

ΝΡ: 9891
ΚΟΕ: 6814

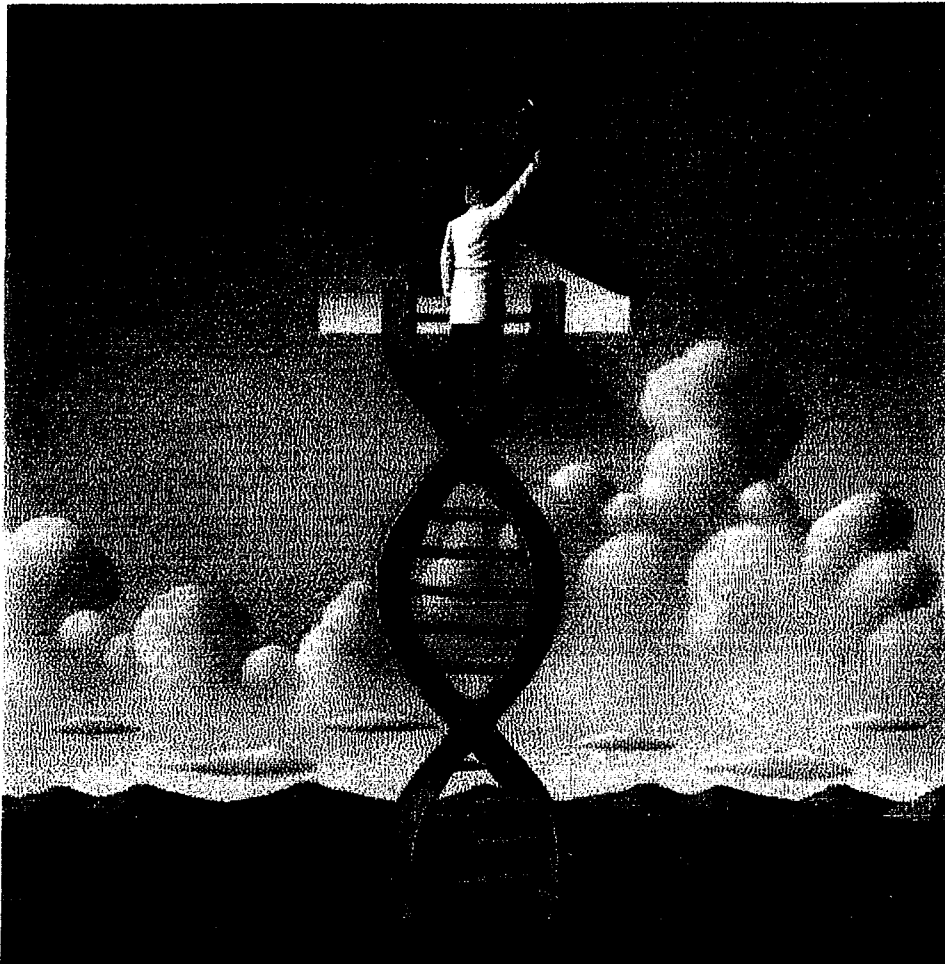
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΡΕΥΝΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΚΤΥΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ.



Ελένη Θ. Κτιστάκη

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 1998

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στο εργαστήριο της ομάδας Μοριακής Βιολογίας Θηλαστικών, του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας (Ι.Μ.Β.Β.), του Ιδρύματος Τεχνολογίας & Έρευνας (Ι.Τ.Ε), υπό την επίβλεψη του κ. Ι. Ταλιανίδη τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την αδιάκοπη επιστημονική του υποστήριξη και συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Φτωχά τα λόγια για να εκφράσω το ευχαριστώ μου στους συνεργάτες, τους φίλους μου, παλιούς και καινούριους, και την οικογένειά μου γιατί ήταν πάντα δίπλα μου στις καλές και στις δύσκολες στιγμές των τελευταίων χρόνων.


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ


ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ : Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της ΑροΑΙV

 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ : Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης του HNF-4 σε τυροσίνη.

 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ : Αλληλεπίδραση του HNF-4 με τον HNF-1.

 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ : Αλληλεπίδραση του HNF-4 με τους COUP-TFs.

ΑΝΤΙ ΕΠΙΛΟΓΟΥ

ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ – ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

SUMMARY

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ – ΑΡΘΡΟΓΡΑΦΙΑ

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

ΟΡΟΣ	ΠΛΗΡΕΣ ΟΝΟΜΑ	ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ-ΕΡΜΗΝΕΙΑ
A	Adenine	Αδενίνη
aa	amino acid	Αμινοξύ
Activity		Ενεργότητα
Annealing		«υβριδοποίηση», μη ομοιοπολική σύνδεση
anti-, ab	antibody	Αντίσωμα
artifact		τεχνούργημα
as	antisense	Αντικωδικός
B	Bound	Δεσμευμένο
Blunt end		«τυφλό άκρο»
bp	base pairs	Ζευγάρια βάσεων
BSA	Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη ορού βοός
C	Cytocine	Κυτοσίνη
CAT	Chloramphenicol Acetyl Transferase	Ακετυλοτρενσφεράση της χλωραμφενικόλης
Cell line, cell type		Κυτταρική σειρά
cis		Από κοντά
Competitor		Ανταγωνιστής
Consensus		Συντηρημένη αλληλουχία
Conversion		Μετατροπή
cpm	counts per minute	Κρούσεις ανά λεπτό
CsCl	Cesium chloride	Χλωριούχο κάσιο
cyt	cytoplasmic	Κυτταροπλασματικό
d	deoxy-	Δεοξυ-
DBD	DNA Binding Domain	Περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA
Deletion		Ελλειψη
DEPC	DiEthylPyroCarbonate	Διεθυλο-πυροκαρβονικό οξύ
DMSO	DiMethylSulfOxide	Διμέθυλ- σουλφοξείδιο
Distal		Απομακρυσμένο (άπω)
DTT	DiThioThreitol	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Ethylen-Diamine-Tetra-Acetic acid	Εθυλεν-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay	Μεταβολή ηλεκτροφορητικής κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης
electroelution		ηλεκτροέκλουση
Enhancer		Ενισχυτής επαγωγής
EtBr	Ethidium bromide	Βρωμιούχο αιθίδιο
Extract		Εκχύλισμα
Ex vivo		Εκτός οργανισμού
F	Free	Ελεύθερος ανιχνευτής

G	Guanine	Γουανίνη
Genistein		Γενιστεΐνη
g	Gram	Γραμμάριο
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid	
Inhibition		Αναστολή, καταστολή
In vitro		Στο σωλήνα
In vivo		Στη φύση, στον οργανισμό
kb	Kilobase	Κιλοβάση
kDa	Kilodalton	Κιλοντάτον
Knock out		Γονιδιακή εξάλειψη
labeling		Σήμανση
Ligand		Προσδέτης
Ligation		Μοριακή συρραφή
M	Molarity	Μοριακότητα
μ	Micro (10 ⁻⁶)	Μικρο-
min	Minute	Λεπτό
Minimum promoter		Υποκινητής ελάχιστης μεταγραφικής ενεργότητας
μl (λ)	Microliter	Μικρόλιτρο
Mock		Πλαστό (χωρίς επιμόλυνση)
mt	Mutation	Μεταλλαγή
MW	Molecular weight	Μοριακό βάρος
N		Τυχαία νουκλεοτιδική βάση
Neo	Neomycin	Νεομυκίνη
ng	Nanogram	Νανογραμμάριο
N.m.	Nuclear membrane	Πυρηνική μεμβράνη
Normalised CAT activity		Κανονικοποιημένη ενεργότητα ενζύμου CAT
Nt	Nucleotide	Νουκλεοτίδιο
Nu	Nucleus	Πυρήνας
Nuclear		Πυρηνικός
O/N	Overnight	Κατά τη διάρκεια της νύχτας
ONPG	o-nitrophenyl-β-D-galactosidase	
³²P	³² P-orthophosphate	Ραδιοσημασμένος φώσφορος
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Plasmid		Πλασμιδιακός φορέας
Pre-immune		Προ-ανοσοποιημένο
pl	polylinker	Πολυσυνδέτης (περιοχή κλωνοποιήσεων)
Primer		Εναρκτής
probe		Ανιχνευτής, ιχνηλάτης
Promoter		Υποκινητής
Proximal		Εγγύς
PTK	Protein Tyrosine Kinase	Πρωτεΐνη με ιδιότητες κινάσης

		τυροσίνης
PTPase	Protein Tyrosine Phosphatase	Πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης
PTyr	Phosphotyrosine	Φωσφορυλιωμένη τυροσίνη
Quelching		Σβήσιμο, απάλειψη
Rat liver extract		Εκχύλισμα από συκώτι αρουραίου
Repressor		Καταστολέας
Resistance		Ανθεκτικότητα
Restriction enzyme		Περιοριστική ενδονουκλεάση
Rnase		Ενζυμο που υδρολύει RNA
³⁵S-Met	³⁵ S-Methionine	Μεθειονίνη ραδιοσημασμένη με ³⁵ S
Sense		Κωδικός
Squelching		Μοριακός ανταγωνισμός, εκτόπιση
Subcloning		Υποκλωνοποίηση
Supercoiled		Υπερελικωμένο
Superactivation		Υπερ-επαγωγή
T	Thimidine	Θυμιδίνη
Template		Μήτρα
Trans-		Από μακριά (με τη μεσολάβηση πρωτεΐνης)
TF	Transcription Factor	Μεταγραφικός παράγοντας
Transformation		Μετασχηματισμός
Truncation		Μοριακός ακρωτηριασμός
Transient transfection		Παροδική διαμόλυνση
"u"	Unit	Μονάδα μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας
Untreated		Χωρίς την επίδραση φαρμάκου
3'UTR	3' untranslated region	3' μη μεταγραφόμενη περιοχή
Vanadate		βανάδιο
Vector		Φορέας
WT	Wild Type	Αγριου τύπου
"x"	times	φορές

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένας από τους σημαντικότερους τομείς έρευνας στη Βιολογία στρέφεται στη διερεύνηση μηχανισμών που ελέγχουν και κατευθύνουν τη διαδικασία ανάπτυξης και οργανογένεσης. Πώς δηλαδή τα μέχρι κάποιου σημείου της εμβρυογένεσης πανομοιότυπα κύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται και να δίνουν τελικά τη μεγάλη ποικιλία οργάνων και ιστών που παρατηρούμε σε ένα πολυκύτταρο οργανισμό. Σε μοριακό επίπεδο, οι διαδικασίες της διαφοροποίησης και οργανογένεσης λαμβάνουν χώρα σε συγκεκριμένες ομάδες κυττάρων και στην κατάλληλη χρονική στιγμή. Στην παρούσα εργασία, δηλαδή, το πρόβλημα μετατίθεται στην κατανόηση των μηχανισμών που κατευθύνουν την ιστοειδική έκφραση γονιδίων. Το ερώτημα έχει τεθεί εδώ και χρόνια: Πώς είναι δυνατόν, δεδομένου ότι όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν το ίδιο γενετικό υλικό, κάποια γονίδια να εκφράζονται μόνο στα κύτταρα συγκεκριμένων ιστών; Για παράδειγμα, η αιμοσφαιρίνη εκφράζεται κύρια στους ερυθροβλάστες, η μυοσφαιρίνη στους μυοβλάστες, οι απολιποπρωτεΐνες στα ηπατοκύτταρα.

Το ήπαρ είναι ένα όργανο στο οποίο το φαινόμενο της ιστοειδικότητας έχει μελετηθεί αρκετά, χωρίς να μπορούμε να ισχυριστούμε ότι ο μηχανισμός του έχει διασαφηνιστεί. Ο ηπατικός φαινότυπος καθιστά το όργανο αυτό ελκυστικό σύστημα για βιοχημικές, κυτταρολογικές, αναπτυξιακές, γενετικές και μοριακές μελέτες. Λόγω της στρατηγικής του θέσης κοντά στην πυλαία φλέβα που μεταφέρει θρεπτικά συστατικά από το έντερο και από τη γενική κυκλοφορία και λόγω της ιδιαίτερης οργάνωσής του, λειτουργεί τόσο ως εξωκρινές όσο και ως ενδοκρινές όργανο.

Τα ηπατοκύτταρα είναι ο πολυπληθέστερος αλλά όχι και ο μόνος κυτταρικός τύπος στο ήπαρ. Συναντάμε ακόμα επιθηλιακά, μεσοθηλιακά και άλλων τύπων κύτταρα. Τα ηπατοκύτταρα λειτουργούν ως κέντρα μεταβολισμού των υδατανθράκων, λιπιδίων, στεροειδών, αμινοξέων και προσταγλανδινών και ακόμα ως εργαστήριο αποτοξίνωσης διαφόρων ουσιών και παραγωγής πρωτεϊνών του ορού.

Ο καθορισμός και η διατήρηση του ηπατικού φαινότυπου συνίσταται στην έκφραση μιας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ικανές και αναγκαίες για την ηπατική λειτουργία. Η ρύθμιση των παραπάνω γονιδίων γίνεται κύρια στο επίπεδο της μεταγραφής, μεταθέτοντας έτσι το βάρος της ευθύνης για τις κρίσιμες

αποφάσεις σε γενικούς ή ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Κανένας όμως από τους ειδικούς αυτούς παράγοντες δεν εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στο ήπαρ (162). Είναι δηλαδή μάλλον ο συνδυασμός τους και οι σχετικές ενδοκυτταρικές τους συγκεντρώσεις που φαίνεται να είναι ιδανικές στα κύτταρα του ήπατος (162).

Τέτοιοι παράγοντες είναι:

- ↳ ο HNF-1 (Hepatocyte Nuclear Factor 1) και ο «συγγενικός» του, vHNF-1 (variant HNF-1) που είναι μέλη της οικογένειας POU homeobox (5, 6, 8, 32, 27, 41, 81, 90, 91, 96, 100, 120).
- ↳ ο HNF-4, μέλος της οικογένειας των ορφανών ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων (23, 49, 135, 136, 145, 165).
- ↳ η οικογένεια των C/EBPs που χαρακτηρίζονται ως bZip πρωτεΐνες λόγω της δομής της περιοχής πρόσδεσης σε DNA (113, 160).
- ↳ η οικογένεια των HNF-3 που παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με το forkhead μεταγραφικό παράγοντα της δροσόφιλας (73, 107).

Ας κάνουμε μια επισκόπηση της βιβλιογραφίας αναφορικά με τον ηπατικό μεταγραφικό πυρηνικό παράγοντα 1 (Hepatocyte Nuclear Factor 1) που στο εξής θα ονομάζουμε HNF-1 χάρην συντομίας. Μια παραπλήσια μορφή του HNF-1 είναι ο vHNF-1 που σε αντίθεση με τον HNF-1, εκφράζεται κυρίως σε μη διαφοροποιημένα ή σε αποδιαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα και αναγνωρίζει τους ίδιους στόχους με τον HNF-1, έχοντας κατά συνέπεια την ικανότητα να ρυθμίζει τα ίδια γονίδια (5, 21, 32, 69, 91).

Και οι δύο παραπάνω παράγοντες ανήκουν στην οικογένεια POU-homeobox λόγω της ομολογίας που παρουσιάζει το τμήμα της πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με το DNA, με το αντίστοιχο άλλων μελών της οικογένειας. Ο HNF-1 είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση πληθώρας γονιδίων όπως της λευκωματίνης, της αφετοπρωτεΐνης, των α,β ινιδογόνων, της ινσουλίνης, των απολιποπρωτεϊνών Β, ΑΙΙ και πολλών άλλων (90). Ο ιστός στον οποίο κυρίως εκφράζεται είναι το ήπαρ, και συγκεκριμένα τα ηπατοκύτταρα. Συναντάται, επίσης, στα επιθηλιακά κύτταρα του παγκρέατος, στο έντερο και στα νεφρά (5, 8, 41). Οι δύο πρωτεΐνες (HNF-1 και v HNF-1) κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (5, 32, 120). Συναντώνται τόσο ως ομοδιμερή όσο και ως ετεροδιμερή. Το cDNA τους έχει κλωνοποιηθεί από πολλούς οργανισμούς όπως αρουραίος, ποντίκι, άνθρωπο, σολομό, βάτραχο και άλλους. Πιο αναλυτική

ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και της αρθρογραφίας για τον HNF-1 θα γίνει στο τρίτο κεφάλαιο.

Ενας άλλος μεταγραφικός παράγοντας που χαρακτηρίζεται ως βασικός συντελεστής της ρύθμισης πολλών ηπατικών γονιδίων, είναι ο ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4). Στο εξής θα αναφερόμαστε σ' αυτόν με τη σύντμηση HNF-4. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 455 αμινοξέων, μοριακού βάρους 54kDa (135, 136). Το μόριο αποτελείται:

- ◆ Από το αμινοτελικό άκρο, που είναι υπεύθυνο για τη μετάβαση του HNF-4 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (παρόλο που δεν είναι ακόμα γνωστό το ακριβές τμήμα που δίνει το σήμα μετάβασης στον πυρήνα) και για την πρόσδεσή του στο DNA μέσω δύο δακτύλων ψευδαργύρου.
- ◆ Από το καρβοξυτελικό άκρο, που περιλαμβάνει μια συντηρημένη θέση πρόσδεσης ορμόνης-προσδέτη και την αλληλουχία διμερισμού της πρωτεΐνης. Στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου αποδίδεται και η μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4, χωρίς πάλι να έχει οριοθετηθεί η ακριβής αλληλουχία που είναι απαραίτητη για την επαγωγή της μεταγραφής (135, 136).

Λόγω της μεγάλης ομοιότητας της δομής του και της υψηλής του ομολογίας με τα άλλα μέλη της οικογένειας των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων (**ΠΙΝΑΚΑΣ 1**), ο HNF-4 κατατάσσεται σ' αυτή την οικογένεια (135). Παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία με τον R_xR_a ειδικά στην περιοχή διμερισμού και πρόσδεσης του προσδέτη, παρόλο που δεν σχηματίζει ετεροδιμερή με τον R_xR_a αλλά ούτε και με κανένα άλλο μέλος της οικογένειας (135). Δεν έχει βρεθεί κανένας προσδέτης που να αναγνωρίζεται από τον HNF-4, γεγονός που μας κάνει να τον κατατάξουμε στην οικογένεια των «ορφανών» υποδοχέων (28, 59). Παρόλο που δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί, ένας λόγος που μας κάνει να πιστεύουμε ότι υπάρχει προσδέτης, είναι το γεγονός ότι η αναμενόμενη θέση πρόσδεσής του είναι εξαιρετικά συντηρημένη από τη δροσόφιλα ως τον άνθρωπο (136). Ο HNF-4 είναι ενεργός σε όλες τις κυτταρικές σειρές που διαμολύναμε, ακόμα και σε *in vitro* σύστημα μεταγραφής. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι παρά το συντηρημένο «ligand binding domain», δεν απαιτείται η πρόσδεσή του μορίου αυτού για τη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4 ή ότι ο προσδέτης αυτός είναι κάποιο μόριο -πιθανά προϊόν ή παραπροϊόν κάποιας κοινής μεταβολικής διαδικασίας του κυττάρου- που υπάρχει σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, υπόθεση βέβαια που δεν εξηγεί απόλυτα την

ενεργότητα του HNF-4 ακόμα και σε *in vitro* σύστημα μεταγραφής (85, 136). Μια άλλη άποψη που έχει διατυπωθεί για τον προσδέτη του HNF-4 είναι ότι μπορεί ο ρόλος του να είναι η καταστολή της δράσης του HNF-4 και να είναι κάποιο μόριο που εκφράζεται ή παράγεται μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ή σε κάποια μόνο στάδια της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης των ηπατικών και εντερικών κυττάρων, πιθανά όταν δηλαδή τα HNF-4-εξαρτώμενα γονίδια πρέπει να παραμείνουν σιωπηλά.

Το cDNA του HNF-4 έχει κλωνοποιηθεί σε πολλούς κι εξελικτικά απομακρυσμένους οργανισμούς όπως δροσόφιλα (165), βάτραχος (50), ποντίκι (145, 166), αρουραίος (49, 135), άνθρωπος (23). Είναι αξιοπρόσεκτη η υψηλή συντήρηση της αλληλουχίας του σε τόσο διαφορετικά είδη οργανισμών, καθώς και η ταύτησή του προτύπου έκφρασής του στους διάφορους ιστούς. Έτσι, ο HNF-4 εκφράζεται στον αρουραίο, στο ποντίκι και στον άνθρωπο κυρίως στο ήπαρ, στα νεφρά και στο έντερο (162) που είναι όργανα με λειτουργία ανάλογη των λιπαρών σωματιδίων, μαλπιγγιανών σωλήνων και του μεσεντέρου της δροσόφιλας (165), όπου επίσης εκφράζεται ο HNF-4. Σε χαμηλότερα επίπεδα, ο HNF-4 εκφράζεται στην ενδοκρινική μοίρα του παγκρέατος και σε ακόμα χαμηλότερα στο δέρμα (145).

