziridine) and antiestrogen (tamoxifen aziridine) in the  
human estrogen receptor.  
*J. Biol. Chem.* **264** : 17476-17485.

HARMON, J.M., SMITH, A.C., and ELSASSER, M.S. (1989).  
Use of high-resolution two-dimensional gel electrophoresis and affinity labeling to  
probe glucocorticoid receptor structure and function.  
*Cancer Res.* **49** : 2238s-2243s.

HARRISON, R.W., WOODWARD, C., and THOMPSON, E. (1983).  
Titratable effects of p-chloromercuriphenyl sulfonate, a thiol-attacking reagent, on  
glucocorticoid receptor binding.  
*Biochim. Biophys. Acta* **759** : 1-6.

HASHIMOTO, Y., PETKOVICH, M., GAUB, M.P., KAGECHIKA, H., SHUDO, K., and  
CHAMBON, P. (1989).  
The retinoic acid receptors  $\alpha$  and  $\beta$  are expressed in the human promyelocytic  
leukemia cell line HL-60.  
*Mol. Endocrinol.* **3** : 1046-1052.

HASHIMOTO, Y., KAGECHIKA, H., and SHUDO, K. (1990).  
Expression of retinoic acid receptor genes and the ligand-binding selectivity of  
retinoic acid receptors.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166** : 1300-1307.

HEYMAN, R.A., MANGELSDORF, D.J., DYCK, J.A., STEIN, R.B., EICHELE, G.,  
EVANS, R.M., and THALLER, C. (1992).  
9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor.  
*Cell* **68** : 397-406.

HIRST, M.A., NORTHROP, J.P., DANIELSEN, M., and RINGOLD, G.M. (1990).  
High level expression of wild type and variant mouse glucocorticoid receptors in  
chinese hamster ovary cells.  
*Mol. Endocrinol.* **4** : 162-170.

- HOLMES, S.D., VAN, N.T., STEVENS, S., and SMITH, R.G. (1981).  
Affinity labelling of the human uterine progesterone receptor with 21-, 16 $\alpha$ - and 11 $\alpha$ -bromoacetoxyprogesterones.  
*Endocrinology* **109** : 670-672.
- HOLMES, S.D., and SMITH, R.G. (1983).  
Identification of histidine and methionine residues in the active site of the human uterine progesterone receptor with the affinity labels 11 $\alpha$ - and 16 $\alpha$ -(bromoacetoxy)progesterone.  
*Biochemistry* **22** : 1729-1734.
- HOROWITZ, Z.D., and SAMUELS, H.H. (1988).  
Thyroid receptor.  
in "Affinity labelling and cloning of steroid and thyroid hormone receptors". Ed. Gronemeyer, H. Ellis Horwood (Chichester, England) : 79-83.
- HOROWITZ, Z.D., SAHNOUN, H., PASCUAL, A., CASANOVA, J., and SAMUELS, H.H. (1988).  
Analysis of photoaffinity label derivatives to probe thyroid hormone receptor in human fibroblasts, GH<sub>1</sub> cells, and soluble receptor preparations.  
*J. Biol. Chem.* **263** : 6636-6642.
- HOROWITZ, Z.D., YANG, C.-R., FORMAN, B.M., CASANOVA, J., and SAMUELS, H.H. (1989).  
Characterization of the domain structure of chick c-erbA by deletion mutation : *in vitro* translation and cell transfection studies.  
*Mol. Endocrinol.* **3** : 148-156.
- HURLEY, D.M., ACCILI, D., STRATAKIS, C.A., KARL, M., VAMVAKOPOULOS, N., RORER, E., CONSTANTINE, K., TAYLOR, S.I., and CHROUSOS, G.P. (1991).  
Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance.  
*J. Clin. Invest.* **87** : 680-686.
- INCE, B.A., ZHUANG, Y., WRENN, C.K., SHAPIRO, D.J., and KATZENELLENBOGEN, B.S. (1993).  
Powerful dominant negative mutants of the human estrogen receptor.  
*J. Biol. Chem.* **268** : 14026-14032.
- ISHIKAWA, T., UMESONO, K., MANGELSDORF, D.J., ABURATANI, H., STANGER, B.Z., SHIBASAKI, Y., IMAWARI, M., EVANS, R.M., and TAKAKU, F. (1990).  
A functional retinoic acid receptor encoded by the gene on human chromosome 12.  
*Mol. Endocrinol.* **4** : 837-844.
- JENSEN, E.V., HURST, D.J., DE SOMBRE, E.R., and JUNGBLUT, P.W. (1967).  
Sulfhydryl groups and estradiol-receptor interaction.  
*Science* **158** : 385-387.
- JETTEN, A.M., ANDERSON, K., DEAS, M.A., KAGECHIKA, H., LOTAN, R., REARICK, J.I., and SHUDO, K. (1987).  
New benzoic acid derivatives with retinoid activity : lack of direct correlation between biological activity and binding to cellular retinoic acid binding protein.  
*Cancer Res.* **47** : 3523-3527.

JIANG, S.-Y., LANGAN-FAHEY, S.M., STELLA, A.L., MAC CAGUE, R., and JORDAN, V.C. (1992).

Point mutation of estrogen receptor (ER) in the ligand-binding domain changes the pharmacology of antiestrogens in ER-negative breast cancer cells stably expressing complementary DNAs for ER.

*Mol. Endocrinol.* **6** : 2167-2174.

JONG, L., LEHMANN, J.M., HOBBS, P.D., HARLEV, E., HUFFMAN, J.C., PFAHL, M., and DAWSON, M.I. (1993).

Conformational effects on retinoid receptor selectivity. 1. Effect of 9-double bond geometry on retinoid X receptor activity.

*J. Med. Chem.* **36** : 2605-2613.

KAGECHIKA, H., KAWACHI, E., HASHIMOTO, Y., HIMI, T., and SHUDO, K. (1988). Retinobenzoic acids. 1. Structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity.

*J. Med. Chem.* **31** : 2182-2192.

KAGECHIKA, H., KAWACHI, E., HASHIMOTO, Y., and SHUDO, K. (1989a).

Retinobenzoic acids. 2. Structure-activity relationships of chalcone-4-carboxylic acids and flavone-4'-carboxylic acids.

*J. Med. Chem.* **32** : 834-840.

KAGECHIKA, H., HIMI, T., NAMIKAWA, K., KAWACHI, E., HASHIMOTO, Y., and SHUDO, K. (1989b).

Retinobenzoic acids. 3. Structure-activity relationships of retinoidal azobenzene-4-carboxylic acids and stilbene-4-carboxylic acids.

*J. Med. Chem.* **32** : 1098-1108.

KAGECHIKA, H., HIMI, T., KAWACHI, E., and SHUDO, K. (1989c).

Retinobenzoic acids. 4. Conformation of aromatic amides with retinoidal activity. Importance of trans-amide structure for the activity.

*J. Med. Chem.* **32** : 2292-2296.

KALIMI, M., and BANERJI, A. (1981).

Role of sulfhydryl modifying reagents in the binding and activation of chick oviduct progesterone-receptor complex.

*J. Steroid Biochem.* **14** : 593-597.

KAMEI, Y., KAWADA, T., KAZUKI, R., and SUGIMOTO, E. (1993).

Retinoic acid receptor  $\gamma 2$  gene expression is up-regulated by retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes.

*Biochem. J.* **293** : 807-812.

KASTNER, P., KRUST, A., MENDELSON, C., GARNIER, J.M., ZELEN, A., LEROY, P., STAUB, A., and CHAMBON, P. (1990).

Murine isoforms of retinoic acid receptor  $\gamma$  with specific patterns of expression.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 2700-2704.