Στους οργανισμούς που αναφέραμε, η πρωτεΐνη HNF-4 εμφανίζεται με διάφορες ισομορφές (23, 49). Δεν μπορούμε προς το παρόν να κατανοήσουμε το λόγο ύπαρξης αυτών των ισομορφών. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες/γονίδια - στόχους, ή ότι εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς ή σε διαφορετικές περιόδους κατά την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση, είτε τέλος ότι αποκρίνονται σε διαφορετικά σήματα. Δεν μπορούμε όμως να ισχυριστούμε με βεβαιότητα κάτι από τα παραπάνω μια και όλες οι ισομορφές που έχουν κλωνοποιηθεί εκφράζονται με παρόμοιο πρότυπο τόσο τοπικά όσο και χρονικά. Για κάποιες ισομορφές του *rHNF-4* (από αρουραίο) έχει δείχτει να έχουν προτίμηση σε κάποιους υποκινητές χωρίς όμως να αποκλείεται η δράση τους σε κάποιους άλλους.

Σε όλους τους οργανισμούς που έχουν κλωνοποιηθεί ισομορφές του HNF-4, φαίνεται ότι πρόκειται για προϊόντα εναλλακτικής συρραφής του mRNA που προκύπτει από ένα και μόνο γονίδιο. Το αντίστοιχο γονίδιο έχει εντοπιστεί στο χρωμόσωμα 2 του ποντικού, στο 3 του αρουραίου και στην περιοχή 20p13 του ανθρώπου (4, Kritis et al.).

Ειδικά για το ποντίκι, η θέση στην οποία εδράζεται το γονίδιο του HNF-4 είναι σε γειτονία με την *lethal spotting* (*ls*) περιοχή -χωρίς όμως να έχει δείχτει λειτουργική

σύνδεση-, μια περιοχή της οποίας η έλλειψη δίνει θνησιγόνο φαινότυπο (4). Πιθανά λοιπόν ο φαινότυπος αυτός σχετίζεται με την έλλειψη του γονιδίου του HNF-4, ειδικά αν την συσχετίσουμε με τη γονιδιακή εξάλειψη του HNF-4 η οποία δίνει επίσης θνησιγόνο φαινότυπο (26).

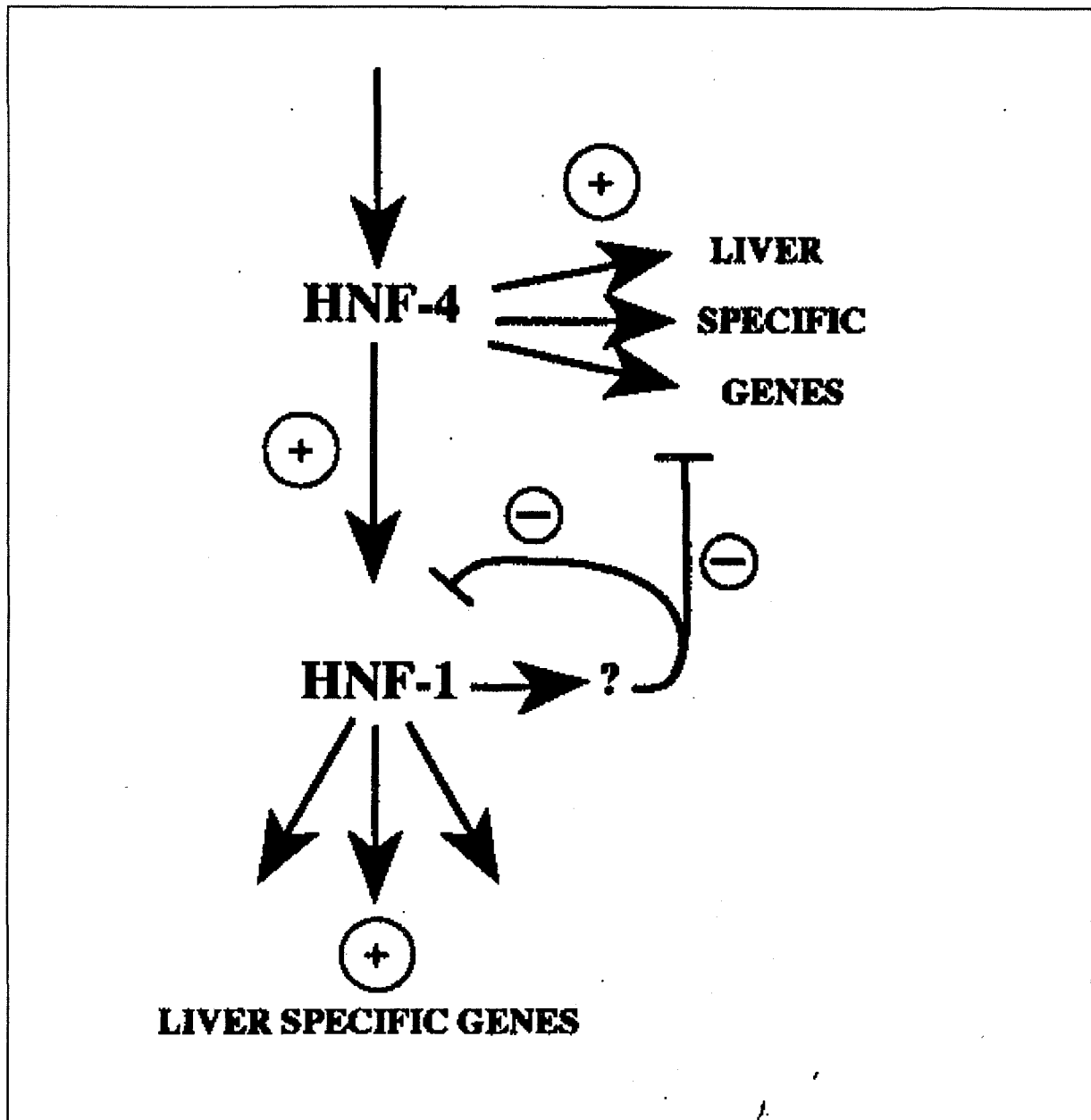
Το γονίδιο του HNF-4 παρουσιάζει κάποιες ιδιομορφίες στους οργανισμούς, όπου έχει κλωνοποιηθεί. Το γονίδιο εκτείνεται στις 30kb και αποτελείται από 12 εξόνια (145, 166). Το ασυνήθιστο σ' αυτό το γονίδιο είναι ότι οι δύο δάκτυλοι ψευδαργύρου κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά εξόνια. Επίσης ο υποκινητής του δεν περιλαμβάνει TATA-box. Ο HNF-4 είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση μιας πλειάδας γονιδίων (**ΠΙΝΑΚΑΣ 2**) που εμπλέκονται σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, που οδηγούν το κύτταρο σε αντίθετα μεταβολικά στάδια. Για παράδειγμα, ο HNF-4 επάγει την έκφραση αφενός μεν της ApoAΙ (απολιποπρωτεΐνη ΑΙ), που είναι βασικό συστατικό της HDL (high density lipoprotein) η οποία με τη σειρά της προφυλάσσει τον οργανισμό από την αρτηριοσκλήρυνση, και αφετέρου την ApoB, που συμμετέχει στο σχηματισμό της LDL προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από την ασθένεια αυτή (71, 72, 94, 95, 108). Μια ανάλογη κι ακόμα πιο πολύπλοκη περίπτωση είναι αυτή της θετικής ρύθμισης των γονιδίων PEPCK και L-PK που έχουν αντίθετο ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης: η PEPCK συμμετέχει στο μονοπάτι σύνθεσης της ενώ η L-PK στο μονοπάτι καταβολισμού της. Το νήμα ξετυλίγεται κάπως αν σκεφτούμε ότι ο HNF-4 απαιτείται για την απόκριση αυτών των γονιδίων σε ινσουλίνη και γλουκαγόνο, ορμόνες που δρουν αντίθετα στην έκφραση των PEPCK και L-PK. Η παρουσία γλουκαγόνου οδηγεί σε υψηλά επίπεδα PEPCK και χαμηλά L-PK που με τη σειρά τους οδηγούν σε αυξημένη γλυκόζη. Αντίθετα, αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης οδηγούν σε μειωμένη PEPCK και αυξημένη L-PK και κατά συνέπεια χαμηλά επίπεδα γλυκόζης (136). Δεν είναι ακόμα γνωστό πώς ο HNF-4 κάνει τα γονίδια να αποκριθούν στις ορμόνες. Είναι πιθανό να απαιτείται η αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες που τροποποιούνται (άμεσα ή έμμεσα) από την ινσουλίνη και το γλουκαγόνο, χωρίς να αποκλείεται και το ενδεχόμενο ο ίδιος ο HNF-4 να υφίσταται τέτοιου είδους τροποποιήσεις.

Η μεταβολική κατάσταση ενός κυττάρου είναι ένα πολυπαραγοντικό σύστημα στο οποίο συμμετέχει ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων και το αποτέλεσμα της δράσης τους καθορίζεται από πολλές συνιστώσες, όπως οι σχετικές ενδοκυτταρικές τους συγκεντρώσεις και τα σήματα στα οποία απαντά ο καθένας. Παρατηρήσεις και

ερωτήματα, όπως αυτά που αναφέραμε παραπάνω, έχουν στρέψει την έρευνα στη μελέτη της ρύθμισης -μεταγραφικής και μετα-μεταγραφικής- των παραγόντων αυτών καθώς και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων.

Ο HNF-4, λοιπόν, βρέθηκε να κατέχει μια εξέχουσα θέση στη μελέτη της ρύθμισης των γονιδίων που καθορίζουν τον ηπατικό φαινότυπο μια και εκτός της πλειάδας των γονιδίων-στόχων του που είναι αναγκαία για την ηπατική λειτουργία, το 1993, χαρακτηρίστηκε από τους Kuo et al. ως ο κύριος μεταγραφικός ρυθμιστής του HNF-1 (70, 148, 66). Η διαπίστωση αυτή περιέπλεξε το σενάριο για την ηπατοειδική έκφραση κανοντάς το ταυτόχρονα ακόμα πιο ενδιαφέρον και τοποθέτησε τον HNF-4 στην κορυφή της ιεραρχίας δικτύων στα κύτταρα του ήπατος. Η ανακάλυψη αυτή δηλαδή, καθιστά τον HNF-4 έμμεσο μεταγραφικό ρυθμιστή των HNF-1 εξαρτώμενων γονιδίων, όπως φαίνεται στο **ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1**. Τα φώτα της δημοσιότητας στράφηκαν λοιπόν πάνω στον HNF-4 κι ο εξέχων ρόλος του μας διέγειρε την περιέργεια για μελέτη της μεταγραφικής του ρύθμισης, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις οποίες πιθανά υπόκειται και στη δυνατότητά του να αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς ή μη παράγοντες. Τέλος, το ερώτημα αν ο HNF-4 έχει προσδέτη και τι ρόλο θα μπορούσε να παίζει στη δράση του, κεντρίζει πάντα το ενδιαφέρον των ερευνητών.

Στα κεφάλαια που ακολουθούν, ασχολούμαστε με τη διερεύνηση των πιθανών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων του HNF-4 με την ικανότητά του να ρυθμίζει ένα από τα γονίδια-στόχους του (αυτό της απολιποπρωτεΐνης AIV) σε συνεργασία με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδέονται στον ενισχυτή του γονιδίου και τέλος, με τη δυνατότητά του να αλληλεπιδρά με δύο άλλους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον HNF-1 και τους COUP-TFs. Θα δούμε ότι τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις τροποποιούν τη δράση του θετικά ή αρνητικά δίνοντας το χαρακτηρισμό μάλλον του πλέγματος κι όχι της αλυσίδας μεταγραφικών ρυθμίσεων στο μοντέλο του ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 1.



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1

ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	«ΟΡΦΑΝΟΣ» ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΣΤΗ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑ
GR, MR, ER, AR, PR	COUP-TF I, II	D HNF4, E75A
TRα	M HNF4, M TLL	FTZ-F1, KNI, KNRL
RAR α, β, γ	PPAR, EAR1, EAR2	USP, SVP, DTLL
RXR α, β, γ	ERR1, ERR2	EcR
VDR	NGFI-B, SF-	

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ορμονικοί υποδοχείς

ΡΥΘΜΙΖΕΙ...	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ-ΣΤΟΧΟΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ & ΡΕΤΙΝΟΛΗΣ		
H apoCIII -67/-85	CGCTGGGCCAAAGGTCACCT	Sladek et al. 1990
H apoAI -195/-213	GCAGGGGTCAAGGGTTCAG	Hardon et al. 1988
R apoAI -117/-132	TAGAGTTCAAGGATCA	Chan et al. 1993
R apoAII -718/-736	ACCAGGGTAAAGGTTGAAG	Ladias et al. 1992
R apoB -63/-81	AAAGGTCCAAAGGGCGCCT	Metzger et al. 1993
M CRBP II -59/-77	ACAGAGTCAAAGGTCATAA	Nakshatri et al. 1994
R CRBP II -59/-77	ACAGAGTCAAAGGTCATAA	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		
H factor IX -42/-58	TTGTACCAAAGTACAAG	Reijnen et al. 1992
H factor VII -52/-68	GACGGGCAAAGTTCTCT	Hung et al. 1993
H factor X -45/-61	CTGGAGCAAAGTCCACG	Miao et al. 1992
ΆΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ		
H transferrin -71/-53	GGGAGGTCAAAGATTGCGC	Schaffner et al. 1993
H EPO 3499/3481	GGTAGGTGAGAGGTCAGA	Blanchard et al. 1992
M TTR -154/-136	CTAGGCAAGGTTCAATTT	Sladek et al. 1990
H α1-AT -106/-124	ACAGGGGCTAAGTCCACTG	Hardon et al. 1988
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ & ΣΤΕΡΟΪΔΩΝ		
H MCAD -326/-308	CTCCGGGTAAGGTGAAGG	Carter et al. 1993
R Fabpi -85/-69	AAGTTCAAAGTTCAAGA	Rottman & Gordon 1993
R Fabpi -447/-432	AGGTTCAAAGTGCACA	Rottman & Gordon 1993
R ACO -555/-573	ACCAGGAGAAAGGTCACGT	Tugwood et al. 1992
Rab Cyp4A6 -741/-725	GTAGGACAAAGGCCAGG	Muerhoff et al. 1992
Rab Cyp4A6 -24/-6	ACTTGGGCAAGGGTCAGTG	Muerhoff et al. 1992
R Cyp4A1 -24/-6	ATTTAGGCAAGAGGCAGAA	Muerhoff et al. 1992
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ		
R TAT -3583/-3601	TACAGATCAAAGAGCAGCA	Nitsch et al. 1993
R OTC -115/-97	TTAGGCTTAAAGTTCAAGT	Kimura et al. 1993
R OTC -15/-33	AGGGGATCAAAGGTCCTCA	Kimura et al. 1993
R OTC (enh) 98/80	AAAGGTTAAAGTTTCATCT	Nishiyori et al. 1994
R OTC (enh) 183/164	TAGAGTTTCAAGGTTAAGC	Nishiyori et al. 1994
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ		
R PEPCK -436/-454	TACAGATCAAAGATCAGCA	Hall et al. 1992
R L-PK -127/-145	TGGGGGCCAGAGTCCAGGA	Diaz-Guerra et al. 1993
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΚΩΤΙΟΥ		
M HNF-1 -107/-89	GCAAGGCTGAAGTCCAAAG	Kuo et al. 1993
Xn LFB1 -270/-252	TGGGGTCCAAAGTTCAGTA	Zapp et al. 1993
ΙΟΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β		
H HBV enh I GB element	AACGGGGTAAAGGTTTCAGT	Garcia et al. 1993
H HBV enh II -1679/-1664	GAGTCCAAAGATCCCTC	Guo et al. 1993

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: HNF-4 εξαρτώμενα γονίδια

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα **χημικά αντιδραστήρια** που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής τα προμηθευτήκαμε από τις εταιρίες: SIGMA, MERCK, PROMEGA, NEW ENGLAND BIOLABS, UBI, BOEHRINGER MANNHEIM, BRL, BIORAD, ALDRICH, PHARMACIA, SANTA CRUZ, UNITED STATES BIOCHEMICALS, STRATAGENE, QIAGEN, RENNER GMBH.

Τα **ένζυμα** που χρησιμοποιήσαμε ήταν παρασκευής NEW ENGLAND BIOLABS, PROMEGA, MINOTECH.

Τα **αντισώματα** που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών ICN, PIERCE, SANTA CRUZ, UPI, JACSON, εκτός από αυτά στα οποία αναφέρεται ότι ήταν προσφορά κάποιων συνεργατών μας.

Τα **συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια** που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του IMBB.

Τα **σημασμένα νουκλεοτίδια** που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ραδιοσημασμένων ανιχνευτών και το αντιδραστήριο της [¹⁴C]-χλωραμφενικόλης ήταν παραγωγής AMERSHAM, ICN.

Τα **θρεπτικά μέσα καλλιέργειας (LB, NZCYM) για τα βακτηριακά στελέχη** που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al. τόσο στη στερεά όσο και στην υγρή μορφή τους. Ανάλογα με την κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των εν λόγω βακτηριακών στελεχών, έγινε και η προσθήκη σε κατάλληλες συγκεντρώσεις των απαιτούμενων αντιβιοτικών (καναμικίνη, τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη).

Τα **βακτηριακά στελέχη** που χρησιμοποιήθηκαν ήταν E. coli (DH5a) για τις περισσότερες κλωνοποιήσεις και συγκεκριμένα JM109 για την έκφραση κάποιων πρωτεϊνών. Οι γονότυποι των στελεχών αυτών αναφέρονται στους Sambrook et al.

Το **θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήσαμε για την καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών** ήταν DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) παραγωγής GIBCO, εμπλουτισμένο με μερικά απενεργοποιημένο ορό εμβρύου βοός σε περιεκτικότητα τέτοια που απαιτεί κάθε κυτταρική σειρά. Όπου αναφέρεται, το

θρεπτικό μέσο δεν περιείχε μεθειονίνη ή φώσφορο (σε πειράματα ex vivo σήμανσης πρωτεϊνών).

Οι **ευκαρυωτικές σειρές** που χρησιμοποιήθηκαν ήταν HepG2, HeLa, Cos1, Caco2. Προμηθεύτρια εταιρία ήταν η American Type Culture Collection (ATCC) (**ΠΙΝΑΚΑΣ 3**).

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
CaCo2	Άνθρωπος, αδενοκαρκίνωμα στο κόλον	Επιθηλιακού τύπου
COS1	Νεφρικά κύτταρα πιθήκου	Μετασχηματισμένα από SV40, τύπου ινοβλαστών
HeLa S3	Άνθρωπος, επιθηλιακό καρκίνωμα μήτρας	Επιθηλιακού τύπου
HepG2	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που ακολουθούν.



ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

A. Σε μικρή κλίμακα (small scale DNA preparation)

Ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al (126). Το πλασμιδιακό DNA που απομονώνεται με τη μέθοδο αυτή επιτρέπει, λόγω της υψηλής του καθαρότητας, την περαιτέρω μελέτη του με τη χρήση διαγνωστικών περιοριστικών ενζύμων και την ταυτοποίηση της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του.

B. Σε μεγάλη κλίμακα (large scale DNA preparation)

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλες ποσότητες, υψηλής καθαρότητας αλλά και εμπλουτισμένο (90-95 %) στην υπερελικωμένη μορφή του ακολουθήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι αλκαλικής λύσης ακολουθούμενης από:

- ◆ δύο διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις διαβάθμισης χλωριούχου καισίου και δύο δωδεκάωρες αφαλατώσεις όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al (126).
- ◆ τη χρήση κολώνας QIAGEN tip 500 και σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΚΟΜΜΑΤΙΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για να έχουμε όσο το δυνατόν λιγότερες απώλειες στην ποσότητα και ταυτόχρονα υψηλή καθαρότητα στο DNA που απομονώσαμε από πήκτωμα αγαρόζης, χρησιμοποιήθηκαν ενεργοποιημένες μεμβράνες DEAE. Η διαδικασία ενεργοποίησης των μεμβρανών καθώς και ο τρόπος χρήσης τους περιγράφονται αναλυτικά από τους Sambrook et al (126).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Τα προϊόντα της οργανικής σύνθεσης ολιγο-δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (Τμήμα Μικροχημείας IMBB) υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 20% για την απομόνωση ολιγονουκλεοτιδίων με μέγιστο μήκος. Το

επιθυμητό προϊόν σύνθεσης απομονώθηκε στη συνέχεια από το πήκτωμα ακρυλαμίδης με τη διαδικασία ηλεκτροέκλουσης σε ειδική συσκευή (elutrap της S&S) και με τη χρήση κατάλληλων μεμβρανών(S&S).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Ακολουθήθηκε η μέθοδος της όξινης-θερμής φαινόλης (126). Για τον εμπλουτισμό του προϊόντος σε poly-A RNA ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά από τους Sambrook et al (126).

ΣΗΜΑΝΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

A). ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΟΛΥΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ T4.

Η μέθοδος αυτή (Sambrook et al ,126) χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση μονόκλωνων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είτε σε πειράματα παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης είτε ως εκκινητές σε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR).

B). ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (random priming)

Η μέθοδος αυτή (Sambrook et al, 126) χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση κομματιών DNA με υψηλή ειδική ενεργότητα (10^9 cpm/μgr) με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους ως ανιχνευτές σε αναλύσεις Northern.

Γ). ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΔΙΚΛΩΝΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΜΕ SEQUENASE (DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ T7).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές σε πειράματα μεταβολής της κινητικότητας του DNA λόγω της αλληλεπίδρασης του με πρωτεΐνες (EMSA) (126).

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Οι υβριδοποιήσεις στις αναλύσεις Northern έγιναν με τη χρήση Denhardt's όπως αυτή περιγράφεται αναλυτικά στους Sambrook et al (126).

ΧΡΗΣΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ (κινάσες, λινάσες, εξωνουκλεάσες, περιοριστικές ενδονουκλεάσες, πολυμεράσες)

Η χρήση των παραπάνω ενζύμων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (New England Biolabs, Promega, Minotech), παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος και στη θερμοκρασία και χρονική διάρκεια που προβλέπεται για το καθένα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ (sequencing reactions)

Χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση ως μήτρες οι αντίστοιχες κατασκευές που περιείχαν το προς εξέταση κομμάτι και οι αντιδράσεις τερματισμού της επιμήκυνσης της αλυσίδας έγιναν παρουσία α[³⁵S] dATP, κατάλληλων εκκινήτων (primers), των αντίστοιχων διδεόξυ-νουκλεοτιδίων (A,C,G,T) και του ενζύμου sequenase. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες των κατασκευαστών (USB: sequenase TM kit, version 2.0).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΙΚΑΝΩΝ ΝΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΖΟΝΤΑΙ – ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (competent cells)

Αποστειρώσαμε σε φιάλη των δύο λίτρων 125 ml θρεπτικού μέσου SOB (Sambrook et al, 126). Μολύναμε το μέσο καλλιέργειας με 1-2 αποικίες από πιάτο στο οποίο καλλιεργήσαμε το βακτηριακό στέλεχος που μας ενδιαφέρει. Αφήσαμε τα κύτταρα να αναπτυχθούν στους 25°C υπό έντονη ανάδευση για περίπου 20-25 ώρες. Όταν η O.D.₆₀₀ έφτασε στα 0.35-0.40 σταματήσαμε την ανάπτυξη των κυττάρων τοποθετώντας τη φλάσκα στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C. Επαναδιαλύσαμε τα κύτταρα σε 40ml διαλύματος A που παρασκευάσαμε την ίδια μέρα (10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl και αφού του

ρυθμίσαμε το pH στο 6.7 με KOH προσθέσαμε $MnCl_2$ μέχρι τελική συγκέντρωση 55 mM). Επώασαμε για 10 λεπτά στον πάγο και ακολούθησε φυγοκέντρωση όπως προηγουμένως. Επαναδιαλύσαμε το βακτηριακό ίζημα σε 10 ml του διαλύματος A και προσθέσαμε στάγδην DMSO μέχρι τελική συγκέντρωση 7%. Χωρίσαμε τα κύτταρα σε μικρές ποσότητες (aliquots) και τα παγώσαμε στους $-80^{\circ}C$ όπου και διατηρήθηκαν μέχρι να τα χρησιμοποιήσουμε.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

Ξεπαγώσαμε 200 ml competent κυττάρων από το στέλεχος που μας ενδιαφέρει από τους $-80^{\circ}C$ στον πάγο. Προσθέσαμε την κατάλληλη ποσότητα DNA (συνήθως 5-7 ml από τα 20 ml του μίγματος συρραφής) και επώασαμε στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 800 ml θρεπτικού μέσου SOC (Sambrook et al) και επώαση υπό ανάδευση στους $37^{\circ}C$ για μία ώρα. Στη συνέχεια επιστρώσαμε το δείγμα σε πιάτα με στερεό θρεπτικό μέσο LB το οποίο περιείχε κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας που περιλαμβάνει ο φορέας στον οποίο είχε γίνει η κλωνοποίηση. Επώασαμε τα πιάτα στους $37^{\circ}C$ για 16 ώρες περίπου προκειμένου να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΛΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ (whole cell extracts) ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Μετά από 2-3 ξεπλύματα με 1xPBS τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε διάλυμα που περιείχε 40 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA pH8.0, 20 % γλυκερόλη, 1 mM KCl, 2 mM DTT, 0.5 % NP-40, 0.1 M PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml leupeptin. Στα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διερεύνησης της φωσφορυλίωσης του HNF-4 συμπεριλήφθηκε και 1mM Na_3VO_4 . Ακολούθησαν τρεις εναλλαγές ψύξης ($-80^{\circ}C$) και θέρμανσης ($37^{\circ}C$) που είχαν σαν αποτέλεσμα τη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε σε υψηλές στροφές (14.000 rpm) για 5min στους $4^{\circ}C$ έτσι ώστε να απομακρυνθούν τόσο οι μεμβρανικοί

σχηματισμοί, όσο και το γενωμικό DNA. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα διαμοιράστηκαν σε μικρές ποσότητες (aliquots) και φυλάχτηκαν στους -80 °C.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Τα πυρηνικά εκχυλίσματα από σκώπι αρουραίου παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται από τους Lichsteiner et al (81). Σε όλα τα διαλύματα προσθέσαμε αναστολείς πρωτεασών στις κατάλληλες συγκεντρώσεις: 0.1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotonin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml leupeptin.

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ DNA-ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

A). ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ DNA ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια σημάνθηκαν με τη βοήθεια της πολυμεράσης T7 (sequenase) παρουσία [α - 32 P]dATP και [α - 32 P]dCTP και απαλλάχτηκαν από την περίσσεια ισότοπου με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε κολώνες Sephadex G-50.

Οι αντιδράσεις πρόσδεσης έγιναν για 20 λεπτά στον πάγο σε 15 µl τελικό όγκο που περιείχε 20 mM HEPES pH7.9, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 4 mM spermidine, 0.02 mM Zn-acetate, 0.1 µg/ml BSA, 10 % γλυκερόλη, 0.5 mM DTT, 2 µg/ml poly (dIdC) και 5-10 µg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (Bradford, 12). Όπου αναφέρεται, χρησιμοποιήθηκε ως ανταγωνιστής για τη δημιουργία του συμπλόκου κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο μη σημασμένο σε 100x περίσσεια. Επίσης, σε περιπτώσεις που θέλαμε να ταυτοποιήσουμε την πρωτεΐνη που αλληλεπιδρούσε με το συγκεκριμένο ανιχνευτή, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με το αντίστοιχο αντίσωμα πριν την αντίδραση πρόσδεσης.

Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-ανιχνευτή (bound) διαχωρίστηκε από τον ελεύθερο ανιχνευτή (free) σε 4 % πήκτωμα ακρυλαμίδης στους 4°C. Ακολούθησε σταθεροποίηση των συμπλόκων με την επίδραση διαλύματος (50 % μεθανόλη-10 % οξικό οξύ) στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για περίπου 10 λεπτά.

B). ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΛΟΓΩ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ (methylation interference)

Οι δύο αλυσίδες των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ραδιοσημάνθηκαν χωριστά με πολυνουκλεοτιδική κινάση T4 με τη χρήση [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP. Κάθε ραδιοσημασμένη αλυσίδα υβριδοποιήθηκε με ισομοριακή ποσότητα μη σημασμένης συμπληρωματικής αλυσίδας. Η αντίδραση μεθυλίωσης έγινε, παρουσία 0.5 % dimethyl-sulfate σε 50 mM Na-cacodylate pH8.0, 1 mM EDTA, σε θερμοκρασία δωματίου, για 3 λεπτά. Ακολούθησαν οι αντιδράσεις πρόσδεσης με τα αντίστοιχα κυτταρικά εκχυλίσματα και ηλεκτροφόρηση σε 4% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Μετά από αυτοραδιογραφία απομονώθηκαν από το πήκτωμα οι ζώνες που αντιστοιχούσαν τόσο στο σύμπλοκο DNA-πρωτεΐνης, όσο και στον ελεύθερο ανιχνευτή. Το DNA ηλεκτροεκλούστηκε και κόπηκε με 1 M πιπεριδίνη στους 90°C για 30 λεπτά. Τα δείγματα αφού στέγνωσαν, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 15% - 8 M ουρίας.

Γ. ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΑΝΩ ΣΕ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ DNaseI (DNaseI footprinting analysis).

Οι αντιδράσεις πρόσδεσης έγιναν σε τελικό όγκο 20 μl παρουσία 25 mM HEPES pH7.9, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.02 mM Zn-acetate, 0.5 mM DTT, 10% γλυκερόλη, 1.5 μg poly(dIdC), 0.5 ng σημασμένου ανιχνευτή και παρουσία διαφόρων ποσοτήτων κυτταρικών εκχυλισμάτων από συκώτι αρουραίου. Μετά από επώαση 60 λεπτών στον πάγο, επιδράσαμε για 5 λεπτά με 2.5 μl πρόσφατα διαλυμένη σε 25 mM CaCl_2 DNaseI (σε τελική συγκέντρωση 40-160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ανάλογα με την ποσότητα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που συμπεριλήφθηκε στην αντίδραση). Η αντίδραση πέψης με DNaseI σταμάτησε με την προσθήκη 5 μl διαλύματος που περιείχε 125 mM Tris-HCl pH8.0, 125 mM EDTA και 3% SDS. Στη συνέχεια έγινε πέψη της DNaseI με 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ πρωτεΐνάσης K στους 65°C για 20 λεπτά. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη παρουσία 5 μg tRNA. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% - 8M ουρία. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το προϊόν των G+A αντιδράσεων κατά Maxam & Gilbert.

Δ.) ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ IN VITRO ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (IN VITRO TRANSCRIPTION)

100-200 ng από την υπό τον έλεγχο μήτρα, εμπλουτίστηκαν με 30 ng DNA από σπέρμα σολομού και επώαστηκαν με 50 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από συκώτι αρουραίου παρουσία 25 mM HEPES pH7.9, 6 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 35 units από Rnasin, 0.5 mM DTT, 0.1 mM 3'-O-methyl-GTP, 0.6 mM ATP & CTP, 0.03 mM UTP, 7 μCi [³²P]UTP (3000 Ci/mmol) και 10% γλυκερόλη όπου αναφέρεται, στις αντιδράσεις συμπεριλήφθηκαν και 100 ng δίκλωνου συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου-ανταγωνιστή (μη ραδιοσημασμένου). Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στους 30°C για 45 λεπτά και σταμάτησαν με την προσθήκη 2.5 μl [6% SDS, 250 mM EDTA pH8.0, 250 mM Tris-HCl pH8.0] και 2.5 μl από 16 mg/ml πρωτεϊνάση K και 0.5 mg/ml tRNA. Η πέψη έγινε για 20 λεπτά στους 65°C. Ακολούθησαν τρεις εκχυλίσεις με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε πολυακρυλαμίδα 6% / 8M ουρία.

Ε.) IN VITRO ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (IN VITRO PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS)

Η έκφραση των πρωτεϊνών από φορείς έκφρασης GST έγινε στο βακτηριακό στέλεχος JM109, όπως περιγράφεται από τους Smith & Johnson ,1988 (137). Τα διάφορα μεταλλάγματα της HNF-4 από τις αντίστοιχες κατασκευές σε Bluescript KS (Stratagene), παράχθηκαν και ραδιοσημάνθηκαν από το σύστημα TNT της Promega σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. 2 μg από κάθε μετάλλαγμα της HNF-4, προσκολλημένο σε GST, φορτώθηκε σε κολώνα Glutathione-Sepharose (Pharmacia), η οποία είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με 0.5 % BSA/PBS. Στη συνέχεια, κάθε κολώνα ξεπλύθηκε τρεις φορές με PBS και τρεις φορές με ειδικό διάλυμα A που περιείχε 100 mM KCl, 20 mM HEPES pH7.9, 0.1 % NP-40, 5 mM MgCl₂, 0.2 % BSA, 10 % γλυκερόλη, 0.1 M PMSF, 10 μg/ml aprotinin και ακολούθησε η αντίδραση αλληλεπίδρασης στους 4°C για 1.5 ώρες υπό συνεχή ανακίνηση (rotation). Μετά από εκτεταμένο ξέπλυμα της κολώνας με το διάλυμα έκπλυσης A, την επαναδιαλύσαμε σε 20 μl SDS loading buffer και αναλύσαμε τα δείγματα σε SDS πήκτωμα ακρυλαμίδης.

ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ (cell culture and transient transfection experiments)

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο MEM, τροποποιημένο από τον Dulbecco, με περιεκτικότητα σε ορό τέτοια που απαιτεί κάθε κυτταρική σειρά (10 % για τις σειρές Cos-1, HepG2, HeLa και 20 % για την Caco2). Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 60-70 % του πιάτου καλλιέργειάς τους, θεωρήσαμε ότι ήταν έτοιμα για δοκιμές παροδικής διαμόλυνσης (transient transfections).

Ακολουθήσαμε δύο μεθόδους παροδικής διαμόλυνσης:

- ♦ Όταν ο σκοπός της δοκιμής παροδικής διαμόλυνσης ήταν ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου CAT (45), διαμόλυναμε τα κύτταρα με διάφορες ποσότητες DNA από τις υπό έλεγχο κατασκευές με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης με φωσφορικό ασβέστιο όπως περιγράφεται από τους Graham et al, (46). Παράλληλα, 3μg από το πλασμίδιο RSV-βgal συγκατακρημνίστηκαν σε όλα τα πειράματα με τις υπό έλεγχο κατασκευές για τον έλεγχο της αποδοτικότητας (efficiency) της επιμόλυνσης (37).

Η ίδια μέθοδος ακολουθήθηκε και για την κατασκευή κάποιων ολικών κυτταρικών και πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

- ♦ Όταν ο σκοπός της δοκιμής παροδικής διαμόλυνσης ήταν ο ανοσοεντοπισμός πρωτεϊνών *in situ*, ακολουθήθηκε η μέθοδος συγκατακρήμνισης με DEAE-Dextran, όπως περιγράφεται από τους Ktistaki et al 1995 (68).

Η ίδια μέθοδος ακολουθήθηκε και για την παρασκευή κάποιων κυτταρικών εκχυλισμάτων με κατάλληλη τροποποίηση των ποσοτήτων του DNA, του DEAE-Dextran και της χλωροκουίνης.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CAT ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ (β-GAL & CAT ASSAYS)

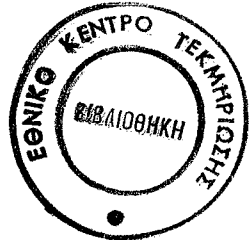
48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, ξεπλύναμε τα κύτταρα τρεις φορές με 1xPBS και τα συλλέξαμε σε διάλυμα [40 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0 και 150 mM NaCl]. Η ενεργότητα του ενζύμου CAT (ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης) προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται από τους Graham and Van Der Erb, (46). Οι ποσότητες του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν και οι χρόνοι

επώασης, επιλέχθηκαν κατά περίπτωση βάση της τιτλοδότησης και της καμπύλης κινητικότητας του ενζύμου έτσι ώστε οι μετρήσεις μας να κινούνται πάντα στη γραμμική φάση.

Η ενεργότητα του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης στα κυτταρικά εκχυλίσματα – κύριος παράγοντας της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων μας- προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται από τους Edlund, T. W. et al., (37).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΕΜΜΕΣΟΥ IN SITU (IN SITU INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE)

Μια μέρα μετά τη διαμόλυνσή τους, με την κατασκευή που εκφράζει την υπό έλεγχο πρωτεΐνη, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες (cover slips) και συνεχίστηκε η επώασή τους στον CO₂ επωαστήρα. Μετά από 24 ώρες, ξεπλύναμε τις καλυπτρίδες δύο φορές με 1xPBS και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν (fixing) πάνω στις καλυπτρίδες με την επίδραση κρύας (-20°C) μεθανόλης για 5-10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε σύντομο ξέπλυμα με 1xPBS και επώαση σε διάλυμα που περιείχε 1 %BSA σε 1xPBS σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, επιδράσαμε με κατάλληλη αραιώση του πρώτου αντισώματος σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά (ή στους 37°C για κάποια αντισώματα). Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με τρεις διαδοχικές πεντάλεπτες πλύσεις σε 1 %BSA σε 1xPBS. Ακολούθησε επώαση με 1/100 αραιώση του fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit ή anti-mouse δεύτερου αντισώματος στο IgG (GaM-FITC ή GaR-FITC ανάλογα με το ποιό ήταν το πρώτο αντισώμα), σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν τρεις φορές από 5 λεπτά με 1xPBS και μια φορά με ddH₂O. Τέλος οι καλυπτρίδες αναστράφηκαν πάνω σε μια σταγόνα Mowiol (Polyscience) πάνω σε αντικειμενοφόρο. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε Leitz Dialux 20 EB μικροσκόπιο εφοδιασμένο με ενσωματωμένη φωτογραφική μηχανή για τη φωτογράφιση δειγμάτων φθορισμού.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ (ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΟΚΚΩΝ ΧΡΥΣΟΥ) ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

5×10^7 κύτταρα HepG2 και 5×10^7 κύτταρα HepG2 τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία genistein, κατακρημνίστηκαν και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν για 1 ώρα παρουσία 4% φορμαλδεΐδης και εγκλείστηκαν σε LR White Resin (Polyscience) για στους 50°C 24 ώρες χωρίς επιταχυντή (accelerator). Λεπτές τομές (~50 nm) από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε πλέγμα νικελίου και επιδράσαμε με anti-HNF-4 σε 1:1000 αραιώση στους 4°C, σε BSA/PBS για ~16 ώρες. Μετά το ξέπλυμα επιδράσαμε με gold-conjugated goat anti-rabbit ως δεύτερο αντίσωμα (μέγεθος κόκκων 10 και 20 nm) σε αραιώση 1:10, σε θερμοκρασία δωματίου, για μία ώρα. Ακολούθησε απομάκρυνση της περίσσειας του δεύτερου αντισώματος με εκτενές ξέπλυμα και στη συνέχεια χρώση των δειγμάτων με 1% uranyl acetate για 10 λεπτά. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των δειγμάτων έγινε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης JEOL100C στα 100kV.