KATZENELLENBOGEN, J.A., CARLSON, K.E., HEIMAN, D.F., ROBERTSON, D.W., WEI, L.L., and KATZENELLENBOGEN, B.S. (1983).

Efficient and highly selective covalent labeling of the estrogen receptor with [<sup>3</sup>H]tamoxifen aziridine.

*J. Biol. Chem.* **258** : 3487-3495.

KATZENELLENBOGEN, B.S., ELLISTON, J.F., MONSMA, F.J., SPRINGER, P.A., and ZIEGLER, Y.S. (1987).

Structural analysis of covalently labeled estrogen receptors by limited proteolysis and monoclonal antibody reactivity.

*Biochemistry* **26** : 2364-2373.

KATZENELLENBOGEN, B.S., and KATZENELLENBOGEN, J.A. (1988).

Affinity labeling of estrogen receptors.

in "Affinity labelling and cloning of steroid and thyroid hormone receptors". Ed. Gronemeyer, H. Ellis Horwood (Chichester, England) : 87-108.

KAZEMI-ESFARJANI, P., BEITEL, L.K., TRIFIRO, M., KAUFMAN, M., RENNIE, P., SHEPPARD, P., MATUSIK, R., and PINSKY, L. (1993).

Substitution of valine-865 by methionine or leucine in the human androgen receptor causes complete or partial androgen insensitivity, respectively with distinct androgen receptor phenotypes.

*Mol. Endocrinol.* **7** : 37-46.

KEIDEL, S., RUPP, E., and SZARDENINGS, M. (1992).

Recombinant human retinoic acid receptor  $\alpha$ . Binding of DNA and synthetic retinoids to the protein expressed in *Escherichia coli*.

*Eur. J. Biochem.* **204** : 1141-1148.

KEIDEL, S., LEMOTTE, P., and APFEL, C. (1994).

Different agonist- and antagonist-induced conformational changes in retinoic acid receptors analyzed by protease mapping.

*Mol. Cell. Biol.* **14** : 287-298.

KEIGHTLEY, M.-C., and FULLER, P.J. (1994).

Unique sequences in the Guinea pig glucocorticoid receptor induce constitutive transactivation and decrease steroid sensitivity.

*Mol. Endocrinol.* **8** : 431-439.

KLIEWER, S.A., UMESONO, K., HEYMAN, R.A., MANGELSDORF, D.J., DYCK, J.A., and EVANS, R.M. (1992a).

Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 1448-1452.

KLIEWER, S.A., UMESONO, K., MANGELSDORF, D.J., and EVANS, R.M. (1992b).

Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D<sub>3</sub> signalling.

*Nature* **355** : 446-449.

KLIEWER, S.A., UMESONO, K., NOONAN, D.J., HEYMAN, R.A., and EVANS, R.M. (1992c).

Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors.

*Nature* **358** : 771-774.

KNEGTEL, R.M.A., KATAHIRA, M., SCHILTHUIS, J.G., BONVIN, A.M.J.J., BOELENS, R., EIB, D., VAN DER SAAG, P.T., and KAPTEIN, R. (1993).

The solution structure of the human retinoic acid receptor- $\beta$  DNA-binding domain.

*J. Biomol. NMR* **3** : 1-17.

KOIKE, S., NII, A., SAKAI, M., and MURAMATSU, M. (1987).

The steroid binding domain of porcine estrogen receptor.

*Biochemistry* **26** : 2563-2568.

KRAFT, J.C., SCHUH, T., JUCHAU, M., and KIMELMAN, D. (1994).

The retinoid X receptor ligand, 9-cis-retinoic acid, is a potential regulator of early *Xenopus* development.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 3067-3071.

KRUST, A., GREEN, S., ARGOS, P., KUMAR, V., WALTER, P., BORNERT, J.M., and CHAMBON, P. (1986).

The chicken estrogen receptor sequence : homology with v-erbA and the human estrogen and glucocorticoid receptors.

*EMBO J.* **5** : 891-897.

KRUST, A., KASTNER, P., PETKOVICH, M., ZELENT, A., and CHAMBON, P. (1989).

A third human retinoic acid receptor, hRAR- $\gamma$ .

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 5310-5314.

KRUYT, F.A.E., VAN DER VEER, L.J., MADER, S., VAN DEN BRINK, C.E., FEIJEN, A., JONK, L.J.C., KRUIJER, W., and VAN DER SAAG, P.T. (1992).

Retinoic acid resistance of the variant embryonal carcinoma cell line RAC65 is caused by expression of a truncated RAR $\alpha$ .

*Differentiation* **49** : 27-37.

KUMAR, V., GREEN, S., STAUB, A., and CHAMBON, P. (1986).

Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor.

*EMBO J.* **5** : 2231-2236.

KUMAR, V., GREEN, S., STACK, G., BERRY, M. JIN, J.-R., and CHAMBON, P. (1987).

Functional domains of the human estrogen receptor.

*Cell* **51** : 941-951.

KUROKAWA, R., YU, V.C., NAAR, A., KYAKUMOTO, S., HAN, Z., SILVERMAN, S., ROSENFELD, M.G., and GLASS, C.K. (1993).

Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers.

*Genes & Dev.* **7** : 1423-1435.

- KUSHNER, P.J., HORT, E., SHINE, J., BAXTER, J.D., and GREENE, G.L. (1990).  
Construction of cell lines that express high levels of the human estrogen receptor and are killed by estrogens.  
*Mol. Endocrinol.* **4** : 1465-1473.
- LAMONTAGNE, N., MERCIER, L., PONS, M., THOMPSON, E.B., and SIMONS, S.S. (1984).  
Glucocorticoid vs antiglucocorticoid activity : can a single functional group modification of glucocorticoid steroids always convey antiglucocorticoid activity?  
*Endocrinology* **114** : 2252-2263.
- LEE, M.S., KLIEWER, S.A., PROVENCAL, J., WRIGHT, P.E., and EVANS, R.M. (1993).  
Structure of the retinoid X receptor  $\alpha$  DNA binding domain : a helix required for homodimeric DNA binding.  
*Science* **260** : 1117-1121.
- LEHMANN, J.M., DAWSON, M.I., HOBBS, P.D., HUSMANN, M., and PFAHL, M. (1991).  
Identification of retinoids with nuclear receptor subtype-selective activities.  
*Cancer Res.* **51** : 4804-4809.
- LEHMANN, J.M., JONG, L., FANJUL, A., CAMERON, J.F., LU, X.P., HAEFNER, P., DAWSON, M.I., and PFAHL, M. (1992a).  
Retinoids selective for retinoid X receptor response pathways.  
*Science* **258** : 1944-1946.
- LEHMANN, J.M., ZHANG, X.-K., and PFAHL, M. (1992b).  
RAR $\gamma$ 2 expression is regulated through a retinoic acid response element embedded in Sp1 sites.  
*Mol. Cell. Biol.* **12** : 2976-2985.
- LEID, M., KASTNER, P., and CHAMBON, P. (1992a).  
Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways.  
*Trends Biochem. Sci.* **17** : 427-433.
- LEID, M., KASTNER, P., LYONS, R., NAKSHATRI, H., SAUNDERS, M., ZACHAREWSKI, T., CHEN, J.-Y., STAUB, A., GARNIER, J.-M., MADER, S., and CHAMBON, P. (1992b).  
Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently.  
*Cell* **68** : 377-395.
- LEMESLE-VARLOOT, L., OJASOO, T., MORNON, J.P., and RAYNAUD, J.P. (1992).  
A model for the determination of the 3D-spatial distribution of the functions of the hormone-binding domain of receptors that bind 3-keto-4-ene steroids.  
*J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **41** : 369-388.
- LENG, X., TSAI, S.Y., O'MALLEY, B.W., and TSAI, M.-J. (1993).  
Ligand-dependent conformational changes in thyroid hormone and retinoic acid receptors are potentially enhanced by heterodimerization with retinoic X receptor.  
*J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **46** : 643-661.



LEROY, P., KRUST, A., ZELENT, A., MENDELSON, C., GARNIER, J.-M., KASTNER, P., DIERICH, A., and CHAMBON, P. (1991a).

Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor  $\alpha$  are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid.

*EMBO J.* **10** : 59-69.

LEROY, P., NAKSHATRI, H., and CHAMBON, P. (1991b).

Mouse retinoic acid receptor  $\alpha 2$  isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 10138-10142.

LEVIN, A.A., STURZENBECKER, L.J., KAZMER, S., BOSAKOWSKI, T., HUSELTON, C., ALLENBY, G., SPECK, J., KRATZEISEN, C., ROSENBERGER, M., LOVEY, A., and GRIPPO, J.F. (1992).

9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR $\alpha$ .

*Nature* **355** : 359-361.

LI, E., SUCOV, H.M., LEE, K.-F., EVANS, R.M., and JAENISCH, R. (1993).

Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the  $\alpha 1$  retinoic acid receptor gene.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 1590-1594.

LI, Z., PRAHL, J.M., HELLWIG, W., and DE LUCA, H.F. (1994a).

Immunoaffinity purification of active rat recombinant 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor.

*Arch. Biochem. Biophys.* **310** : 347-351.

LI, Y.-P., SAID, F., and GALLAGHER, R.E. (1994b).

Retinoic acid-resistant HL-60 cells exclusively contain mutant retinoic acid receptor- $\alpha$ .

*Blood* **83** : 3298-3302.

LIAO, J., OZONO, K., SONE, T., MAC DONNELL, D.P., and PIKE, J.W. (1990).

Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires a nuclear protein and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 9751-9755.

LIBBY, P.R., and BERTRAM, J.S. (1982).

Lack of intracellular retinoid-binding proteins in a retinol-sensitive cell line.

*Carcinogenesis* **3** : 401-484.

LIN, K.-H., FUKUDA, T., and CHENG, S.-Y. (1990).

Hormone and DNA binding activity of a purified human thyroid hormone nuclear receptor expressed in *Escherichia coli*.

*J. Biol. Chem.* **265** : 5161-5165.

LIN, K.-H., PARKISON, C., MAC PHIE, P., and CHENG, S.-Y. (1991).

An essential role of domain D in the hormone-binding activity of human  $\beta 1$  thyroid hormone nuclear receptor.

*Mol. Endocrinol.* **5** : 485-492.

- LOELIGER, P., BOLLAG, W., and MAYER, H. (1980).  
Arotinoids, a new class of highly active retinoids.  
*Eur. J. Med. Chem.* **15** : 9-15.
- LOHNES, D., KASTNER, P., DIERICH, A., MARK, M., LEMEUR, M., and CHAMBON, P. (1993).  
Function of retinoic acid receptor  $\gamma$  in the mouse.  
*Cell* **73** : 643-658.
- LOMBARDO, A., COSTA, E., CHAO, W-R., TOLL, L., HOBBS, P.D., JONG, L., LEE, M.-O., PFAHL, M., ELY, K.R., and DAWSON, M.I. (1994).  
Recombinant human retinoic acid receptor  $\beta$ . Binding of synthetic retinoids and transcriptional activation.  
*J. Biol. Chem.* **269** : 7297-7303.
- LOPEZ, S., MIYASHITA, Y., and SIMONS, S.S. (1990).  
Structurally based, selective interaction of arsenite with steroid receptors.  
*J. Biol. Chem.* **265** : 16039-16042.
- LUBAHN, D.B., BROWN, T.R., SIMENTAL, J.A., HIGGS, H.N., MIGEON, C.J., WILSON, E.M., and FRENCH, F.S. (1989).  
Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 9534-9538.
- LUCAS, P.C., FORMAN, B.M., SAMUELS, H.H., and GRANNER, D.K. (1991).  
Specificity of a retinoic acid response element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter : consequences of both retinoic acid and thyroid hormone receptor binding.  
*Mol. Cell. Biol.* **11** : 5164-5170.
- LUFKIN, T., LOHNES, D., MARK, M., DIERICH, A., GORRY, P., GAUB, M.-P., LEMEUR, M., and CHAMBON, P. (1993).  
High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor  $\alpha$  mutant mice.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 7225-7229.
- LUISI, B.F., XU, W.X., OTWINOWSKI, Z., FREEDMAN, L.P., YAMAMOTO, K.R., and SIGLER, P.B. (1991).  
Cristallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA.  
*Nature* **352** : 497-505.
- MAC DONALD, P.N., HAUSSLER, C.A., TERPENING, C.M., GALLIGAN, M.A., REEDER, M.C., WHITFIELD, G.K., and HAUSSLER, M.R. (1991).  
Baculovirus-mediated expression of the human vitamin D receptor. Functional characterization, vitamin D response element interactions, and evidence for a receptor auxiliary factor.  
*J. Biol. Chem.* **266** : 18808-18813.

MAC DONNELL, D.P., PIKE, J.W., DRUTZ, D.J., BUTT, T.R., and O'MALLEY, B.W. (1989).

Reconstitution of the vitamin D-responsive osteocalcin transcription unit in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Mol. Cell. Biol.* **9** : 3517-3523.

MAC DONNELL, D.P., NAWAZ, Z., DENSMORE, C., WEIGEL, N.L., PHAM, T.A., CLARK, J.H., and O'MALLEY, B.W. (1991).

High level expression of biologically active estrogen receptor in *Saccharomyces cerevisiae*.

*J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **39** : 291-297.

MAC GRATH, M.E., WAGNER, R.L., APRILETTI, J.W., WEST, B.L., RAMALINGAM, V., BAXTER, J.D., and FLETTERICK, R.J. (1994).

Preliminary crystallographic studies of the ligand-binding domain of the thyroid hormone receptor complexed with triiodothyronine.

*J. Mol. Biol.* **237** : 236-239.

MAC GREGOR, T.M., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A., and GIGUERE, V. (1992).

The murine gene for cellular retinoic acid-binding protein type II. Genomic organization, chromosomal localization, and post-transcriptional regulation by retinoic acid.

*J. Biol. Chem.* **267** : 7777-7783.

MAC PHAUL, M.J., MARCELLI, M., ZOPPI, S., WILSON, C.M., GRIFFIN, J.E., and WILSON, J.D. (1992).

Mutations in the ligand-binding domain of the androgen receptor gene cluster in two regions of the gene.

*J. Clin. Invest.* **90** : 2097-2101.

MAC PHIE, P., PARKISON, C., LEE, B.K., and CHENG, S.-Y. (1993).

Structure of the hormone binding domain of human  $\beta 1$  thyroid hormone nuclear receptor : is it an  $\alpha/\beta$  barrel?

*Biochemistry* **32** : 7460-7465.

MADER, S., CHEN, J.-Y., CHEN, Z., WHITE, J., CHAMBON, P., and GRONEMEYER, H. (1993).

The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains.

*EMBO J.* **12** : 5029-5041.

MAK, P., MAC DONNELL, D.P., WEIGEL, N.L., SCHRADER, W.T., and O'MALLEY, B.W. (1989).

Expression of functional chicken oviduct progesterone receptors in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

*J. Biol. Chem.* **264** : 21613-21618.

MALLOY, P.J., HOCHBERG, Z., TIOSANO, D., PIKE, J.W., HUGHES, M.R., and FELDMAN, D. (1990).