IN VIVO ΣΗΜΑΝΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (METABOLIC LABELING) ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥΣ

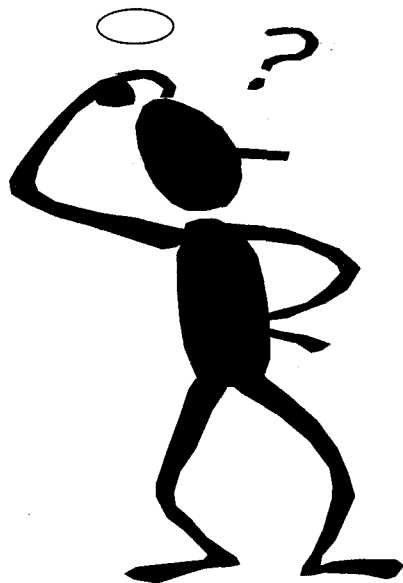
Επώασαμε μονόστρωμες καλλιέργειες HepG2 κυττάρων και Cos1 κυττάρων διαμολυσμένων με pCBHNF4 με [32 P] ορθοφωσφορικό ή [35 S] μεθειονίνη για 2 ώρες σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM JEOL100C, που δεν περιείχε φώσφορο ή μεθειονίνη αντίστοιχα. Όπου αναφέρεται, η επώαση έγινε παρουσία του φαρμάκου genistein (Upstate Biotechnology) σε τελική συγκέντρωση 15μg/ml. Μετά τη δίκωρη επώαση, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα [50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % NP-40, 10 % glycerol, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 0.1 mM PMSF, 10 μg/ml aprotinin]. Μετά τη λύση των κυττάρων με το παραπάνω διάλυμα, επιδράσαμε με protein A Sepharose (Pharmacia) και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με anti-HNF-4. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΩΝ

HepG2 κύτταρα και Cos1 κύτταρα επιμολυσμένα με pCBHNF4 επώαστηκαν παρουσία και απουσία του φαρμάκου genistein για 48 ώρες, σε τελική συγκέντρωση 15 µg/ml. Αφού λύθηκαν, όπως παραπάνω, ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση του HNF-4. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE και ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά τους (electrotransfer) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Schleider & Schuell). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με 0.5 µg/ml horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine (PY-20 της ICN). Η ικανότητα πρόσδεσης του αντισώματος (που αντικατοπτρίζει την ύπαρξη ή όχι φωσφορυλιωμένων τυροσινών) διερευνήθηκε με την επίδραση enhanced chemiluminescence (ECL της Amersham), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

**ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑρΟΑΙΝ ΑΠΟ ΤΗ
ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΗΝF-4 ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΕΝΕΤΑΙ
ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΗΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ
ΠΡΟΣΔΕΝΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΕΝΙΣΧΥΤΗ ΤΗΣ.**



ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι απολιποπρωτεΐνες είναι σύνθετα μακρομοριακά σύμπλοκα λιπιδίων και πρωτεϊνών που προέρχονται κυρίως από το ήπαρ και από το έντερο και ρόλος τους είναι η μεταφορά και η ανακατανομή των λιπιδίων στο σώμα με την κυκλοφορία του αίματος. Οι λιποπρωτεΐνες που κυκλοφορούν στο πλάσμα, είναι σφαιρικά σωματίδια τα οποία αποτελούνται από τον πυρήνα, ένα μη-πολικό ουδέτερο λιπίδιο χημικής σύστασης εστέρα χοληστερίνης με τριγλυκερίδιο και περίβλημα από πολικές ενώσεις όπως φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και πρωτεΐνες (141, 142). Οι ειδικές αυτές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δόμηση των απολιποπρωτεϊνών ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες: ApoAI, ApoAII, ApoAIV, ApoB, ApoCI, ApoCII, ApoCIII, ApoD, ApoE. Στον **ΠΙΝΑΚΑ 3** (57, 58, 44, 140) συνοψίζονται κάποια στοιχεία για τη δομή, λειτουργία, ιδιότητες και τόπο σύνθεσης των απολιποπρωτεϊνών.

Οι λιποπρωτεΐνες που συνήθως συναντάμε στο πλάσμα χωρίζονται στις κατηγορίες:

- Χυλομικρά.
- Λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low density lipoproteins, VLDL).
- Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (low density lipoproteins, LDL).
- Λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (high density lipoproteins, HDL).
- Λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (intermediate density lipoproteins, IDL).
- Σωματίδια λιποπρωτεϊνών (lipoprotein particles, LP).

Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών είναι ένα σύνθετο μεταβολικό μονοπάτι με πολλά διακριτά στάδια:

- ✿ Σύνθεση απολιποπρωτεϊνών.
- ✿ Ενδοκυτταρικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις απολιποπρωτεϊνών (π.χ. φωσφορύλιωση, γλυκοζυλίωση).
- ✿ Συγκρότηση λιποπρωτεϊνών.
- ✿ Έκκριση απολιποπρωτεϊνών και λιποπρωτεϊνών.
- ✿ Εξωκυτταρικές τροποποιήσεις απολιποπρωτεϊνών και λιποπρωτεϊνών.
- ✿ Υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων από την πρωτεϊνική λιπάση και την ηπατική λιπάση.

- ✿ Ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από τα κύτταρα στις λιποπρωτεΐνες.
- ✿ Εστεροποίηση της χοληστερόλης των λιποπρωτεϊνών με λεκιθίνη.
- ✿ Ενζυμικά καταλυόμενη ανταλλαγή ή/και μεταφορά των εστέρων της χοληστερίνης και τριγλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων.
- ✿ Ανταλλαγή ή/και μεταφορά των απολιποπρωτεϊνών.
- ✿ Καταβολισμός των λιποπρωτεϊνών επαγόμενος από υποδοχέα.

Το έναυσμα για την εκτενέστερη και σε βάθος μελέτη των λιποπρωτεϊνών ήταν οι πολλές επιδημιολογικές και γενετικές μελέτες, που συσχέτισαν τα επίπεδα κάποιων απολιποπρωτεϊνών και των αντίστοιχων λιποπρωτεϊνών με πολύ σοβαρές ασθένειες όπως αρτηριοσκλήρυνση και στεφανιαία νόσος, στις οποίες αποδίδονται ετησίως οι περισσότεροι θάνατοι, ειδικά στις δυτικές χώρες. Έτσι, πολλές ασθένειες ανάγονται σε διαταραχές του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που με τη σειρά τους μπορεί να είναι το αποτέλεσμα ανωμαλιών στη σύνθεση, τροποποίηση, ή έκκριση κάποιων απολιποπρωτεϊνών ή τέλος ανωμαλιών στον αντίστοιχο υποδοχέα.

ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΙV

Η απολιποπρωτεΐνη ΑΙV (ΑροΑΙV) είναι το βασικό συστατικό της HDL και των χυλομικρών στον αρουραίο. Στον άνθρωπο, η ΑροΑΙV είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 46 kDa που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 11, στην περιοχή 11q13-ter (38, 57, 58). Το mRNA που παράγεται κατά τη μεταγραφή του γονιδίου (2.8 kb) είναι μεγέθους 1.3 kb και οδηγεί στο σχηματισμό 3 εξονίων (58). Η πρωτεΐνη ΑροΑΙV απομονώνεται στο $d > 1.21\text{g/ml}$ κλάσμα του πλάσματος αλλά μικρές ποσότητες της βρίσκονται και στη λέμφο, στα χυλομικρά, στη VLDL και στην HDL (10). Η προβλεπόμενη δομή της από το cDNA (τόσο για την ανθρώπινη όσο και για την αντίστοιχη του αρουραίου) αποκαλύπτει ότι το γονίδιο και η αντίστοιχη πρωτεΐνη περιλαμβάνει κάποιες επαναλαμβανόμενες μονάδες. Έτσι βρέθηκε ότι η ΑροΑΙV περιλαμβάνει 12 επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 22 αμινοξέων, μια επανάληψη μιας ενδεκάδας αμινοξέων, μια επανάληψη μιας ομάδας 19 αμινοξέων και μια έλλειψη 3 αμινοξέων στο αμινοτελικό της άκρο. Όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες απολιποπρωτεΐνες, αυτές οι επαναλήψεις των 22 αμινοξέων διευθετούνται σε σχηματισμό α -έλικας και πιθανά παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεσή της σε λιπίδια (38, 58).

Η σύνθεση της ΑροΑΙV λαμβάνει χώρα κύρια στο έντερο του αρουραίου, του ανθρώπου και πολλών πρωτευόντων. Αντίθετα, στα κουνέλια η σύνθεσή της γίνεται σε συγκρίσιμα επίπεδα στο ήπαρ και στο έντερο (3, 140). Τόσο η μεταγραφή όσο και η μετάφραση της ΑροΑΙV στα θηλαστικά επάγεται από ορμόνες και διάφορους διαιτητικούς παράγοντες και ρυθμίζεται κατά την ανάπτυξη. Η ανθρώπινη ΑροΑΙV προσδένεται σε τριγλυκερίδια με σταθερά διάστασης $K_d = 2.3 \mu\text{M}$ (57, 58).

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ: Η ΑροΑΙV θεωρείται ότι επάγει την ενεργοποίηση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης από την ΑροCII (44). Ένας άλλος σημαντικός της ρόλος είναι η ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT όταν σαν υπόστρωμα χρησιμοποιείται DMPC (44). Σε πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών, η ΑροΑΙV ως σύμπλοκο με λιποσώματα επάγει την εκροή της χοληστερόλης από τα κύτταρα. Πρωτεο-λιποσώματα που περιέχουν ΑροΑΙV, μπορούν να προσδένονται στην επιφάνεια των κυττάρων και στη μεμβράνη των ηπατοκυττάρων. Επίσης, έχει δειχτεί ότι η πρόσδεση της ΑροΑΙV στα αδιποκύτταρα του ποντικού επάγει την εκροή της χοληστερόλης από τα κύτταρα αυτά, σε πειράματα

κυτταροκαλλιιεργειών και έχει προταθεί ότι η ΑροΑΙV καταλαμβάνει στη μεμβράνη τις ίδιες θέσεις με τα σωματίδια LpΑΙ:ΑΙΙ (3).

ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην εργασία αυτή, πρωταρχικός στόχος είναι ο χαρακτηρισμός του υποκινητή του γονιδίου αρoAIV. Η αλληλουχία φαίνεται να έχει ομολογία σε κάποιες θέσεις με τις αντίστοιχες του υποκινητή αρoCIII, όπως για παράδειγμα μια δυνητική θέση πρόσδεσης για τους HNF-4, COUP-TFII, Ear-3. Συγκεκριμένα προσπαθήσαμε:

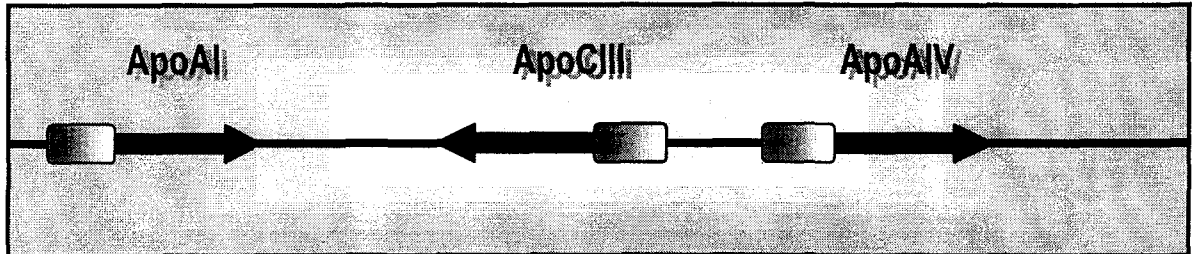
- ◆ Να εντοπίσουμε τις περιοχές εκείνες που μπορεί να είναι θέσεις πρόσδεσης κάποιου/κάποιων μεταγραφικών παραγόντων.
- ◆ Να ταυτοποιήσουμε αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες.
- ◆ Να διερευνήσουμε τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζουν αυτοί οι παράγοντες τη μεταγραφική μηχανή στην περίπτωση του γονιδίου αρoAIV.

ΤΙ ΗΤΑΝ ΓΝΩΣΤΟ

Τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν αντικρουόμενα. Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη αυτή συντίθεται κυρίως στο έντερο και σε χαμηλότερα επίπεδα και στο ήπαρ, όπου είχε δείχτεί ότι τα επίπεδα του αντίστοιχου mRNA επηρεάζονται από ορμόνες και διαιτητικούς παράγοντες, οδήγησε στην υποψία ότι η ρύθμιση της έκφρασής της γίνεται τουλάχιστον εν μέρει στο επίπεδο της μεταγραφής (3).

Παλαιότερες προσπάθειες, όμως, να προσδιοριστεί η ακριβής ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου οδήγησαν σε διαφορετικά σε κάθε εργαστήριο αποτελέσματα. Έτσι, κατά τους Elshourbagy et al (38) η ρυθμιστική αλληλουχία που εκτείνεται από το -300 έως το -893 νουκλεοτίδιο ήταν ικανή να προσδώσει 10 φορές καλύτερη έκφραση του γονιδίου σε κυτταρικές σειρές εντερικής ή ηπατικής προέλευσης σε σύγκριση με άλλου τύπου κυτταρικές σειρές (38). Σύμφωνα με άλλες μελέτες στις παραπάνω κυτταρικές σειρές, (Ochoa et al.) (103) ή σε διαγονιδιακά ποντίκια (Lauer et al.), η περιοχή έως τα -300 νουκλεοτίδια δεν ήταν αρκετή για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου (75). Αντίθετα, για την έκφραση του γονιδίου και στα δύο συστήματα φάνηκε να απαιτούνται πολύ μεγαλύτερες ρυθμιστικές περιοχές που εκτείνονται έως και 7700 (Lauer et al.), (75) ή 6711 και 3500 νουκλεοτίδια (Ochoa et al.) (103). Σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης φάνηκε ότι οι παραπάνω κατασκευές ρυθμίζονται θετικά από το μεταγραφικό παράγοντα HNF-4, όπως πολλά άλλα γονίδια απολιποπρωτεϊνών.

Αξιζει εδώ να σημειώσουμε το γεγονός ότι το γονίδιο apoAIV στον άνθρωπο εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 11 μαζί με τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών CIII και AI, όπως φαίνεται στη σχηματική παράσταση της περιοχής αυτής. Ένας από τους βασικότερους στόχους στην παρακάτω μελέτη ήταν η διερεύνηση της πιθανότητας κοινής ρύθμισης αυτών των γονιδίων, η ύπαρξη, δηλαδή, κοινών ρυθμιστικών αλληλουχιών.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΙVC ΠΡΟΣΔΕΝΟΝΤΑΙ ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ HNF-4, ARP1 ΚΑΙ COUP-TFI.

Η αλληλουχία του υποκινητή αρoAIV παρουσιάζει κάποιες ομόλογες περιοχές με αυτές του υποκινητή αρoCIII. Μερικές από αυτές συνιστούν δυνητικές θέσεις πρόσδεσης για γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως HNF-4, Arp1 και COUP-TFI. Με σκοπό να οριοθετήσουμε τις προστατευόμενες περιοχές στον υποκινητή αρoAIV, που πιθανά αντιστοιχούν σε μοναδικές ή αλληλοεπικαλυπτόμενες θέσεις δέσμησης μεταγραφικών παραγόντων, ακολουθήσαμε τη μέθοδο εντοπισμού πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων πάνω σε DNA παρουσία DNaseI (DNaseI footprinting).

Πρόέκυψαν τέσσερις προστατευμένες περιοχές,

A -22 έως -32

B -42 έως -84

C -120 έως -148

D -250 έως -274

καθώς και τέσσερις υπερευαίσθητες σε DNaseI θέσεις όπως φαίνεται στην **ΕΙΚΟΝΑ Α1**.

Από αυτές, την πιο ασθενή προστασία φαίνεται να έχει η περιοχή C που είναι και η αναμενόμενη θέση πρόσδεσης των εν λόγω ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων. Μετά από πολλές επαναλήψεις αυτής της πειραματικής διαδικασίας. Στην ίδια εικόνα, καταλήξαμε. Συνοπτικός χάρτης των προστατευμένων και υπερευαίσθητων αλληλουχιών παρατίθεται στην **ΕΙΚΟΝΑ Α2**.

Ασχοληθήκαμε περαιτέρω με τους παράγοντες που προσδένονται στην περιοχή ΑΙVC που εκτείνεται από το νουκλεοτίδιο -120 έως -148: "AGGGTCACAAAAGTCCAA" η οποία παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τη συντηρημένη θέση πρόσδεσης των HNF-4, Arp1 και COUP-TFI.

Για να διερευνήσουμε την πιθανότητα ο HNF-4 ή και άλλα μέλη της οικογένειας των ορμονικών υποδοχέων να μπορούν να αναγνωρίσουν και να προσδεθούν στην παραπάνω θέση ακολουθήσαμε τη μέθοδο της μεταβολής κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνη, γνωστή ως EMSA (electrophoretic mobility shift assay). Για

το σκοπό αυτό επιμολύναμε κύτταρα Cos1 με πλασμιδιακές κατασκευές στις οποίες το cDNA των HNF-4, Arp1 και COUP-TFI ήταν κλωνοποιημένο σε ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης. Στη συνέχεια, κατασκευάσαμε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου στα οποία τα επίπεδα των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων ήταν υψηλά λόγω υπερέκφρασής τους. Χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο AIVC και επιδρώντας με τα παραπάνω εκχυλίσματα, διαπιστώσαμε ότι κατά την ηλεκτροφόρηση, προέκυψε και στις τρεις περιπτώσεις σύμπλοκο μικρότερης κινητικότητας (**ΕΙΚΟΝΑ Α3**). Η σχετική συγγένεια πρόσδεσης των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων στη θέση AIVC υπολογίστηκε από μια σειρά αντιδράσεων πρόσδεσης στις οποίες σταθερά ποσά κυτταρικού εκχυλίσματος για τον κάθε μεταγραφικό παράγοντα τιτλοδοτήθηκαν από αυξανόμενα ποσά ραδιοσημασμένου ανιχνευτή (ανάλυση κατά Scatchard, 128). Η σταθερά διάστασης (dissociation constant) που υπολογίστηκε για κάθε αλληλεπίδραση ήταν: 5.5 nM για τον HNF-4, 4.3 nM για τον Arp1 και 7.7 nM για τον COUP-TFI. Συμπεραίνουμε δηλαδή ότι η συγγένεια πρόσδεσης στη θέση AIVC είναι πολύ παρόμοια και για τους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες (**ΕΙΚΟΝΕΣ Α4Α, Α4Β & Α4C**).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι οι ζώνες αυτές οφείλονται πράγματι στην πρόσδεση των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων, επαναλάβαμε τις αντιδράσεις πρόσδεσης με πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου παρουσία κατάλληλων ανταγωνιστών, δηλαδή, μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων που είναι γνωστό από ποιόν ή ποιούς από αυτούς αναγνωρίζονται: στο CIIIB, που προέρχεται από τον υποκινητή του γονιδίου *aroCIII* προσδένονται και οι τρεις πρωτεΐνες, στη θέση «A», που προέρχεται από τον υποκινητή του γονιδίου HNF-1 προσδέεται μόνο ο HNF-4, ενώ στη μεταλλαγμένη θέση AIVCM δεν προσδέεται κανένας από τους παραπάνω. Τα ολιγονουκλεοτίδια CIIIB και "A" που είναι γνωστά για την ικανότητά τους να αναγνωρίζονται από τους εν λόγω ορμονικούς υποδοχείς, φάνηκε να ανταγωνίζονται επιτυχώς το ραδιοσημασμένο AIVC σε αντίθεση με το μεταλλαγμένο AIVCM (**ΕΙΚΟΝΑ Α5Α**).

Η τελική ταυτοποίηση των πρωτεϊνών αυτών έγινε με το να προεπώασουμε τα πυρηνικά εκχυλίσματα με αντισώματα που αναγνωρίζουν επιλεκτικά τον HNF-4 (4a), τους COUP-TFs (Ca), ή συνδυασμό τους (4a+Ca). Παρουσία των αντισωμάτων, μέρος της αντίστοιχης ζώνης η οποία αφορά στο σύμπλοκο ολιγονουκλεοτιδίου-μεταγραφικού παράγοντα, εμφανίστηκε να έχει μειωμένη κινητικότητα, ένδειξη του ότι το αντισώμα

αναγνώρισε την πρωτεΐνη του συμπλόκου. Το ότι ένα μέρος του συμπλόκου διατηρεί την ίδια κινητικότητα δηλώνει ότι πιθανότατα και κάποιοι άλλοι παράγοντες αναγνωρίζουν τη θέση αυτή ή ότι ένα μέρος της πρωτεΐνης έχει διαφύγει της αλληλεπίδρασης με το αντίσωμα (**ΕΙΚΟΝΑ Α5B**).

Για ακόμη πιο λεπτομερή χαρακτηρισμό της θέσης AIVC, ακολουθήθηκε η διαδικασία παρεμπόδισης λόγω μεθυλίωσης (methylation interference assay). Όπως φαίνεται στην **ΕΙΚΟΝΑ Α6**, η πρόσδεση του HNF-4 παρεμποδίζεται από τη μεθυλίωση των γουανινών στις θέσεις -141, -140 και -131 στην κωδική αλυσίδα και των γουανινών -138, -136, -129 και -128 στη μη κωδική αλυσίδα. Η πρόσδεση των παραγόντων COUP-TFI και Arp1 φαίνεται να παρεμποδίζεται από τη μεθυλίωση των ολιγονουκλεοτιδίων στις θέσεις -142, -141, -140 και -131 στην κωδική αλυσίδα και -138 στη συμπληρωματική της. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι και οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες έχουν τον ίδιο στόχο στον υποκινητή του *αροΑΙV* αλλά αν και αλληλεπικαλυπτόμενη, η πρόσδεσή τους γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης με διαφορετικά νουκλεοτίδια.

Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ *ΑροΑΙV* ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ HNF-4

Έχοντας δείξει ότι οι HNF-4, Arp1 και COUP-TFI έχουν επικαλυπτόμενες θέσεις πρόσδεσης μεταξύ των νουκλεοτιδίων -148 έως -92 στον υποκινητή του *αροΑΙV*, θελήσαμε να διερευνήσουμε το ρόλο των παραγόντων αυτών στη μεταγραφή του γονιδίου.

Για το σκοπό αυτό φτιάξαμε μια κατασκευή στην οποία τρία αντίγραφα της AIVC θέσης ακολουθούμενα από τον ελάχιστο υποκινητή της θυμιδινικής κινάσης του *herpes simplex virus* έλεγχαν τη μεταγραφή του γονιδίου της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης ($[AIVC]_3TK$ CAT). Συνδιαμολύναμε παροδικά κύτταρα HepG2 με την κατασκευή αυτή παρουσία φορέων έκφρασης για τους παράγοντες HNF-4, COUP-TFI, ή Arp1 (pMT HNF-4, pMT-COUP-TFI, pMT Arp1). Στην **ΕΙΚΟΝΑ Α7** φαίνεται ότι η μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς παρουσία του HNF-4 αυξήθηκε επτά φορές, ενώ η παρουσία του Arp1 ή COUP-TFI κατέστειλε τη δράση του HNF-4. Μπορούμε, λοιπόν, να ισχυριστούμε ότι σε *ex vivo* πειράματα, η θέση AIVC είναι λειτουργικός στόχος για τους παραπάνω ορφανούς ορμονικούς υποδοχείς.

Παράλληλα, ελέγξαμε το αποτέλεσμα του HNF-4 στον υποκινητή της *ΑροΑΙV* σε *in vitro* σύστημα μεταγραφής. Για το σκοπό αυτό τοποθετήσαμε μια «ελεύθερη από G

κασέτα» (127) υπό τον έλεγχο της περιοχής -1 έως -700nt του αροΑΙV υποκινητή και η κατασκευή αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για το *in vitro* σύστημα μεταγραφής. Οι αντιδράσεις έγιναν με πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου, παρουσία ειδικών ανταγωνιστών για την πρόσδεση ειδικά του HNF-4 ("A" από τον HNF-1 υποκινητή), είτε και των τριών ανεξάρτητα ορφανών υποδοχέων ("AIVC", "CIIIB" από τους υποκινητές των ΑροΑΙV και ΑροCIII αντίστοιχα). Η αντίδραση που αντιστοιχεί στην τελευταία διαδρομή έγινε παρουσία ολιγονουκλεοτιδίου που προσδένει επιλεκτικά το μεταγραφικό παράγοντα HNF-1 (προέρχεται από τον υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης). Τα αποτελέσματα του πειράματος που φαίνονται στην **ΕΙΚΟΝΑ Α8**, δείχνουν ότι η παρουσία του HNF-4 είναι απολύτως απαραίτητη για την *in vitro* μεταγραφή της κατασκευής αυτής.

Το επόμενο βήμα ήταν να ελέγξουμε το αν η δράση του HNF-4 ήταν η ίδια και στα πλαίσια του υποκινητή αροΑΙV, *in vivo*. Με τη μέθοδο της παροδικής διαμόλυνσης σε δύο κυτταρικές σειρές (HepG2 -ηπατικής προέλευσης- και CaCo2 -εντερικής προέλευσης-) ελέγξαμε την ενεργότητα της *cis* ρυθμιστικής αλληλουχίας του γονιδίου σε κατασκευή στην οποία έλεγχε την έκφραση του γονιδίου CAT (αροΑΙV₇₀₀CAT). Η ενεργότητα της αλληλουχίας αυτής ήταν πολύ χαμηλή και στις δύο περιπτώσεις σε σύγκριση με το control (περίπου το 1-1.5%) που ήταν το CAT υπό τον έλεγχο του υποκινητή RSV (RSVCAT). Μια πιθανή εξήγηση για το απροσδόκητο αυτό αποτέλεσμα ήταν η ύπαρξη ενός αρνητικού ρυθμιστικού στοιχείου κάπου μέσα στην αλληλουχία αυτή. Για τη διερεύνηση αυτού του ενδεχομένου δημιουργήσαμε μια σειρά 5' ελλείψεων του υποκινητή υπό τον έλεγχο των οποίων τοποθετήσαμε και πάλι το CAT ως γονίδιο αναφοράς. Συγκεκριμένα, οι ελλείψεις αυτές εκτεινόταν μέχρι το νουκλεοτίδιο -556 [AIV₍₋₅₅₆₎CAT], -486 [AIV₍₋₄₈₆₎CAT], -300 [AIV₍₋₃₀₀₎CAT], -285 [AIV₍₋₂₈₅₎CAT] και -167 [AIV₍₋₁₆₇₎CAT]. Τα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης με τις καινούριες κατασκευές και στους δύο κυτταρικούς τύπους δεν έδωσαν διαφορετικό αποτέλεσμα από αυτό με ολόκληρη τη ρυθμιστική περιοχή. Η ανικανότητα της μεταγραφής, δηλαδή, του αροΑΙV υποκινητή δεν πρέπει να οφείλεται σε δέσμευση καταστολέων της μεταγραφής σε κάποιο/κάποια στοιχεία του υποκινητή, μια και το ίδιο χαμηλά επίπεδα μεταγραφής έχουμε και στις πέντε ελλείψεις.

Η αντίθεση αυτή μεταξύ *ex vivo* και *in vitro* πειραμάτων μπορεί ίσως να ερμηνευθεί αν σκεφτούμε ότι τα *ex vivo* πειράματα επιτελούνται σε καρκινικές

κυτταρικές σειρές στις οποίες τα κύτταρα είναι μερικώς αποδιαφοροποιημένα και ενδεχομένως έχουν χάσει κάποιους παράγοντες που είναι ίσως αναγκαίοι για τη μεταγραφή αυτού του γονιδίου. Αντίθετα, στο *in vitro* σύστημα μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου τα οποία αναμένεται να έχουν όλους τους παράγοντες που απαιτούνται για τη μεταγραφή του γονιδίου. Εναλλακτικά, η διαφορά αυτή μπορεί να αντιπροσωπεύει τη διαφορετική λειτουργία της μεταγραφικής μηχανής πάνω σε γυμνό DNA και σε DNA συγκροτημένο σε χρωματίνη. Σε ένα *in vitro* σύστημα, τα επίπεδα της μεταγραφής εξαρτώνται αποκλειστικά από τη διαθεσιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων στα πυρηνικά εκχυλίσματα. Σε ένα *ex vivo* πείραμα, όμως, τα επίπεδα μεταγραφής μπορούν να περιορίζονται και από την ανώτερης τάξης οργάνωση -που σχετίζεται με δομή χρωματίνης- της συγκεκριμένης πλασμιδιακής κατασκευής μέσα στα κύτταρα. Το ερώτημα που τίθεται είναι να βρεθούν τα ειδικά αυτά ρυθμιστικά στοιχεία που απαιτούνται για την έκφραση του γονιδίου *in vivo*.

ΤΑ ΑΠΟΜΑΚΡΥΣΜΕΝΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *proCIII* ΕΝΙΣΧΥΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *proAIV*.

Όπως προαναφέρθηκε, ο υποκινητής του γονιδίου *proAIV* απέχει 6500 βάσεις από τον υποκινητή του γονιδίου *proCIII* μια και τα δύο γονίδια ανήκουν στο ίδιο σύμπλεγμα και έχουν αντιπαράλληλους υποκινητές (57). Ο υποκινητής *proCIII* είναι γνωστό ότι αποτελείται από ένα εγγύς στοιχείο πρόσδεσης για τους HNF-4, *Arg1* και COUP-TFI και κάποια πιο απομακρυσμένα στοιχεία αναγνώρισης άλλων γνωστών (π.χ. *Sp1*) και άγνωστων μεταγραφικών παραγόντων (104, 144). Για να ελέγξουμε το ενδεχόμενο της ενίσχυσης της έκφρασης της *proAIV* από κάποια στοιχεία του υποκινητή *proCIII*, δημιουργήσαμε μια κατασκευή στην οποία ενθέσαμε τη ρυθμιστική περιοχή -65 έως -890 από τον υποκινητή *proCIII* μπροστά από τον υποκινητή *proAIV* (μέχρι το νουκλεοτίδιο -700). Το γονίδιο αναφοράς CAT τέθηκε υπό το έλεγχο αυτής της σύνθετης ρυθμιστικής περιοχής. Πράγματι, σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε HepG2 και Caco2 κύτταρα φάνηκε ότι η παρουσία των ρυθμιστικών στοιχείων του *proCIII* ενίσχυσε 9-10 φορές την μεταγραφή από τον υποκινητή *proAIV*. Προχωρήσαμε, έτσι, σε ποιο λεπτομερή ανάλυση της αλληλεπίδρασης των δύο υποκινητών δημιουργώντας μια σειρά κατασκευών με το CAT υπό τον έλεγχο σύνθετων ρυθμιστικών

αλληλουχιών από τμήματα του αροCIII μπροστά από ολόκληρο τον αροAIV. Στη συνέχεια, οι κατασκευές αυτές ελέγχθηκαν σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε HepG2 και Caco2 κύτταρα με σκοπό να εντοπίσουμε την ελάχιστη περιοχή από τον αροCIII που απαιτείται για το παραπάνω φαινόμενο. Σε κάθε κατασκευή ελέγχθηκε και η επίδραση του HNF-4 με παράλληλη επιμόλυνση των κυττάρων με ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης του HNF-4. Τα αποτελέσματα αυτής της σειράς πειραμάτων παρουσιάζονται στην **ΕΙΚΟΝΑ A9**. Η περιοχή -500 έως -890 του υποκινητή αροCIII που αντιστοιχεί στις προστατευμένες περιοχές "F", "G", "H", "I", "J" όπως προκύπτει από παλαιότερες μελέτες, ήταν ικανή για να ενισχύσει την ενεργότητα του υποκινητή αροAIV κατά 17.8 και 11.8 φορές στα HepG2 και CaCo2 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα ήταν πιο δραματικά όταν η ενδογενής έκφραση του HNF-4 ενισχύθηκε με την διαμόλυνση των κυττάρων με τον αντίστοιχο φορέα έκφρασης. Στην περίπτωση αυτή, τα παραπάνω αποτελέσματα τροποποιήθηκαν στις 156 φορές για τα HepG2 και στις 50 για τα κύτταρα CaCo2. Η ενισχυμένη αυτή ενεργότητα του αροAIV ήταν ίδια και σε κατασκευές όπου ο «ενισχυτής» εντέθηκε κατά την αντίστροφη φορά, όπως φαίνεται στο 6 της εικόνας A9. Μια και είναι γνωστό ότι στην περιοχή -500/-890 του αροCIII δεν περιλαμβάνεται θέση πρόσδεσης για τον HNF-4, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ενίσχυση που παίρνουμε είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του τελευταίου με μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται στις ρυθμιστικές θέσεις "F"- "J" (όπως για παράδειγμα Sp1 και άλλοι) (144).

Έτσι, με τα μέχρι τώρα δεδομένα, αυτό που μπορούμε να ισχυριστούμε είναι ότι η παρουσία όλων των απομακρυσμένων (upstream) στοιχείων του υποκινητή αροCIII ("F"- "J") είναι απαραίτητα μπροστά από τον υποκινητή αροAIV προκειμένου να έχουμε αυτή την HNF-4 εξαρτώμενη ενίσχυση της μεταγραφής σε κύτταρα HepG2 και Caco2. Τα δεδομένα αυτά είναι σε πλήρη συμφωνία με αυτά που προέκυψαν από τη μελέτη του αροCIII υποκινητή όπου οι περισσότερες μεταλλαγές σε κάποιο από τα upstream στοιχεία οδηγούν σε κατακόρυφη πτώση των επιπέδων της μεταγραφής. Ίσως πρόκειται, δηλαδή, για μια απαραίτητη συνεργασία μεταξύ των Sp1 και άλλων μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται σε απομακρυσμένα cis στοιχεία με τον HNF-4 (στα στοιχεία AIVC και CIIIB των δύο υποκινητών) για τα υψηλά επίπεδα δράσης του τελευταίου.

Η επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής ήταν το αποτέλεσμα της παροδικής επιμόλυνσης κυττάρων στην οποία η θέση AIVC είχε μεταλλαχθεί κατά τέτοιο τρόπο

ώστε να μην είναι δυνατή η πρόσδεση του HNF-4. Στην περίπτωση αυτή, παρά την ύπαρξη του ενισχυτή "F"- "J", η ρυθμιστική ενεργότητα της κατασκευής ήταν πολύ χαμηλή απουσία και παρουσία HNF-4 (περίπου 25-30% της ενεργότητας του υποκινητή αρoAIV μόνο).

Αυτή η αλληλεπίδραση του HNF-4 με τους παράγοντες που αναγνωρίζουν τα upstream στοιχεία του αρoCIII διερευνήθηκε παράλληλα και με μια σειρά κατασκευών με χιμαιρικές ρυθμιστικές αλληλουχίες μπροστά από τον ελάχιστο υποκινητή AdML. Έτσι, τοποθετήσαμε την περιοχή "F"- "J" η οποία ενίσχυσε την ενεργότητα περίπου 5 φορές, χωρίς να φαίνεται να έχει κάποια επίδραση η παρουσία του HNF-4 στην ενίσχυση αυτή. Η παρουσία της θέσης AIVC μπροστά από τον AdML δεν είχε καμία επίδραση στη μεταγραφική του ενεργότητα, ενώ η συνύπαρξη και των δύο ρυθμιστικών περιοχών έδωσε την αναμενόμενη HNF-4-εξαρτώμενη ενίσχυση της μεταγραφής. Ανάλογα αποτελέσματα πήραμε και με κατασκευές στις οποίες του AdML προηγήθηκε η θέση CIIIB, "F"- "J" ή συνδυασμός τους. Έτσι, η 3-4 φορές αύξηση της μεταγραφής παρουσία μιας θέσης πρόσδεσης του HNF-4, έγινε 23-24 και 15-30 φορές αύξηση παρουσία των στοιχείων CIII στα κύτταρα HepG2 και Caco2 αντίστοιχα, όταν η πηγή HNF-4 ήταν μόνο το ενδογενές γονίδιο. Συνδιαμόλυνση με φορέα έκφρασης HNF-4 μετέτρεψε τις παραπάνω τιμές σε 148 και 198 φορές για τα HepG2 κύτταρα και 118, 192 φορές για τα Caco2. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στην **ΕΙΚΟΝΑ 10**.

ΟΙ Arp1 ΚΑΙ COUP-TFI ΕΧΟΥΝ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟΝ HNF-4 ΣΤΟΝ αρoAIV ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ

Στην **ΕΙΚΟΝΑ A11** φαίνονται τα αποτελέσματα από μια σειρά πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων HepG2 με την [CIII_{J-F}] AIV-CAT κατασκευή και διαφορετικές ποσότητες φορέων έκφρασης για τους παράγοντες HNF-4, Arp1, και COUP-TFI. Αυξανόμενες συγκεντρώσεις των Arp1 ή COUP-TFI είναι ικανές να καταστείλουν την ενεργότητα του ενισχυτή. Τα αποτελέσματα αναστρέφονται με υπερέκφραση του HNF-4 στα ίδια κύτταρα. Τα παραπάνω ήταν απολύτως αναμενόμενα, μια και είχαμε δείξει, αφενός από πειράματα *in vitro* αλληλεπίδρασης ότι οι παράγοντες αυτοί αναγνωρίζουν την θέση AIVC και αφετέρου από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης ότι καταστέλλουν την ενεργότητα του υποκινητή αρoAIV με την πρόσδεσή τους στη θέση AIVC. Ο ανταγωνισμός με τον HNF-4 για την ίδια θέση πρόσδεσης τους κάνει ισχυρούς

καταστολείς της ενεργότητας του ενισχυτή μια και αυτή πηγάζει από την αλληλεπίδραση του τελευταίου με παράγοντες που προσδένονται στον ενισχυτή. Έτσι, ήταν επίσης αναμενόμενο το αποτέλεσμα της τελευταίας σειράς παροδικών διαμολύνσεων στις οποίες το γονίδιο αναφοράς ήταν υπό τον έλεγχο της σύνθετης ρυθμιστικής αλληλουχίας με μεταλλαγμένη τη θέση AIVC([CIII_{J-F}]AIVCM-CAT). Οι παράγοντες αυτοί δεν έχουν την ικανότητα να προσδένονται στη μεταλλαγμένη θέση AIVCM.

Η ΑροΑΙV ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΡΥΘΜΙΖΕΤΑΙ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΟΥ ΡΕΤΙΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Όπως διαπιστώσαμε σε προηγούμενα πειράματα, ο υποκινητής αροΑΙV φαίνεται να είναι ανενεργός σε δοκιμές CAT που επιτελούνται σε εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2, αλλά να εκφράζεται ικανοποιητικά σε *in vitro* σύστημα παρουσία πυρηνικών εκχυλισμάτων από ήπαρ αρουραίου. Την αντίθεση αυτή, την αποδώσαμε εν μέρη στην πιθανή ύπαρξη κάποιου ή κάποιων μεταγραφικών παραγόντων σημαντικών για την έκφραση του αροΑΙV στο ήπαρ του αρουραίου, οι οποίοι απουσιάζουν από την καρκινική σειρά HepG2 (κάτι που είναι αναμενόμενο ως αποτέλεσμα της μερικής αποδιαφοροποίησης των κυττάρων αυτών). Τέτοιοι παράγοντες θα μπορούσαν να δεσμεύονται στις διάφορες περιοχές που φάνηκαν να προστατεύονται με την ανάλυση αποτυπώματος (DnaseI footprinting), πιθανά λοιπόν και στην περιοχή AIVC που μελετάμε εκτενέστερα στην εργασία αυτή.

Η υπόθεση αυτή είναι σύμφωνη και με την παρατήρηση από τις ηλεκτροφορήσεις υστέρησης κινητικότητας τόσο παρουσία ανταγωνιστού όσο και παρουσία αντισώματος (abHNF-4, abCOUPTF) ότι ένα σημαντικό ποσοστό της ζώνης AIVC παραμένει, υποδηλώνοντας την πρόσδεση και άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών.

Από μελέτες ερευνητών, έχει δειχτεί σχετικά πρόσφατα ότι κάποιες από τις θέσεις αναγνώρισης του HNF-4 αποτελούν και θέσεις πρόσδεσης μελών της οικογένειας των υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος και ρετινοϊδών (R_xR, R_aR). Τέτοιες είναι η θέση D του υποκινητή αροΑΙ, οι θέσεις CIII_B και TRH των υποκινητών αροCIII και HNF-1, αντίστοιχα και οι θέσεις B,C του υποκινητή της καρβαμυλάσης της ορνιθίνης. Παρατηρώντας την αλληλουχία του AIVC ολιγονουκλεοτιδίου, εντοπίζουμε μια ατελή θέση για δέσμευση των R_aR_a, R_xR: GGGTCA. Για να διερευνήσουμε την πιθανότητα πρόσδεσης των παραπάνω παραγόντων στη θέση αυτή, παρασκευάσαμε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα

Cos1 που είχαν επιμολυνθεί με φορείς έκφρασης για RxRa (pMT RxRa) και RaRa (pMT RaRa). Με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης υστέρησης κινητικότητας δε φάνηκε να δεσμεύεται ως ομοδιμερές κανένας από τους παραπάνω παράγοντες. Αντίθετα, όταν αναμίξαμε τα κυτταρικά εκχυλίσματα, το ετεροδιμερές τους RxRa/RaRa σχημάτισε ζώνη μειωμένης κινητικότητας με τον ανιχνευτή AIVC, όπως φαίνεται στην **ΕΙΚΟΝΑ Α12**.