The molecular basis of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> resistant rickets in seven related families.

*J. Clin. Invest.* **86** : 2071-2079.

MANGELSDORF, D.J., ONG, E.S., DYCK, J.A., and EVANS, R.M. (1990).  
Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway.  
*Nature* **345** : 224-229.

MANGELSDORF, D.J., UMESONO, K., KLIEWER, S.A., BORGMAYER, U., ONG, E.S., and EVANS, R.M. (1991).  
A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR.  
*Cell* **66** : 555-561.

MANGELSDORF, D.J., BORGMAYER, U., HEYMAN, R.A., ZHOU, J.Y., ONG, E.S., ORO, A.E., KAKIZUKA, A., and EVANS, R.M. (1992).  
Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid.  
*Genes & Dev.* **6** : 329-344.

MANGELSDORF, D.J., UMESONO, K., and EVANS, R.M. (1994).  
The retinoid receptors.  
in "The retinoids". Eds Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S. Raven Press : 319-349.

MARCELLI, M., TILLEY, W.D., ZOPPI, S., GRIFFIN, J.E., WILSON, J.D., and MAC PHAUL, M.J. (1991).  
Androgen resistance associated with a mutation of the androgen receptor at amino acid 772 (Arg-Cys) results from a combination of decreased messenger ribonucleic acid levels and impairment of receptor function.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73** : 318-325.

MARKS, M.S., HALLENBECK, P.L., NAGATA, T., SEGARS, J.H., APPELLA, E., NIKODEM, V.M., and OZATO, K. (1992).  
H-2RIIBP (RXR $\beta$ ) heterodimerization provides a mechanism for combinatorial diversity in the regulation of retinoic acid and thyroid hormone responsive genes.  
*EMBO J.* **11** : 1419-1435.

MARTIN, B., BERNARDON, J.-M., CAVEY, M.-T., BERNARD, B., CARLAVAN, I., CHARPENTIER, B., PILGRIM, W.R., SHROOT, B., and REICHERT, U. (1992).  
Selective synthetic ligands for human nuclear retinoic acid receptors.  
*Skin Pharmacol.* **5** : 57-65.

METZGER, D., WHITE, J.H., and CHAMBON, P. (1988).  
The human oestrogen receptor functions in yeast.  
*Nature* **334** : 31-36.

MILLER, N.R., and SIMONS, S.S. (1988).  
Steroid binding to hepatoma tissue culture cell glucocorticoid receptors involves at least two sulfhydryl groups.  
*J. Biol. Chem.* **263** : 15217-15225.

MIZUTANI, T., BHAKTA, A., KLOOSTERBOER, H.J., and MOODGIL, V.K. (1992).  
Novel antiprogesterins Org 31806 and Org 31710 : interaction with mammalian progesterone and DNA binding of antisteroid receptor complexes.  
*J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **42** : 695-704.

- MORNON, J.P., BISSERY, V., GABORIAUD, C., THOMAS, A., OJASOO, T., and RAYNAUD, J.-P. (1989).  
Hydrophobic cluster analysis (HCA) of the hormone-binding domain of receptor proteins.  
*J. Steroid Biochem.* **34** : 355-361.
- MOUDGIL, V.K., ANTER, M.J., and HURD, C. (1989).  
Mammalian progesterone receptor shows differential sensitivity to sulfhydryl group modifying agents when bound to agonist and antagonist ligands.  
*J. Biol. Chem.* **264** : 2203-2211.
- MURPHY, L.C., and DOTZLAW, H. (1989).  
Variant estrogen receptor mRNA species detected in human breast cancer biopsy samples.  
*Mol. Endocrinol.* **3** : 687-693.
- NAAR, A.M., BOUTIN, J.-M., LIPKIN, S.M., YU, V.C., HOLLOWAY, J.M., GLASS, C.K., and ROSENFELD, M.G. (1991).  
The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors.  
*Cell* **65** : 1267-1279.
- NAGATA, T., KANNO, Y., OZATO, K., and TAKETO, M. (1994).  
The mouse RXR $\beta$  gene encoding RXR beta : genomic organization and two mRNA isoforms generated by alternative splicing of transcripts initiated from CpG island promoters.  
*Gene* **142** : 183-189.
- NAGAYA, T., and JAMESON, J.L. (1993).  
Thyroid hormone receptor dimerization is required for dominant negative inhibition by mutations that cause thyroid hormone resistance.  
*J. Biol. Chem.* **268** : 15766-15771.
- NAGPAL, S., SAUNDERS, M., KASTNER, P., DURAND, B., NAKSHATRI, H., and CHAMBON, P. (1992a).  
Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulation functions of retinoic acid receptors.  
*Cell* **70** : 1007-1019.
- NAGPAL, S., ZELENT, A., and CHAMBON, P. (1992b).  
RAR- $\beta$ 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR- $\beta$ 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 2718-2722.
- NAGPAL, S., FRIANT, S., NAKSHATRI, H., and CHAMBON, P. (1993).  
RARs and RXRs : evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization *in vivo*.  
*EMBO J.* **12** : 2349-2360.

NAKAJIMA, S., HSIEH, J.-C., MAC DONALD, P., HAUSSLER, C.-A., GALLIGAN, M.A., JURUTKA, P.W., and HAUSSLER, M.R. (1993).

Purified human vitamin D receptor overexpressed in *E. coli* and baculovirus systems does not bind 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> hormone efficiently unless supplemented with a rat liver nuclear extract.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197** : 478-485.

NAKAO, R., HAJI, M., YANASE, T., OGO, A., TAKAYANAGI, R., KATSUBE, T., FUKUMAKI, Y., and NAWATA, H. (1992).

A single amino acid substitution (Met786Val) in the steroid-binding domain of human androgen receptor leads to complete androgen insensitivity syndrome.

*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74** : 1152-1157.

NEWCOMER, M.E. (1993).

Structure of the epididymal retinoic acid binding protein at 2.1 Å resolution.

*Structure* **1** : 7-18.

NEWCOMER, M.E., PAPPAS, R.S., and ONG, D.E. (1993).

X-ray crystallographic identification of a protein-binding site for both all-trans- and 9-cis-retinoic acid.

*Proc. Natl. Acad. Sci USA* **90** : 9223-9227.

NEWMARK, J.R., HARDY, D.O., TONB, D.C., CARTER, B.S., EPSTEIN, J.I., ISAACS, W.B., BROWN, T.R., and BARRACK, E.R. (1992).

Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 6319-6323.

NICHOLSON, R.C., MADER, S., NAGPAL, S., LEID, M., ROCHETTE-EGLY, C., and CHAMBON, P. (1990).

Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site.

*EMBO J.* **9** : 4443-4454.

OBOURN, J.D., KOSZEWSKI, N.J., and NOTIDES, A.C. (1993).

Hormone- and DNA-binding mechanisms of the recombinant human estrogen receptor.

*Biochemistry* **32** : 6229-6236.

OJASOO, T., and RAYNAUD, J.P. (1978).

Unique steroid congeners for receptor studies.

*Cancer Res.* **38** : 4186-4198.

ONG, D.E. (1994).

Cellular transport and metabolism of Vitamin A : roles of the cellular retinoid-binding proteins.

*Nutrition Rev.* **52** : S24-S31.

ONG, D.E., NEWCOMER, M.E., and CHYTIL, F. (1994).

Cellular retinoid binding proteins.

in "*The retinoids*". Eds Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S. Raven Press : 283-317.