Στη συνέχεια, ελέγξαμε την πιθανότητα ετεροδιμερισμού των RxRa, RaRa με κάποιον από τους ορφανούς υποδοχείς πάνω στη θέση AIVC μια και στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί τέτοιοι ετεροδιμερισμοί όπως για παράδειγμα RxRa/COUPTF. Στην εικόνα Α12 φαίνονται όλοι οι συνδυασμοί που έγιναν, χωρίς όμως να έχουμε από αυτό τουλάχιστον το πείραμα ενδείξεις για τη δέσμευση άλλων ετεροδιμερών. Έτσι, το πείραμα αυτό δίνει μια αρχική πληροφορία για την ικανότητα πρόσδεσης του ετεροδιμερούς RxRa/RaRa στη θέση AIVC. Μένει όμως να διερευνηθεί και το κατά πόσο παίζει ρυθμιστικό ρόλο η πρόσδεση αυτή στην έκφραση του γονιδίου. Το επόμενο λοιπόν βήμα είναι να περάσουμε σε λειτουργικά πειράματα για τη διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου του RxRa/RaRa. Πιθανά, εκτός από την HNF-4 εξαρτώμενη μεταγραφή στην οποία οφείλονται τα βασικά επίπεδα έκφρασης του αρoAIV, έχουμε και κάτω από συγκεκριμένες καταστάσεις και μια επαγομένη αύξηση του γονιδίου, η ρύθμιση της οποίας να υπόκειται στο μονοπάτι του ρετινοϊκού οξέος.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Μετά από ανάλυση αποτυπώματος, δείξαμε ότι η αλληλουχία -92 έως -148 που είχαμε εντοπίσει από σύγκριση αλληλουχιών ως πιθανό στόχο πρόσδεσης για τους ορφανούς υποδοχείς HNF-4, COUP-TFII και COUP-TFI ήταν πράγματι προστατευμένη από τη δράση της DNaseI. Με πειράματα πρόσδεσης παρουσία κατάλληλων ανταγωνιστών και αντισωμάτων *in vitro*, επιβεβαιώσαμε το ότι οι παραπάνω μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται με πολύ παρόμοια συγγένεια πρόσδεσης και αλληλοεπικαλυπτόμενες θέσεις αναγνώρισης στην ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία AIVC. Μεταλλάσσοντας κατάλληλα τη θέση AIVC (AIVCM) μπορέσαμε να καταστείλουμε την αλληλεπίδραση αυτή. Σε *ex vivo* πειράματα διαπιστώσαμε ότι ο HNF-4 αποτελεί ένα μεταγραφικό ενεργοποιητή προσδενόμενος στη θέση αυτή, αντίθετα από τους Agr1 και COUP-TFI, οι οποίοι καταστέλλουν τη μεταγραφή προσδενόμενοι στη θέση AIVC. Το γεγονός ότι οι παράγοντες αυτοί είναι παρόντες και στους δύο υπό μελέτη κυτταρικούς τύπους με προέλευση το ήπαρ (HepG2) και το έντερο (Caco2) μας οδηγεί στην υπόθεση ότι τελικά η έκφραση ή η καταστολή ενός γονιδίου όπως αυτό της ApoAIV θα εξαρτάται από τις σχετικές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των παραγόντων αυτών, δηλαδή ανάγεται στον τρόπο ρύθμισης αυτών καθ' αυτών των μεταγραφικών ρυθμιστών. Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι και οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες που εξετάζουμε, ανήκουν στην οικογένεια των ορφανών ορμονικών υποδοχέων μια και δεν έχει βρεθεί για κανένα από αυτούς προσδέτης. Το γεγονός ότι είναι ενεργοί σε όλους τους κυτταρικούς τύπους τους οποίους επιμολύνουμε με τους αντίστοιχους φορείς έκφρασης, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι η θέση πρόσδεσης του «άγνωστου προσδέτη» είναι εξαιρετικά συντηρημένη σε όλους τους οργανισμούς όπου έχουν κλωνοποιηθεί οι παράγοντες αυτοί (από τη δροσόφιλα μέχρι τον άνθρωπο) μας κάνει να πιστεύουμε ότι αυτός ο προσδέτης είτε θα παίζει κατασταλακτικό ρόλο στην ενεργότητά τους, είτε θα είναι παραπροϊόν του μεταβολισμού που είναι παρόν σε κάθε κυτταρικό τύπο. Αν ακολουθήσουμε τη δεύτερη εκδοχή μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ύπαρξη κάποιου προσδέτη θα είναι ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης των παραγόντων αυτών και κατά συνέπεια και των ρυθμιζόμενων από αυτούς γονιδίων. Έτσι, στην περίπτωση της ApoAIV ως τέτοιος προσδέτης θα μπορούσε να δρα κάποιο παραπροϊόν του ενδοκυτταρικού λιπιδικού μεταβολισμού, τροποποιώντας θετικά ή αρνητικά την έκφραση

ή/και τη δράση των HNF-4, Arp1, COUP-TFI, ανάλογα με τη μεταβολική φάση του κυττάρου. Μπορούμε να ισχυριστούμε ότι οι παραπάνω παράγοντες έχουν παρόμοια δράση σε κάποιες ομάδες γονιδίων, γεγονός που συμφωνεί με την παραπάνω υπόθεση, αλλά δεν ισχύει απόλυτα σε όλες τις περιπτώσεις. Επίσης, το ότι οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν μια πολύ μεγάλη ποικιλία λειτουργικά άσχετων γονιδίων όπως παράγοντες πήξης του αίματος, πρωτεΐνες του ορού, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στεροειδών, αμινοξέων, γλυκόζης κ.λ.π. περιπλέκει ακόμα περισσότερο την παραπάνω θεωρία. Μια θεωρία που θα μπορούσε να εξηγήσει τον κοινό τρόπο ρύθμισης πολλών απολιποπρωτεϊνών (π.χ. ApoAI, ApoAII, ApoAIV, ApoCIII), είναι ότι όλα αυτά τα γονίδια έχουν προκύψει από ένα αρχικό γονίδιο με διαδοχικές ελλείψεις, προσθήκες, αναστροφές, μετατοπίσεις και διπλασιασμούς διατηρώντας αυστηρά συντηρημένη τη θέση πρόσδεσης «ορφανών» πυρηνικών υποδοχέων. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία είναι και οι φυλογενετικές μελέτες που καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα γονίδια ApoAI, ApoAII, ApoAIV, ApoCIII έχουν προκύψει από σειριακούς διπλασιασμούς και μεταθέσεις του γονιδίου της ApoCI.

As επιστρέψουμε τώρα στη ρύθμιση του γονιδίου της ApoAIV. Με μια σειρά πειραμάτων *in vitro* και *ex vivo* διαπιστώσαμε ότι η 5' ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου που εκτείνεται μέχρι το νουκλεοτίδιο -700 ήταν ικανή και αναγκαία *in vitro* αλλά όχι και *in vivo* για να οδηγήσει σε μεταγραφή. Το κυριότερο ρυθμιστικό στοιχείο στην περιοχή αυτή δείξαμε ότι είναι το AIVC που αποτελεί και τη θέση πρόσδεσης των παραπάνω ρυθμιστών. Η αδυναμία του στοιχείου AIVC να λειτουργήσει με τον ίδιο τρόπο και στο *ex vivo* σύστημα, μπορεί να εξηγηθεί από την πολυπλοκότητα της δομής του υποκινητή λόγω ανώτερης τάξης χρωματινικής οργάνωσης. Η ανασύσταση *in vitro* της μεταγραφικής μηχανής εμπεριέχει τον κίνδυνο της υπεραπλούστευσης του συστήματος, που οδηγεί σε αντικρουόμενα *in vivo* και *in vitro* αποτελέσματα. Η αναγκαιότητα κάποιων επιπλέον ρυθμιστικών αλληλουχιών *in vivo* αλλά όχι και *in vitro* είναι κάτι που έχει παρατηρηθεί και στη μελέτη της ρύθμισης άλλων γονιδίων (α1AT, ανθρώπινης τρανσφερίνης) (13, 96, 131, 92).

Έτσι, στην περίπτωση του γονιδίου apoAIV, δείξαμε ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη των απομακρυσμένων ρυθμιστικών αλληλουχιών για την υψηλή μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου. Δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι κάτι τέτοιο συμβαίνει απαραίτητα και στη φύση μια και όλα τα πειράματα έχουν γίνει με κατασκευές που

φέρουν πολύ κοντά τις δύο ρυθμιστικές αλληλουχίες δίνοντας τη δυνατότητα στον HNF-4 να αλληλεπιδράσει με τους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στα στοιχεία "F"- "J". Τα αποτελέσματά μας, όμως, είναι σε απόλυτη συμφωνία με αυτά από μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια, όπου η αλληλουχία μέχρι τα -6500 νουκλεοτίδια ενίσχυε ηπατοειδικά την έκφραση του γονιδίου. Από άλλα εργαστήρια έχει εντοπιστεί και μια δεύτερη αλληλουχία στις 3500 βάσεις πάνω από τον υποκινητή *αροΑIV* που περιέχει μια θέση πρόσδεσης για τον HNF-4 και ενισχύει σε μικρότερο βαθμό τη μεταγραφή του γονιδίου. Η ενίσχυση, όμως, ήταν πολύ πιο εντυπωσιακή στην περίπτωση του πρώτου ενισχυτή. Η αλληλουχία "F"- "J" έχει δείχτει από μεταγενέστερες μελέτες, ότι παίζει τον ίδιο ρόλο και στην έκφραση των απολιποπρωτεϊνών *ΑροCIII* και της *ΑροAI*. Μπορούμε λοιπόν να θεωρήσουμε τον ενισχυτή "F"- "J" ως ενόρχηστρωτή της έκφρασης του cluster αυτού. Ανάλογες περιπτώσεις συντονισμένης ρύθμισης γονιδίων από κοινή ρυθμιστική περιοχή έχει αναφερθεί στην περίπτωση του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης καθώς επίσης και στα γειτονικά γονίδια της αλβουμίνης και της α-φετοπρωτεΐνης.

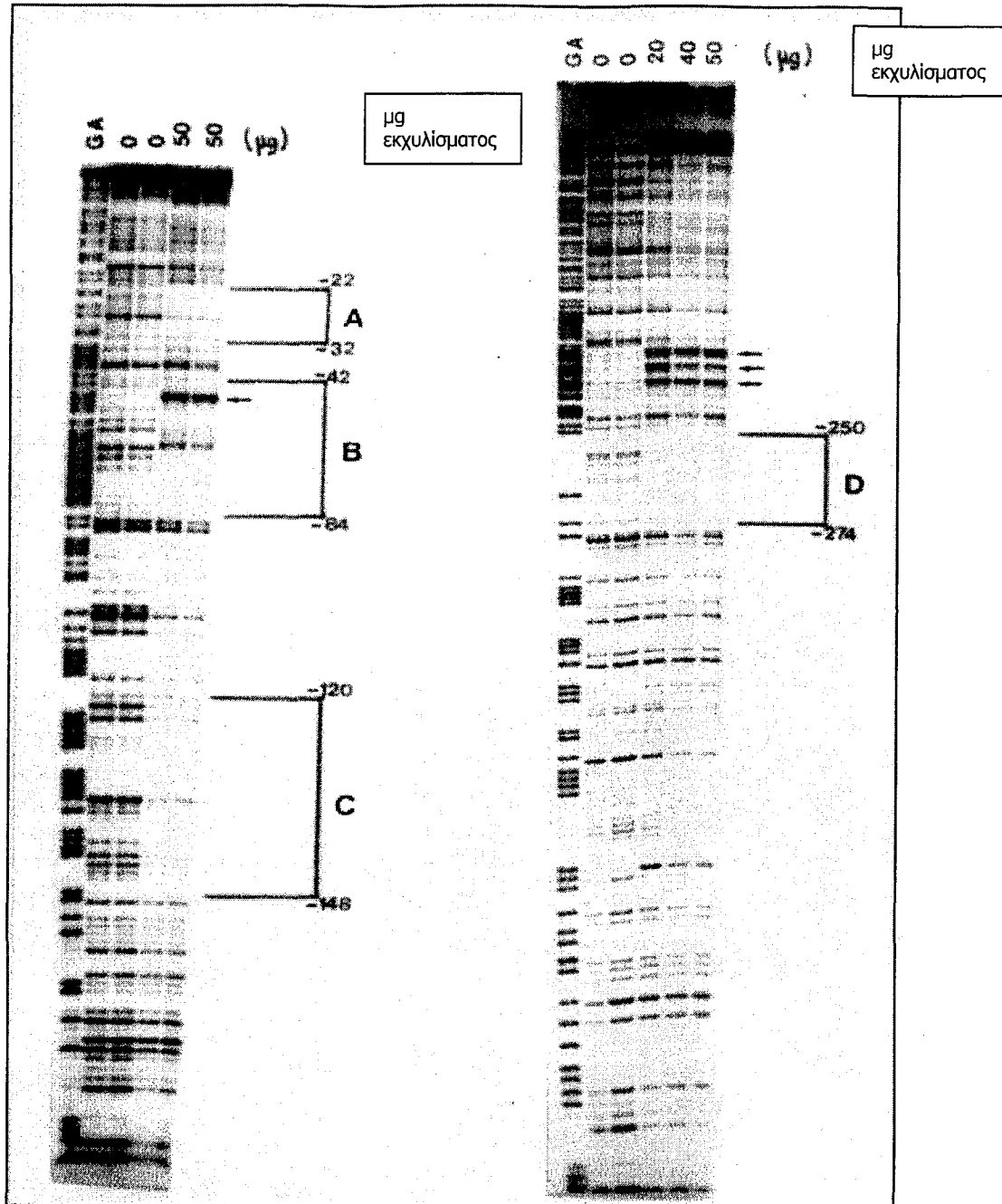
Όπως δείξαμε, ο ενισχυτής "F"- "J" είναι δραστικός μόνο σε συνεργασία με κάποια θέση πρόσδεσης του HNF-4, γεγονός που υποδηλώνει την αναγκαιότητα αλληλεπίδρασης του HNF-4 με τους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στον ενισχυτή. Κάτι τέτοιο φαίνεται αφενός μεν από το γεγονός ότι η δράση του ενισχύεται όταν σε μια κατασκευή συνυπάρχει με μια θέση πρόσδεσης για τον HNF-4 (κάτι που συμβαίνει *in vivo* στον υποκινητή της *ΑροCIII*) και αφετέρου από την αδυναμία του να ενισχύσει τη μεταγραφή όντας δίπλα από μια μεταλλαγμένη θέση πρόσδεσης για τον HNF-4. Από τις μέχρι τώρα μελέτες δεν είναι γνωστοί οι παράγοντες που προσδένονται στον ενισχυτή, με εξαίρεση τον Sp1 που είναι γνωστό ότι προσδένεται στα στοιχεία "F", "H", "I". Σε άλλους υποκινητές, ο HNF-4 έχει βρεθεί ότι συνεργάζεται με παράγοντες όπως ο C/EBP (στον *ΑροB*, 94), ή ο CREB (στον TAT, 102). Ο ακριβής τρόπος αλληλεπίδρασης δεν έχει διαλευκανθεί σε καμιά από τις παραπάνω περιπτώσεις. Επίσης, δε γνωρίζουμε αν κάποιοι συμπαράγοντες απαιτούνται για την αλληλεπίδραση αυτή.

Στα *ex vivo* πειράματά μας, ο ενισχυτής "F"- "J" ήταν ενεργός τόσο στα HepG2 όσο και στα Caco2 κύτταρα (ηπατικής και εντερικής προέλευσης αντίστοιχα) ενώ μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια και σε ανθρώπους εντοπίζουν τη δράση του γονιδίου κυρίως σε κύτταρα του εντέρου και σε πολύ μικρότερο βαθμό σε κύτταρα του ήπατος. Αυτή η απόκλιση μεταξύ *in vivo* και *ex vivo* αποτελεσμάτων, μπορεί να εξηγηθεί από τη μερική

αποδιαφοροποίηση των καρκινικών σειρών που συχνά τις απομακρύνει αρκετά – βιοχημικά και λειτουργικά- από τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προέρχονται. Έτσι, τα κύτταρα HepG2 είναι βιοχημικά πολύ πιο κοντά σε κύτταρα ήπατος εμβρυϊκής προέλευσης παρά σε ήπαρ ενηλίκου ατόμου (121). Η διαφοροποίηση αυτή πιθανά αντανακλά και το πρότυπο έκφρασης της ΑροΑΙV κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Εναλλακτικά, θα μπορούσαμε να αποδώσουμε τα αντικρουόμενα αυτά δεδομένα στην πιθανή ύπαρξη μετα-μεταγραφικών μηχανισμών που να ευνοούν την έκφραση της ΑροΑΙV σε υψηλότερα επίπεδα στο έντερο. Τέτοιοι μηχανισμοί θα μπορούσαν να αφορούν στη σταθερότητα του mRNA, στην ικανότητα μετάφρασής του ή σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που να επιτρέπουν υψηλότερα επίπεδα και μεγαλύτερη ενεργότητα της ΑροΑΙV στο έντερο.

Απο-	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΕΞΟΝΙΑ	m-RNA	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΔΡΑΣΗ	ΑΣΘΕΝΕΙΑ
AI	2	4	0.9	11q13-ter	Προσδένεται στο LCAT και το ενεργοποιεί	Ελλειψη ή/και αναστροφή της χρωμοσωμικής περιοχής που περιλαμβάνει τα γονίδια apo CIII, AIV σχετίζεται με την αρτηριοσκλήρυνση
AII	1.3	4	0.5	1p21-1ter	Ενεργοποιεί το LCAT	
AIV	2.8	3	1.3	11q13-ter	Ενεργοποιεί το LCAT	Ελλειψη ή/και αναστροφή της χρωμοσωμικής περιοχής που περιλαμβάνει τα γονίδια apo CIII, AIV σχετίζεται με την αρτηριοσκλήρυνση
B100	4.3	29	14.1	2p23-p24	Καταβολισμός της LCAT, επαγόμενος από υποδοχέα	A-β-λιποπρωτεϊναιμία, απο-β-λιποπρωτεϊναιμία, ανωμαλίες στον LDL υποδοχέα
CI	4.7	4	0.4	19	Ενεργοποιεί το LCAT, εμποδίζει τον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν ApoE από τον B/E και E/a2M υποδοχέα	
CII	3.3	4	0.5	19	Ενεργοποιεί τη λιποπρωτεϊνική λιπάση	Οικογενειακού τύπου I υπερλιποπρωτεϊναιμία
CIII	3.2	4	0.55	11q13-ter	Εμποδίζει τον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν ApoE από τον LDL υποδοχέα	Ελλειψη ή/και αναστροφή της χρωμοσωμικής περιοχής που περιλαμβάνει τα γονίδια apo CIII, AIV σχετίζεται με την αρτηριοσκλήρυνση
E	3	4	1.2	19	Καταβολισμός επαγόμενος από τον υποδοχέα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν ApoE	Οικογενειακού τύπου III υπερλιποπρωτεϊναιμία

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Τι γνωρίζουμε για τις πιο σημαντικές απολιποπρωτεΐνες.



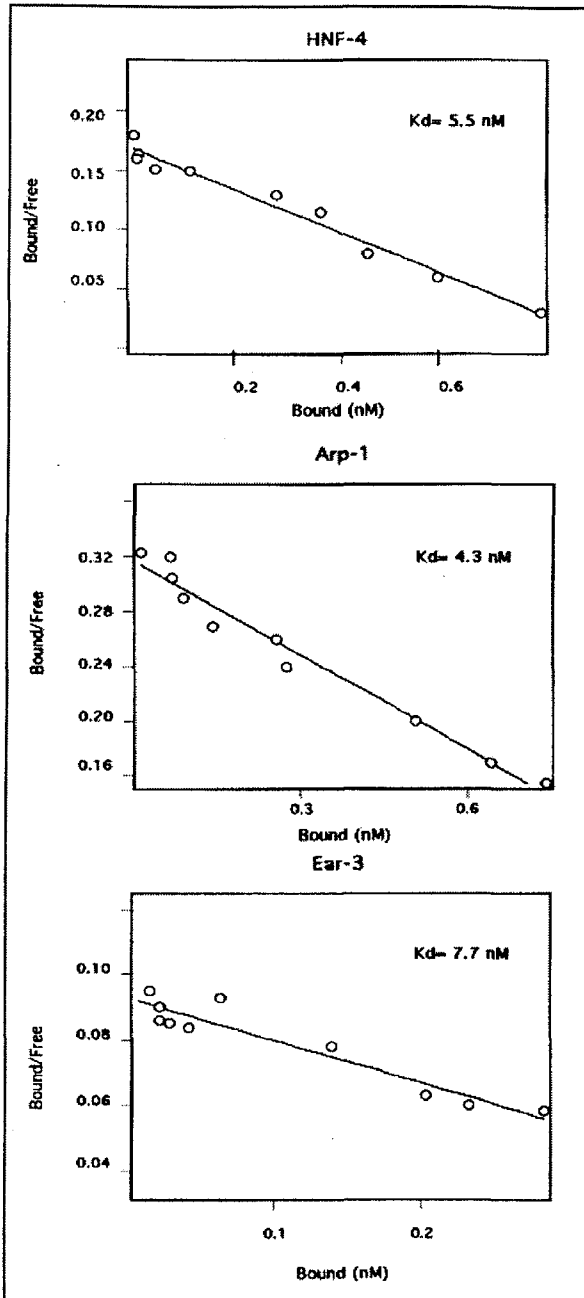
ΕΙΚΟΝΑ A1: Χαρτογράφηση των θέσεων πρόσδεσης (A, B, C, D) πυρηνικών παραγόντων στον υποκινητή *aroAIV*. Η ανάλυση αποτυπώματος έγινε με ιχνηθέτες σημασμένους στο 5' άκρο τους που εκτείνονται από το -165 έως το +10 (A) και από το -322 έως +10 (B) νουκλεοτίδιο του υποκινητή και πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου στις ποσότητες που αναφέρονται. Η διαδρομή G/A αντιπροσωπεύει τον κατά Maxam-Gilbert προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των ανιχνευτών.

```

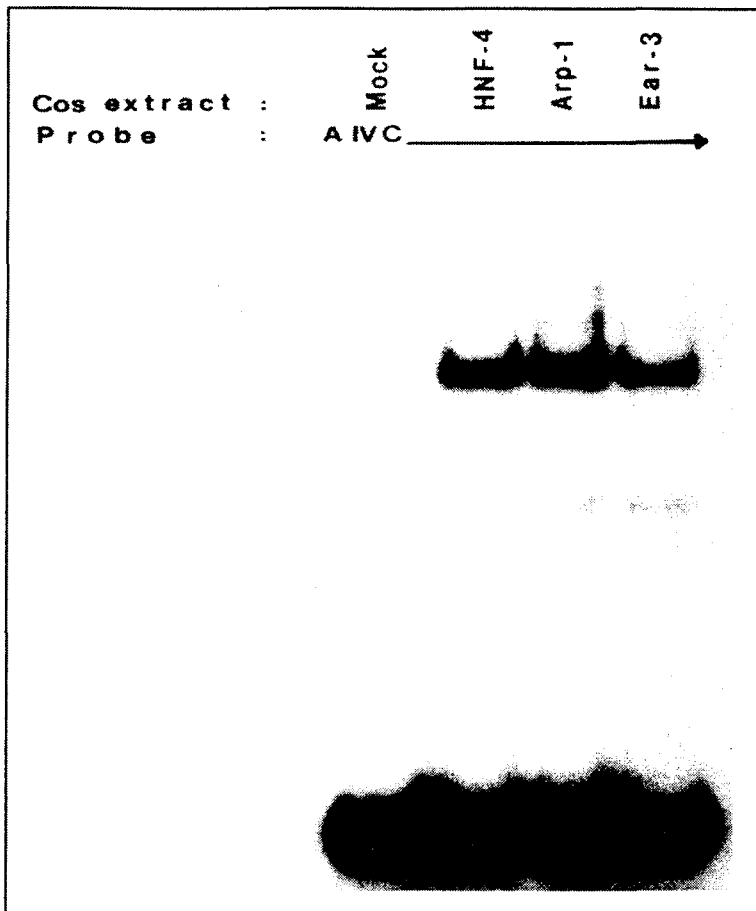
-300 TGTGGACTTTGQDQDCCATGAGDCCGGSEACAAACCCGAGACGGQDCCAGGAG
-320 QGQCTGAGGQCATCAETCCDGGQETCATQDQCTQCTQAGGTGTTTCTQCTACT
-274 CTTTCCGTTCCGCTGCTCCCTTC ATGCTGAGGTTGGTGGCTGCGGGTGGG
-221 GGTGQCCACQCCACGGGAADAGGQDCCACTTCTAACCTATQDQCTGAGGQCTGAT
-166 CTGCTGTGAGCTTDEACCTA GTCTCAGGCTCAGAAAGTCCAAAGAGGCTCTTT
115 GGGAAATGTGTCACTTCCAGGCTG GAGTCAG ACTGAGBAAGGAAQACGGG
-105 AGGGGAGCCAGGQDQCTQDQCAT GGGAGAGAG TTTAAATGTCT QGCTGG
-15 CTCTGAGGTTCAATC

```

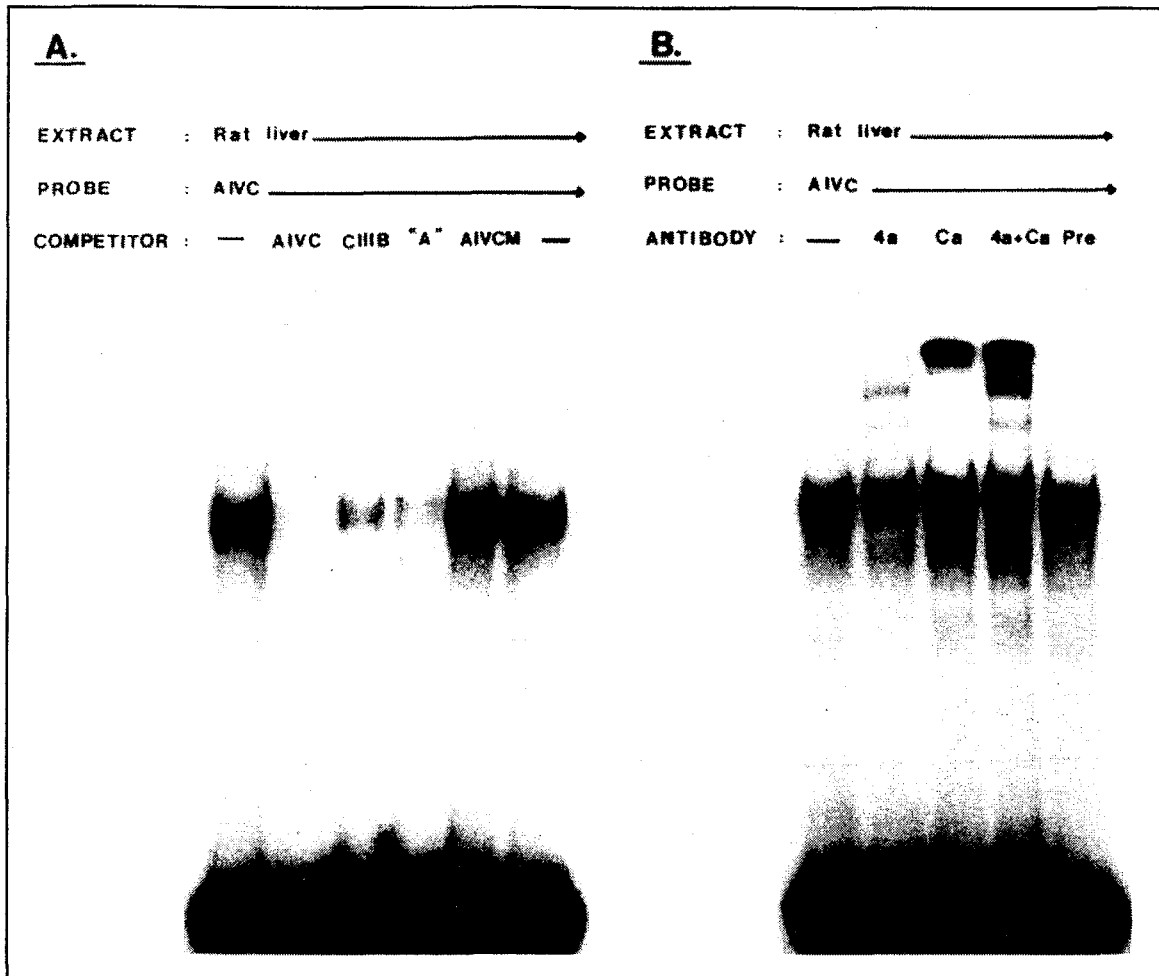
ΕΙΚΟΝΑ A2: Η αλληλουχία του υποκινητή της AroAIV. Σε μαύρο φόντο φαίνονται οι περιοχές (A, B, C, D) που είναι προστατευμένες από τη δράση της DNaseI.



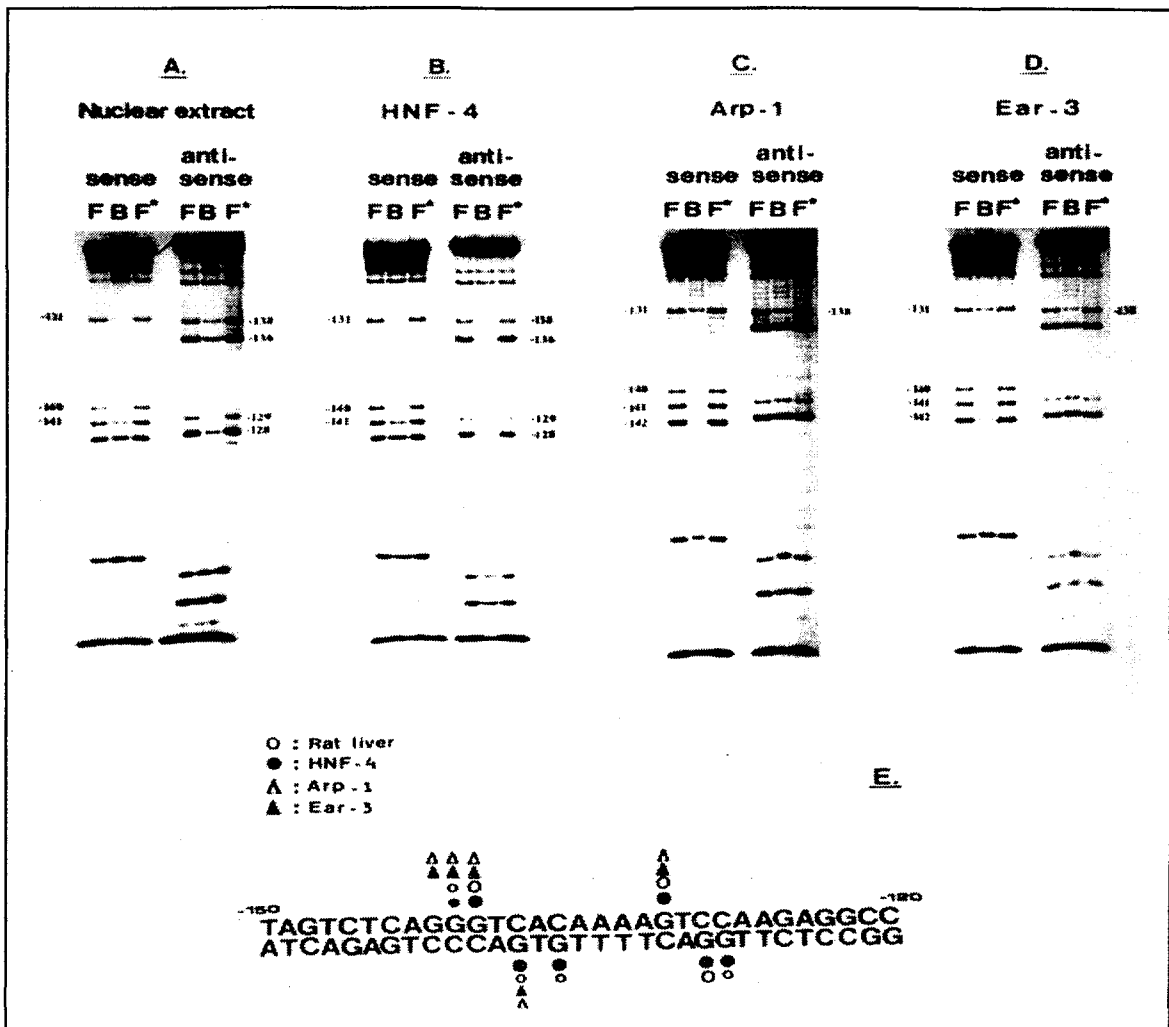
ΕΙΚΟΝΑ Α3: Επεξεργασία δεδομένων κατά Scatchard από πειράματα δέσμησης των COUP-TFII, COUP-TFI και HNF-4 στη θέση AIVC. Στον άξονα ψ απεικονίζονται οι τιμές που αντιστοιχούν στο λόγο προσδεμένου / ελεύθερου ανιχνευτή (AIVC) (Bound/Free), ενώ στον άξονα χ οι τιμές που αντιστοιχούν στο δεσμευμένο AIVC (Bound). Οι τιμές Kd αντιπροσωπεύουν τις συγγένειες πρόσδεσης των τριών μεταγραφικών παραγόντων.



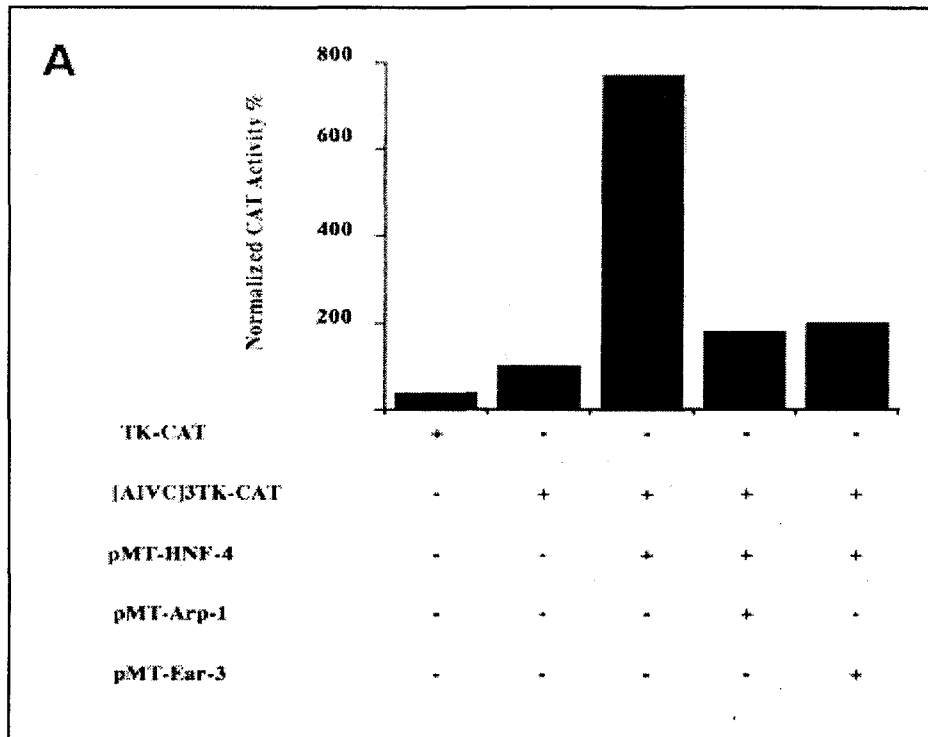
ΕΙΚΟΝΑ A4: Οι παράγοντες HNF-4, COUP-TFII και COUP-TFI προσδένονται στην αλληλουχία A IVC. Οι αντιδράσεις έγιναν παρουσία ραδιοσημασμένου δίκλωνου ανιχνευτή A IVC (probe) και ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (extracts) από κύτταρα Cos1 (mock), ή διαμολυσμένα με τους φορείς έκφρασης pMT2 HNF-4 (HNF-4), pMT2 COUP-TFII (COUP-TFII) και pMT2 COUP-TFI (COUP-TFI). Σε κάθε αντίδραση πρόσδεσης χρησιμοποιήσαμε 5 µg πρωτεϊνών.



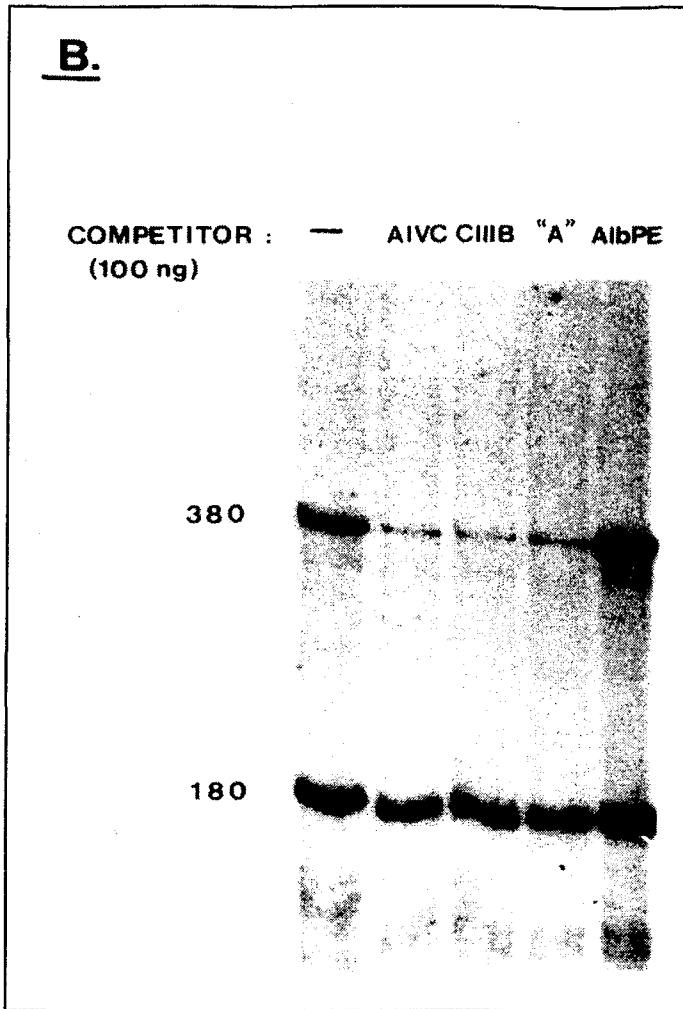
ΕΙΚΟΝΑ Α5: Διαπίστωση της ικανότητας πρόσδεσης των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων πάνω στην αλληλουχία AIVC (probe) χρησιμοποιώντας πυρηνικά εκχυλίσματα (extract) από ήπαρ αρουραίου (10 µg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε αντίδραση). Στο τμήμα A της εικόνας οι αντιδράσεις έγιναν παρουσία / απουσία δίκλωνου κρύου ανταγωνιστή (competitor) (AIVC, CIIIB, A και AIVCM) σε 100 φορές μοριακής περίσσειας. Στο τμήμα B βλέπουμε την επίδραση των αντισωμάτων (antibody) εναντίον του HNF-4 (4a), COUP-TF (Ca) ή και των δύο (4a+Ca) ή του προ-ανοσοποιημένου ορού όταν αυτά προεπωάστηκαν με τα εκχυλίσματα.