- PAKDEL, F., and KATZENELLENBOGEN, B.S. (1992).  
Human estrogen receptor mutants with altered estrogen and antiestrogen ligand discrimination.  
*J. Biol. Chem.* **267** : 3429-3437.
- PARK, J.-B., ASHIZAWA, K., PARKISON, C., and CHANG, S.-Y. (1993).  
One-step immunoaffinity purification of human  $\beta 1$  thyroid hormone receptor with DNA and hormone binding activity.  
*J. Biochem. Biophys. Meth.* **27** : 95-103.
- PARKER, C., and SHERBET, G.V. (1992).  
Modulation of gene function by retinoic acid.  
*Pathobiology* **60** : 278-283.
- PARRILLA, R., MIXSON, A.J., MAC PHERSON, J.A., MAC CLASKEY, J.H., and WEINTRAUB, B.D. (1991).  
Characterization of seven novel mutations of the c-erbA $\beta$  gene in unrelated kindreds with generalized thyroid hormone resistance. Evidence for two "hot spot" regions of the ligand binding domain.  
*J. Clin. Invest.* **88** : 2123-2130.
- PASCUAL, A., CASANOVA, J., and SAMUELS, H.H. (1982).  
Photoaffinity labeling of thyroid hormone nuclear receptors in intact cells.  
*J. Biol. Chem.* **257** : 9640-9647.
- PERLMANN, T., RANGARAJAN, P.N., UMESONO, K., and EVANS, R.M. (1993).  
Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs.  
*Genes & Dev.* **7** : 1411-1422.
- PETKOVICH, M., BRAND, N.J., KRUST, A., and CHAMBON, P. (1987).  
A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors.  
*Nature* **330** : 444-450.
- PETKOVICH, M. (1992).  
Regulation of gene expression by vitamin A : the role of nuclear retinoic acid receptors.  
*Annu. Rev. Nutr.* **12** : 443-471.
- PLET, A., RAYNAUD, F., and EVAÏN-BRION, D. (1988).  
Mécanisme d'action de l'acide rétinoïque.  
*Méd. Sci.* **4** : 618-623.
- POWER, R.F., CONNEELY, O.M., MAC DONNELL, D.P., CLARK, J.H., BUTT, T.R., SCHRADER, W.T., and O'MALLEY, B.W. (1990).  
High level expression of a truncated chicken progesterone receptor in *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem.* **265** : 1419-1424.
- PRATT, M.A.C., KRALOVA, J., and MAC BURNEY, M.W. (1990).  
A dominant negative mutation of the alpha retinoic acid receptor gene in a retinoic acid-nonresponsive embryonal carcinoma cell.  
*Mol. Cell. Biol.* **10** : 6445-6453.

PRATT, M.A.C., LANGSTON, A.W., GUDAS, L.J., and MAC BURNEY, M.W. (1993). Retinoic acid fails to induce expression of Hox genes in differentiation-defective murine embryonal carcinoma cells carrying a mutant gene for alpha retinoic acid receptor.

*Differentiation* **53** : 105-113.

PREDKI, P.F., ZAMBLE, D., SARKAR, B., and GIGUERE, V. (1994).

Ordered binding of retinoic acid and retinoid-X receptors to asymmetric response elements involves determinants adjacent to the DNA-binding domain.

*Mol. Endocrinol.* **8** : 31-39.

RAGSDALE, C.W., PETKOVICH, M., GATES, P.B., CHAMBON, P., and BROCKES, J.P. (1989).

Identification of a novel retinoic acid receptor in regenerative tissues of the newt.

*Nature* **341** : 654-657.

RAISHER, B.D., GULICK, T., ZHANG, Z., STRAUSS, A.W., MOORE, D.D., and KELLY, D.P. (1992).

Identification of a novel retinoid-responsive element in the promoter region of the medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase gene.

*J. Biol. Chem.* **267** : 20264-20269.

RATAJCZAK, T., WILKINSON, S.P., BROCKWAY, M.J., HAHNEL, R., MORITZ, R.L., BEGG, G.S., and SIMPSON, R.J. (1989).

The interaction site for tamoxifen aziridine with the bovine estrogen receptor.

*J. Biol. Chem.* **264** : 13453-13459.

REDDY, A.P., CHEN, J.-Y., ZACHAREWSKI, T., GRONEMEYER, H., VOORHEES, J.J., and FISHER, G.J. (1992).

Characterization and purification of human retinoic acid receptor- $\gamma$ 1 overexpressed in the baculovirus-insect cell system.

*Biochem. J.* **287** : 833-840.

REES, A.M., and BELL, P.A. (1975).

The involvement of receptor sulphhydryl groups in the binding of steroids to the cytoplasmic glucocorticoid receptor from rat thymus.

*Biochim. Biophys. Acta* **411** : 121-132.

REESE, J.C., and KATZENELLENBOGEN, B.S. (1991).

Mutagenesis of cysteines in the hormone binding domain of the human estrogen receptor. Alterations in binding and transcriptional activation by covalently and reversibly attaching ligands.

*J. Biol. Chem.* **266** : 10880-10887.

REESE, J.C., WOOGHE, C.H., and KATZENELLENBOGEN, B.S. (1992).

Identification of two cysteines closely positioned in the ligand-binding pocket of the human estrogen receptor : roles in ligand binding and transcriptional activation.

*Mol. Endocrinol.* **6** : 2160-2166.



REICHMAN, M.E., FOSTER, C.M., EISEN, L.P., EISEN, H.J., TORAIN, B.F., and SIMONS, S.S. (1984).

Limited proteolysis of covalently labeled glucocorticoid receptors as a probe of receptor structure.

*Biochemistry* **23** : 5376-5384.

REPA, J.J., HANSON, K.K., and CLAGETT-DAME, M. (1993).

All-trans-retinol is a ligand for the retinoic acid receptors.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 7293-7297.

RIAZ-UL-HAQ, PFAHL, M., and CHYTIL, F. (1991).

Retinoic acid affects the expression of nuclear retinoic acid receptors in tissues of retinol-deficient rats.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 8272-8276.

RICHARD, S., and ZINGG, H.H. (1991).

Identification of a retinoic acid response element in the human oxytocin promoter.

*J. Biol. Chem.* **266** : 21428-21433.

RIS-STALPERS, C., TRIFIRO, M.A., KUIPER, G.G.J.M., JENSTER, G., ROMALO, G., SAI, T., VAN ROOIJ, H.C.J., KAUFMAN, M., ROSENFELD, R.L., LIAO, S., SCHWEIKERT, H.-U., TRAPMAN, J., PINSKY, L., and BRINKMANN, A.O. (1991).

Substitution of aspartic acid-686 by histidine or asparagine in the human androgen receptor leads to a functionally inactive protein with altered hormone-binding characteristics.

*Mol. Endocrinol.* **5** : 1562-1569.

RITCHIE, H.H., HUGHES, M.R., THOMPSON, E.T., MALLOY, P.J., HOCHBERG, Z., FELDMAN, D., PIKE, J.W., and O'MALLEY, B.W. (1989).

An ochre mutation in the vitamin D receptor gene causes hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-resistant rickets in three families.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 9783-9787.

ROBERTSON, D.W., WEI, L.L., HAYES, J.R., CARLSON, K.E., KATZENELLENBOGEN, J.A., and KATZENELLENBOGEN, B.S. (1981).

Tamoxifen aziridines : effective inactivators of the estrogen receptor.

*Endocrinology* **109** : 1298-1300.

ROBERTSON, K.A., EMAMI, B., and COLLINS, S.J. (1992).

Retinoic acid-resistant HL-60R cells harbor a point mutation in the retinoic acid receptor ligand-binding domain that confers dominant negative activity.

*Blood* **80** : 1885-1889.

ROSEN, E.D., BENINGHOF, E.G., and KOENIG, R.J. (1993).

Dimerization interfaces of thyroid hormone, retinoic acid, vitamin D and retinoid X receptors.

*J. Biol. Chem.* **268** : 11534-11541.

ROSS, C.K., PRAHL, J.M., and DE LUCA, H.F. (1991).

Overproduction of rat 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in insect cells using the baculovirus expression system.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 6555-6559.

ROSS, T.K., PRAHL, J.M., HERZBERG, I.M., and DE LUCA, H.F. (1992).  
Baculovirus-mediated expression of retinoic acid receptor type  $\gamma$  in cultured insect cells reveals a difference in specific DNA-binding behavior with the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 10282-10286.

ROSS, A.C. (1993).  
Cellular metabolism and activation of retinoids : roles of cellular retinoid-binding proteins.  
*FASEB J.* **7** : 317-327.

ROTTMAN, J.N., WIDOM, R.L., NADAL-GINARD, B., MAHDAVI, V., and KARATHANASIS, S.K. (1991).  
A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein A1 gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways.  
*Mol. Cell. Biol.* **11** : 3814-3820.

ROWE, A., EAGER, N.S.C., and BRICKELL, P.M. (1991).  
A member of the RXR nuclear receptor family is expressed in neural-crest-derived cells of the developing chick peripheral nervous system.  
*Development* **111** : 771-778.

SAATCIOGLU, F., BARTUNEK, P., DENG, T., ZENKE, M., and KARIN, M. (1993).  
A conserved C-terminal sequence that is deleted in v-erbA is essential for the biological activities of c-erbA (the thyroid hormone receptor).  
*Mol. Cell. Biol.* **13** : 3675-3685.

SAITOU, M., NARUMIYA, S., and KAKIZUKA, A. (1994).  
Alteration of a single amino acid residue in retinoic acid receptor causes dominant-negative phenotype.  
*J. Biol. Chem.* **269** : 19101-19107.

SAKURAI, A., TAKEDA, K., AIN, K., CECCARELLI, P., NAKAI, A., SEINO, S., BELL, G.I., REFETOFF, S., and DE GROOT, L.J. (1989).  
Generalized resistance to thyroid hormone associated with a mutation in the ligand-binding domain of the human thyroid hormone receptor  $\beta$ .  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 8977-8981.

SAKURAI, A., MIYAMOTO, T., REFETOFF, S., and DE GROOT, L.J. (1990).  
Dominant negative transcriptional regulation by a mutant thyroid hormone receptor- $\beta$  in a family with generalized resistance to thyroid hormone.  
*Mol. Endocrinol.* **4** : 1988-1994.

SANCHEZ, E.R., HIRST, M., SCHERRER, L.C., TANG, H.-Y., WELSH, M.J., HARMON, J.M., SIMONS, S.S., RINGOLD, G.M., and PRATT, W.B. (1990).  
Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90.  
*J. Biol. Chem.* **265** : 20123-20130.

- SANI, B.P., SINGH, R.K., REDDY, L.G., and GAUB, M.-P. (1990).  
Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoic acid receptors from chick skin.  
*Arch. Biochem. Biophys.* **283** : 107-113.
- SCHENA, M., and YAMAMOTO, K.R. (1988).  
Mammalian glucocorticoid receptor derivatives enhance transcription in yeast.  
*Science* **241** : 965-967.
- SCHULE, R., UMESONO, K., MANGELSDORF, D.J., BOLADO, J., PIKE, J.W., and EVANS, R.M. (1990).  
Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene.  
*Cell* **61** : 497-504.
- SCHULE, R., RANGARAJAN, P., YANG, N., KLIEWER, S., RANSONE, L.J., BOLADO, J., VERMA, I.M., and EVANS, R.M. (1991).  
Retinoic acid is a negative regulator of AP-1 responsive genes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 6092-6096.
- SHEN, S., VAN DER SAAG, P.T., and KRUIJER, W. (1993).  
Dominant negative retinoic acid receptor  $\beta$ .  
*Mechanisms Dev.* **40** : 177-189.
- SHIMAZAWA, R., SANDA, R., MIZOGUCHI, H., HASHIMOTO, Y., IWASAKI, S., TANAKA, H., KAGECHIKA, H., and SHUDO, K. (1991).  
Fluorescent and photoaffinity labeling probes for retinoic acid receptors.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179** : 259-265.
- SHYAMALA, G., and DAVELUY, A. (1982).  
Inhibition of the binding of dexamethasone to mammary cytoplasmic glucocorticoid receptor by phenylglyoxal.  
*J. Biol. Chem.* **257** : 11976-11981.
- SIMONS, S.S., and THOMPSON, E.B. (1981).  
Dexamethasone 21-mesylate : an affinity label of glucocorticoid receptors from rat hepatoma tissue culture cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** : 3541-3545.
- SIMONS, S.S. (1987).  
Selective covalent labeling of cysteines in bovine serum albumin and in hepatoma tissue culture cell glucocorticoid receptors by dexamethasone 21-mesylate.  
*J. Biol. Chem.* **262** : 9669-9675.
- SIMONS, S.S., PUMPHREY, J.G., RUDIKOFF, S., and EISEN, H.J. (1987).  
Identification of cysteine 656 as the amino acid of hepatoma tissue culture cell glucocorticoid receptors that is covalently labeled by dexamethasone 21-mesylate.  
*J. Biol. Chem.* **262** : 9676-9680.
- SIMONS, S.S. (1988).  
Glucocorticoid receptor.  
in "Affinity labelling and cloning of steroid and thyroid hormone receptors". Ed. Gronemeyer, H. Ellis Horwood (Chichester, England) : 28-54.

- SIMONS, S.S., SISTARE, F.D., and CHAKRABORTI, P.K. (1989).  
Steroid binding activity is retained in a 16-kDa fragment of the steroid binding domain of rat glucocorticoid receptors.  
*J. Biol. Chem.* **264** : 14493-14497.
- SIMONS, S.S., CHAKRABORTI, P.K., and CAVANAUGH, A.H. (1990).  
Arsenite and cadmium (II) as probes of glucocorticoid receptor structure and function.  
*J. Biol. Chem.* **265** : 1938-1945.
- SLACK, J.M.W. (1987).  
We have a morphogen!  
*Nature* **327** : 553-554.
- SMITH, L.I., BODWELL, J.E., MENDEL, D.B., CIARDELLI, T., NORTH, W.G., and MUNCK, A. (1988).  
Identification of cysteine-644 as the covalent site of attachment of dexamethasone 21-mesylate to murine glucocorticoid receptors in WEHI-7 cells.  
*Biochemistry* **27** : 3747-3753.
- SMITH, D.B., and JOHNSON, K.S. (1988).  
Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia Coli* as fusions with glutathione S-transferase.  
*Gene* **67** : 31-40.
- SMITH, S.M., and EICHELE, G. (1991).  
Temporal and regional differences in the expression pattern of distinct retinoic acid receptor- $\beta$  transcripts in the chick embryo.  
*Development* **111** : 245-252.
- SONE, T., MAC DONNELL, D.P., O'MALLEY, B.W., and PIKE, J.W. (1990).  
Expression of human vitamin D receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, properties, and generation of polyclonal antibodies.  
*J. Biol. Chem.* **265** : 21997-22003.
- SPORN, M.B., and ROBERTS, A.B. (1985).  
What is a retinoid?  
in "*Retinoids, differentiation and disease*". Ciba foundation, Symposium **113**, Pitman Eds, London, 1-5.
- SRINIVASAN, G., and THOMPSON, E.B. (1990).  
Overexpression of full-length human glucocorticoid receptor in *Spodoptera frugiperda* cells using the baculovirus expression vector system.  
*Mol. Endocrinol.* **4** : 209-216.
- STANCATO, L.F., HUTCHISON, K.A., CHAKRABORTI, P.K., SIMONS, S.S., and PRATT, W.B. (1993).  
Differential effects of the reversible thiol-reactive agents arsenite and methyl methanethiosulfonate on steroid binding by the glucocorticoid receptor.  
*Biochemistry* **32** : 3729-3736.

STROMSTEDT, P.-E., BERKENSTAM, A., JORNVALL, H., GUSTAFSSON, J.-A., and CARLSTEDT-DUKE, J. (1990).

Radiosequence analysis of the human progestin receptor charged with [<sup>3</sup>H]promegestone. A comparison with the glucocorticoid receptor.

*J. Biol. Chem.* **265** : 12973-12977.

SUCOV, H.M., MURAKAMI, K.K., and EVANS, R.M. (1990).

Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type  $\beta$  gene.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 5392-5396.

SUCOV, H.M., DYSON, E., GUMERINGER, C.L., PRICE, J., CHIEN, K.R., and EVANS, R.M. (1994).

RXR $\alpha$  mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis.

*Genes & Dev.* **8** : 1007-1018.

SWEET, F., and MURDOCK, G.L. (1987).

Affinity labeling of hormone-specific proteins.

*Endocrine Rev.* **8** : 154-184.

TAIRIS, N., GABRIEL, J.L., GYDA III, M., SOPRANO, K.J., and SOPRANO, D.R. (1994).

Arg<sup>269</sup> and Lys<sup>220</sup> of retinoic acid receptor- $\beta$  are important for the binding of retinoic acid.

*J. Biol. Chem.* **269** : 19516-19522.

TAKEDA, K., WEISS, R.E., and REFETOFF, S. (1992).

Rapid localization of mutations in the thyroid hormone receptor- $\beta$  gene by denaturing gradient gel electrophoresis in 18 families with thyroid hormone resistance.

*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74** : 712-719.

TASHIMA, Y., TERUI, M., ITOH, H., MIZUNUMA, H., KOBAYASHI, R., and MARUMO, F. (1989).

Effect of selenite on glucocorticoid receptor.

*J. Biochem.* **105** : 358-361.

TATE, B.F., ALLENBY, G., JANOSHA, R., KAZMER, S., SPECK, J., STURZENBECKER, L.J., ABARZUA, P., LEVIN, A.A., and GRIPPO, J.F. (1994).

Distinct binding determinants for 9-cis retinoic acid are located within AF-2 of retinoic acid receptor  $\alpha$ .

*Mol. Cell. Biol.* **14** : 2323-2330.

THALLER, C., and EICHELE, G. (1990).

Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud.

*Nature* **345** : 815-819.

THALLER, C., HOFMANN, C., and EICHELE, G. (1993).

9-cis-retinoic acid, a potent inducer of digit pattern duplications in the chick wing bud.

*Development* **118** : 957-965.

TIENRUNGROJ, W., MESHINCHI, S., SANCHEZ, E.R., PRATT, S.E., GRIPPO, J.F., HOLMGREN, A., and PRATT, W.B. (1987).

The role of sulfhydryl groups in permitting transformation and DNA binding of the glucocorticoid receptor.

*J. Biol. Chem.* **262** : 6992-7000.

TONEY, J.H., WU, L., SUMMERFIELD, A.E., SANYAL, G., FORMAN, B.M., ZHU, J., and SAMUELS, H.H. (1993).

Conformational changes in chicken thyroid hormone receptor  $\alpha$ 1 induced by binding to ligand or to DNA.

*Biochemistry* **32** : 2-6.

TORA, L., MULLICK, A., METZGER, D., PONGLIKITMONGKOL, M., PARK, I., and CHAMBON, P. (1989).

The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties.

*EMBO J.* **8** : 1981-1986.

TSAI, S., BARTELMEZ, S., HEYMAN, R., DAMM, K., EVANS, R., and COLLINS, S.J. (1992).

A mutated retinoic acid receptor- $\alpha$  exhibiting dominant-negative activity alters the lineage development of a multipotent hematopoietic cell line.

*Genes & Dev.* **6** : 2258-2269.

TSAI, S., and COLLINS, S.J. (1993).

A dominant negative retinoic acid receptor blocks neutrophil differentiation at the promyelocyte stage.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 7153-7157.

UMESONO, K., GIGUERE, V., GLASS, C.K., ROSENFELD, M.G., and EVANS, R.M. (1988).

Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element.

*Nature* **336** : 262-265.

UMESONO, K., and EVANS, R.M. (1989).

Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors.

*Cell* **57** : 1139-1146.

UMESONO, K., MURAKAMI, K.K., THOMPSON, C.C., and EVANS, R.M. (1991).

Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D<sub>3</sub> receptors.

*Cell* **65** : 1255-1266.

URBACH, J., and RANDO, R.R. (1994).

Isomerization of all-trans retinoic acid to 9-cis retinoic acid.

*Biochem. J.* **299** : 459-465.

USALA, S.J., TENNYSON, G.E., BALE, A.E., LASH, R.W., GESUNDHEIT, N., WONDISFORD, F.E., ACCILI, D., HAUSER, P., and WEINTRAUB, B.D. (1990a).

A base mutation of the C-erbA $\beta$  thyroid hormone receptor in a kindred with generalized thyroid hormone resistance. Molecular heterogeneity in two other kindreds.

*J. Clin. Invest.* **85** : 93-100.

USALA, S.J., WONDISFORD, F.E., WATSON, T.L., MENKE, J.B., and WEINTRAUB, B.D. (1990b).

Thyroid hormone and DNA binding properties of a mutant c-erbA $\beta$  receptor associated with generalized thyroid hormone resistance.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171** : 575-580.

USALA, S.J., MENKE, J.B., WATSON, T.L., BERARD, J., BRADLEY, W.E.C., BALE, A.E., LASH, R.W., and WEINTRAUB, B.D. (1991a).

A new point mutation in the 3,5,3'-triiodothyronine-binding domain of the c-erbA $\beta$  thyroid hormone receptor is tightly linked to generalized thyroid hormone resistance.

*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72** : 32-38.

USALA, S.J., MENKE, J.B., WATSON, T.L., WONDISFORD, F.E., WEINTRAUB, B.D., BERARD, J., BRADLEY, W.E.C., ONO, S., MUELLER, O.T., and BERCU, B.B. (1991b).

A homozygous deletion in the c-erbA $\beta$  thyroid hormone receptor gene in a patient with generalized thyroid hormone resistance : isolation and characterization of the mutant receptor.

*Mol. Endocrinol.* **5** : 327-335.

VASIOS, G.W., GOLD, J.D., PETKOVICH, M., CHAMBON, P., and GUDAS, L.J. (1989).

A retinoic acid-responsive element is present in the 5' flanking region of the laminin B1 gene.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 9099-9103.

VEGETO, E., ALLAN, G.F., SCHRADER, W.T., TSAI, M.-J., MAC DONNELL, D.P., and O'MALLEY, B.W. (1992).

The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor.

*Cell* **69** : 703-713.

VELDSCHOLTE, J., RIS-STALPERS, C., KUIPER, G.G.J.M., JENSTER, G., BERREVOETS, C., CLAASSEN, E., VAN ROOIJ, H.C.J., TRAPMAN, J., BRINKMANN, A.O., and MULDER, E. (1990).

A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173** : 534-540.

VELDSCHOTE, J., BERREVOETS, C.A., BRINKMANN, A.O., GROOTEGOED, J.A., and MULDER, E. (1992).

Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells : differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation.

*Biochemistry* **31** : 2393-2399.

- WAGNER, M., THALLER, C., JESSELL, T., and EICHELE, G. (1990).  
Polarizing activity and retinoid synthesis in the floor plate of the neural tube.  
*Nature* **345** : 819-822.
- WEI, L.N., BLANER, W.S., GOODMAN, D.S., and NGUYEN-HUU, M.C. (1989).  
Regulation of the cellular retinoid-binding proteins and their messenger ribonucleic acids during P19 embryonal carcinoma cell differentiation induced by retinoic acid.  
*Mol. Endocrinol.* **3** : 454-463.
- WEIGEL, N.L., BECK, C.A., ESTES, P.A., PRENDERGAST, P., ALTMANN, M., CHRISTENSEN, K., and EDWARDS, D.P. (1992).  
Ligands induce conformational changes in the carboxyl-terminus of progesterone receptors which are detected by a site-directed antipeptide monoclonal antibody.  
*Mol. Endocrinol.* **6** : 1585-1597.
- WEINBERGER, C., THOMPSON, C.C., ONG, E.S., LEBO, R., GRUOL, D.J., and EVANS, R.M. (1986).  
The *c-erbA* gene encodes a thyroid hormone receptor.  
*Nature* **324** : 641-646.
- WEISS, R.E., WEINBERG, M., and REFETTOFF, S. (1993).  
Identical mutations in unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone occur in cytosine-guanine-rich areas of the thyroid hormone receptor beta gene. Analysis of 15 families.  
*J. Clin. Invest.* **91** : 2408-2415.
- WILSON, T.E., PAULSEN, R.E., PADGETT, K.A., and MILBRANDT, J. (1992).  
Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors.  
*Science* **256** : 107-110.
- WINTER, N., BRATT, J., and BANASZAK, L.J. (1993).  
The crystal structures of holo and apo cellular retinol-binding protein II.  
*J. Mol. Biol.* **230** : 1247-1259.
- WOOGE, C.H., NILSSON, G.M., HEIERSON, A., MAC DONNELL, D.P., and KATZENELLENBOGEN, B.S. (1992).  
Structural requirements for high affinity ligand binding by estrogen receptors : a comparative analysis of truncated and full length estrogen receptors expressed in bacteria, yeast, and mammalian cells.  
*Endocrinology* **6** : 861-869.
- WRANGE, O., OKRET, S., RADOJCIC, M., CARLSTEDT-DUKE, J., and GUSTAFSSON, J.-A. (1984).  
Characterization of the purified activated glucocorticoid receptor from rat liver cytosol.  
*J. Biol. Chem.* **259** : 4534-4541.
- WRENN, C.K., and KATZENELLENBOGEN, B.S. (1993).  
Structure-function analysis of the hormone binding domain of the human estrogen receptor by region-specific mutagenesis and phenotypic screening in yeast.  
*J. Biol. Chem.* **268** : 24089-24098.



- WRIGHT, A.P.H., and GUSTAFSSON, J.-A. (1992).  
Glucocorticoid-specific gene activation by the intact human glucocorticoid receptor expressed in yeast.  
*J. Biol. Chem.* **267** : 11191-11195.
- XIE, Y.-B., SUI, Y.-P., SHAN, L.-X., PALVIMO, J.J., PHILLIPS, D.M., and JANNE, O.A. (1992).  
Expression of androgen receptor in insect cells. Purification of the receptor and renaturation of its steroid- and DNA-binding functions.  
*J. Biol. Chem.* **267** : 4939-4948.
- YAMAKAWA, T., KAGECHIKA, H., KAWACHI, E., HASHIMOTO, Y., and SHUDO, K. (1990).  
Retinobenzoic acids. 5. Retinoidal activities of compounds having a trimethylsilyl or trimethylgermyl groups in human promyelocytic leukaemia cells HL-60.  
*J. Med. Chem.* **33** : 1430-1437.
- YANG, N., SCHULE, R., MANGELSDORF, D.J., and EVANS, R.M. (1991).  
Characterization of DNA binding and retinoic acid binding properties of retinoic acid receptor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 3559-3563.
- YARBROUGH, W.G., QUARMBY, V.E., SIMENTAL, J.A., JOSEPH, D.R., SAR, M., LUBAHN, D.B., OLSEN, K.L., FRENCH, F.S., and WILSON, E.M. (1990).  
A single base mutation in the androgen receptor gene causes androgen insensitivity in the testicular feminized rat.  
*J. Biol. Chem.* **265** : 8893-8900.
- YEN, P.M., SUGAWARA, A., REFETOFF, S., and CHIN, W.W. (1992).  
New insights on the mechanism(s) of the dominant negative effect of mutant thyroid hormone receptor in generalized resistance to thyroid hormone.  
*J. Clin. Invest.* **90** : 1825-1831.
- YEN, P.M., SUGAWARA, A., FORGIONE, M., SPANJAARD, R.A., MACCHIA, E., CHENG, S.-Y., and CHIN, W.W. (1993).  
Region-specific anti-thyroid receptor (TR) antibodies detect changes in TR structure due to ligand-binding and dimerization.  
*Mol. Cell. Endocrinol.* **97** : 93-99.
- YOUNG, H.A., PARKS, W.P., and SCOLNICK, E.M. (1975).  
Effect of chemical inactivating agents on glucocorticoid receptor proteins in mouse and hamster cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** : 3060-3064.
- YU, V.C., DELSERT, C., ANDERSEN, B., HOLLOWAY, J.M., DEVARY, O.V., NAAR, A.M., KIM, S.Y., BOUTIN, J.-M., GLASS, C.K., and ROSENFELD, M.G. (1991).  
RXR- $\beta$  : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements.  
*Cell* **67** : 1251-1266.

ZANOTTI, G., MALPELI, G., and BERNI, R. (1993).

The interaction of N-ethyl retinamide with plasma retinol-binding protein (RBP) and the crystal structure of the retinoid-RBP complex at 1,9 Å resolution.

*J. Biol. Chem.* **268** : 24873-24879.

ZECHEL, C., SHEN, X.-Q., CHAMBON, P., and GRONEMEYER, H. (1994a).

Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements.

*EMBO J.* **13** : 1414-1424.

ZECHEL, C., SHEN, X.-Q., CHEN, J.-Y., CHEN, Z.-P., CHAMBON, P., and GRONEMEYER, H. (1994b).

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 repeat.

*EMBO J.* **13** : 1425-1433.

ZELENT, A., KRUST, A., PETKOVICH, M., KASTNER, P., and CHAMBON, P. (1989).

Cloning of murine  $\alpha$  and  $\beta$  retinoic acid receptors and a novel receptor  $\gamma$  predominantly expressed in skin.

*Nature* **339** : 714-717.

ZELENT, A., MENDELSON, C., KASTNER, P., KRUST, A., GARNIER, J.-M., RUFFENACH, F., LEROY, P., and CHAMBON, P. (1991).

Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor  $\beta$  are generated by usage of two promoters and alternative splicing.

*EMBO J.* **10** : 71-81.

ZHANG, X.-K., HOFFMANN, B., TRAN, P.B.-V., GRAUPNER, G., and PFAHL, M. (1992a).

Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors.

*Nature* **355** : 441-446.

ZHANG, X., LEHMANN, J., HOFFMANN, B., DAWSON, M.I., CAMERON, J., GRAUPNER, G., HERMANN, T., TRAN, P., and PFAHL, M. (1992b).

Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis-retinoic acid.

*Nature* **358** : 587-591.

ZHANG, X.-K., SALBERT, G., LEE, M.-O., and PFAHL, M. (1994).

Mutations that alter ligand-induced switches and dimerization activities in the retinoid X receptor.

*Mol. Cell. Biol.* **14** : 4311-4323.