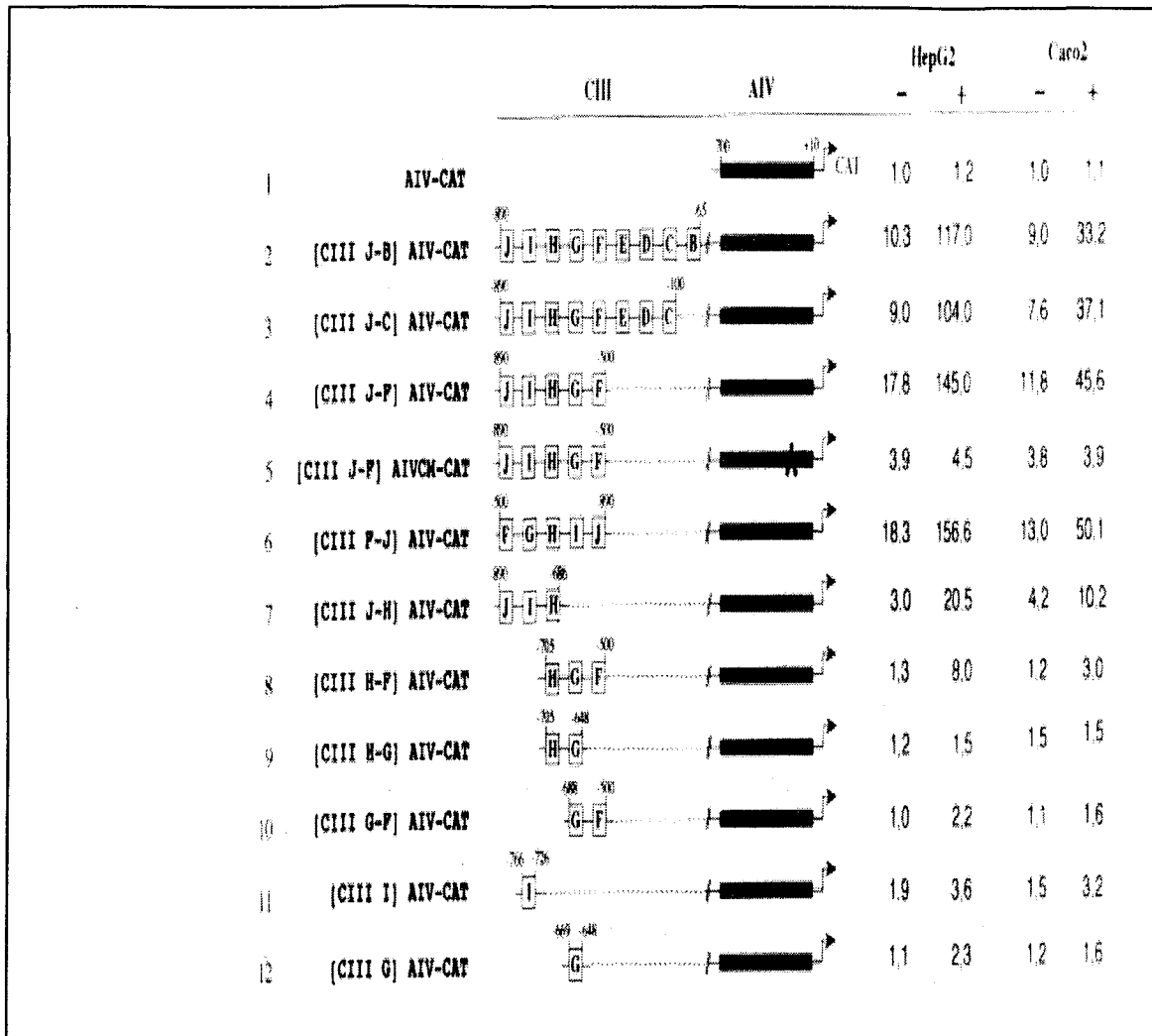
ΕΙΚΟΝΑ Α6: Παρεμπόδιση σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης της περιοχής AIVC. Οι αντιδράσεις πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν με μερικά μεθυλιωμένα τη δίκλωνη αλληλουχία AIVC, σημασμένη στο 5' άκρο της κωδικής αλυσίδας (sense) ή το 5' άκρο της αντικωδικής (antisense) αλυσίδας. Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήσαμε ήταν από πυρήνες ήπατος αρουραίου (A) ή ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από Cos1 κύτταρα διαμολυσμένα από pMT2- HNF-4 (B), pMT- COUP-TFII (C) και pMT-COUP-TFI (D). Ο συμβολισμός F αναφέρεται στο ελεύθερο πρωτεϊνών DNA, ο B στο δεσμευμένο DNA και τέλος ο F* στο ελεύθερο DNA που απομονώθηκε μετά την αλληλεπίδραση με τα εκχυλίσματα. Οι μεθυλιωμένες G που επηρέασαν την πρόσδεση των πρωτεϊνών φαίνονται στο τμήμα E της εικόνας. Η μεγαλύτερη ή μικρότερη επίδραση απεικονίζεται με διαφορετικού μεγέθους σύμβολα.



ΕΙΚΟΝΑ A7: Ο λειτουργικός ρόλος της θέσης AIVC του υποκινητή αρoAIV. Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν με 2 µg από τα πλασμίδια αναφοράς TK-CAT ή [AIVC]₃TK-CAT παρουσία(+) / απουσία(-) 2 µg των pMT2-HNF-4, pMT2-COUP-TFII και pMT2-COUP-TFI φορέων έκφρασης. Στο ιστόγραμμα αναπαριστώνται οι μέσες τιμές των κανονικοποιημένων ενεργοτήτων CAT από πέντε διαφορετικά πειράματα με δύο ανεξάρτητες παρασκευές πλασμιδιακού DNA. Οι τιμές εκφράζονται ως κανονικοποιημένα ποσοστά της αντίστοιχης ενεργότητας που έδωσε η κατασκευή [AIVC]₃TK-CAT (normalized CAT activity %).



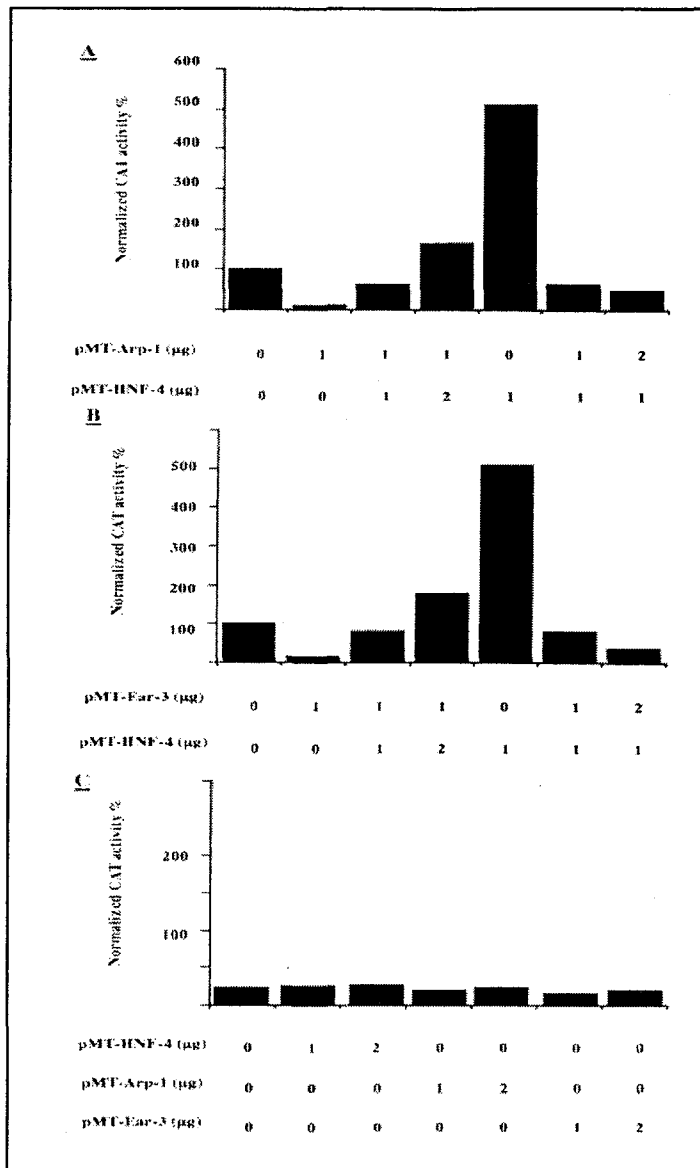
ΕΙΚΟΝΑ Α8: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων πειράματος μεταγραφής *in vitro*, όπου η μήτρα AIV₇₀₀-GI(380) επώαστηκε με πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου, παρουσία ή απουσία 100ng δίκλωνου μη σημασμένου ανταγωνιστή (competitor) όπως φαίνεται σε κάθε διαδρομή (AIVC, CIIIB, "A", AIBPE). Φαίνονται τα προϊόντα της μεταγραφής από την υπό έλεγχο μήτρα (380) και τα δείγματα ελέγχου AdML(180).



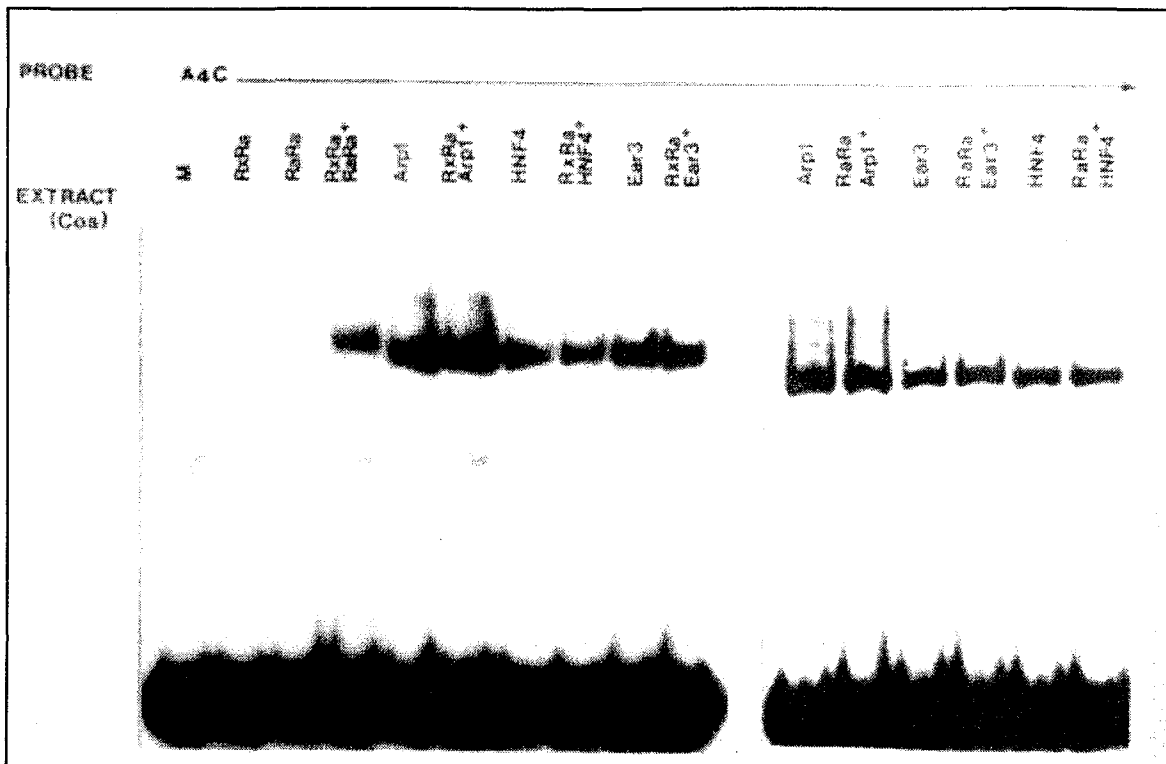
ΕΙΚΟΝΑ A9: Τα μακρινά (upstream) ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου apoCIII ενισχύουν τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του apoAIV σε κύτταρα. Τα κύτταρα HepG2 και CaCo2 διαμολύνθηκαν με 2 µg DNA των πλασμιδίων αναφοράς που παρουσιάζονται διαγραμματικά στο αριστερό μέρος της εικόνας, παρουσία (+) ή απουσία (-) 2 µg DNA του φορέα έκφρασης pCB-HNF-4. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές της ενεργότητας CAT (η τυπική απόκλιση των οποίων δεν ξεπερνά το 10 %) από πέντε επαναλήψεις των πειραμάτων και δύο διαφορετικές παρασκευές των αντίστοιχων πλασμιδιακών κατασκευών. Οι τιμές παρουσιάζονται σε συσχετισμό με τις τιμές που πήραμε με την κατασκευή AIV-CAT.

	AdML	HepG2		Caco2	
		-	+	-	+
1	pML-44-CAT	1,0	1,2	1,0	1,0
2	[CIII J-F] ML-44-CAT	5,1	6,4	5,4	5,8
3	AIVC ML-44-CAT	1,3	3,3	1,4	2,8
4	[CIII J-F] AIVC ML-44-CAT	23,1	148,0	15,1	118,0
5	CIIIB ML-44-CAT	1,5	4,3	2,6	4,9
6	[CIII J-F] CIIIB ML-44-CAT	34,5	198,0	30,0	192,0

ΕΙΚΟΝΑ Α10: Τα απομακρυσμένα (upstream) ρυθμιστικά στοιχεία του αρCIII ενισχύουν την HNF-4 εξαρτώμενη μεταγραφή που επάγεται από χιμαιρικούς υποκινητές που περιλαμβάνουν μεμονωμένες θέσεις πρόσδεσης για HNF-4. Κύτταρα HepG2 και CaCo2 διαμολύνθηκαν με 2 μg DNA των πλασμιδίων αναφοράς που φαίνονται σχηματικά στο αριστερό μέρος της εικόνας, παρουσία (+) ή απουσία (-) 2 μg DNA από το φορέα έκφρασης pCB-HNF-4. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές της ενεργότητας CAT (η τυπική απόκλιση των οποίων δεν ξεπερνά το 10 %) από τέσσερις επαναλήψεις των πειραμάτων και δύο διαφορετικές παρασκευές των αντίστοιχων πλασμιδιακών κατασκευών. Οι τιμές παρουσιάζονται σε συσχέτισμό με τις τιμές που πήραμε με την κατασκευή pML-44-CAT.



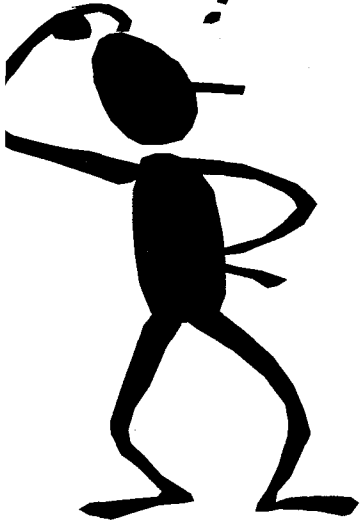
ΕΙΚΟΝΑ A11: Η ανταγωνιστική δράση των HNF-4 και COUP-TFII Ear-3 στη μεταγραφή του γονιδίου αρoAIV. κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν με 2 μg DNA της κατασκευής [CIII_{3-F}]AIV-CAT (A και B) ή 2 μg DNA της κατασκευής [CIII_{3-F}]AIVCM-CAT η οποία περιλαμβάνει τη μεταλλαγμένη θέση πρόσδεσης του HNF-4 (C). Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές της ενεργότητας CAT (η τυπική απόκλιση των οποίων δεν ξεπερνά το 10 %) (normalized CAT activity %) από τρεις επαναλήψεις των πειραμάτων και δύο διαφορετικές παρασκευές των αντίστοιχων πλασμιδιακών κατασκευών. Οι τιμές παρουσιάζονται σε συσχέτισμό με τις τιμές που πήραμε με την [CIII_{3-F}]AIV-CAT κατασκευή. Η κλίμακα είναι διαφορετική στο τμήμα C της εικόνας.



ΕΙΚΟΝΑ Α12: Ηλεκτροφόρηση υστέρησης κινητικότητας για τη θέση A4C (probe), παρουσία διάφορων συνδυασμών από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (extract) κυττάρων Cos:Arp1, Cos:COUP-TFI, Cos:HNF-4, Cos:RxRa και Cos:RaRa.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

**Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΗΝF-4
ΣΕ ΤΥΡΟΣΙΝΗ ΕΙΝΑΙ
ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΟΥ ΣΤΟΥΣ
ΣΤΟΧΟΥΣ ΤΟΥ, ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗ
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΤΟΥ
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ**



ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Αν και ο HNF-4 εκφράζεται σε συγκεκριμένους ιστούς, έχει εξίσου καλή μεταγραφική ενεργότητα σε διάφορες κυτταρικές σειρές ακόμα και σε κάποιες που δεν είναι ηπατικής προέλευσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν απαιτούνται ηπατοειδικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις για τη δράση του.

Εντούτοις είναι γνωστή η αντίφαση μεταξύ του προβλεπόμενου μεγέθους της πρωτεΐνης βάση της αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου (50.6 kDa) και του μεγέθους που καθορίστηκε μετά από PAGE (54kDa) (136). Μια τέτοια διαφορά θα μπορούσε να ερμηνευτεί από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Η πιο συνήθης μετα-μεταφραστική τροποποίηση που έχει δείχτει να επηρεάζει την ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση είναι η φωσφορυλίωση (52). Με εξαίρεση κάποιους μεταβιβαστές σήματος (31, 61, 129, 133, 134), ο πιο κοινός τύπος φωσφορυλίωσης έχει στόχο αμινοξέα σερίνης και θρεονίνης (52). Τρεις είναι σε γενικές γραμμές τα σημεία στα οποία μπορεί η φωσφορυλίωση να ρυθμίζει την ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων:

- ⊗ Στην ικανότητα των παραγόντων να προσδένονται σε DNA όπως έχει δείχτει για τους jun-fos, oct1 (11, 51).
- ⊗ Στην ικανότητα τους να επάγουν τη μεταγραφή όπως έχει δείχτει για τους RxRs, PR, ER (150, 164).
- ⊗ Στη μετάβασή τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπως έχει δείχτει για τους STATs (60, 93, 130).

Οι τρεις αυτές συνιστώσες δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενες αλλά συχνά συναντάμε συνδυασμούς τους, έτσι ώστε η δράση κάποιου μεταγραφικού παράγοντα να ρυθμίζεται σε περισσότερα από ένα επίπεδα.

Η εξέχουσα θέση που καταλαμβάνει ο HNF-4 στην ιεραρχία των μεταγραφικών ρυθμίσεων των ηπατοειδικά εκφραζόμενων γονιδίων, ήταν το έναυσμα για να μελετήσουμε τον πιθανό ρόλο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στο μόριό του που ενδεχομένως τροποποιούν τη δράση του.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HNF-4 ΦΩΣΦΟΥΛΙΩΝΕΤΑΙ ΣΕ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

Με σκοπό να διαπιστώσουμε κατ' αρχήν αν ο HNF-4 φωσφορυλιώνεται, καλλιεργήσαμε κύτταρα HepG2 και Cos1 που είχαν διαμολυνθεί με HNF-4 (Cos:HNF-4), παρουσία [³²P] ορθοφωσφόρου και παρουσία / απουσία genistein. Η genistein είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει επιλεκτικά τη φωσφορυλίωση σε τυροσίνη (1). Από τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν σε κάθε περίπτωση, ανοσοκατακρήνισαμε την πρωτεΐνη HNF-4 με αντίσωμα που αναγνωρίζει επιλεκτικά τον HNF-4 και μετά από ηλεκτροφόρηση και μεταφορά των δειγμάτων σε μεμβράνη ακολούθησε αυτοραδιογραφία. Όπως φαίνεται στην **ΕΙΚΟΝΑ Β1**, τόσο στα κύτταρα HepG2 όσο και στα Cos:HNF-4, ο HNF-4 ήταν σε φωσφορυλιωμένη μορφή, ενώ η παρουσία του φαρμάκου genistein ήταν ικανή να μειώσει στο ελάχιστο το σήμα. Η αχνή ζώνη που μπορούμε να διακρίνουμε μετά την επίδραση της genistein μπορεί να οφείλεται είτε σε φωσφορυλίωση του μορίου σε άλλα κατάλοιπα (θρεονίνης ή σερίνης) ή στη μη πλήρη καταστολή της δράσης των κινασών τυροσίνης που δρουν στο μόριο. Η οριστική επιβεβαίωση ότι έχουμε να κάνουμε με φωσφορυλίωση σε κατάλοιπο τυροσίνης, προέκυψε από σήμανση με αντίσωμα ειδικό για φωσφορυλιωμένη τυροσίνη (PY20). Πράγματι, το ειδικό σήμα που παίρνουμε στα κύτταρα HepG2 και Cos:HNF-4, χάνεται εντελώς στις περιπτώσεις που αυτά μεγάλωσαν παρουσία του φαρμάκου genistein. Σε κάθε περίπτωση η ζώνη που ανιχνεύουμε έχει κινητικότητα που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη 54kDa. Επαναλάβαμε το παραπάνω πείραμα χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά ως ιχνηθέτη ³⁵S-Met. Παρατηρούμε ότι η παρουσία genistein δεν επηρεάζει το σήμα που παίρνουμε μετά την ανοσοκατακρήνιση με HNF-4 αντίσωμα. Μπορούμε, λοιπόν, με ασφάλεια να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο η genistein να επιδρά με άμεσο ή έμμεσο τρόπο στην έκφραση ή σταθερότητα της HNF-4 ή στη βιωσιμότητα των κυττάρων και η μείωση της ζώνης που αντιστοιχεί στον HNF-4 στα προηγούμενα πειράματα να οφείλεται στην τοξικότητα του φαρμάκου.

Η ΦΩΣΦΟΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ HNF-4 ΣΕ ΤΥΡΟΣΙΝΗ ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΝΑ ΠΡΟΣΔΕΝΕΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΣΤΟΧΟΥΣ ΤΟΥ

Το επόμενο βήμα ήταν να ελέγξουμε με ποιο τρόπο ρυθμίζει την ενεργότητα του HNF-4 η φωσφορυλίωσή του σε τυροσίνη. Τα επίπεδα ρύθμισης, σύμφωνα μ'

αυτά που έχουν αναφερθεί για άλλους φωσφορυλιωμένους μεταγραφικούς παράγοντες είναι: πρόσδεση σε DNA, μεταγραφική ενεργότητα και μετάβαση από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

Ξεκινώντας από το επίπεδο της πρόσδεσης του HNF-4 στις αλληλουχίες-στόχους του, παρασκευάσαμε πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2 και Cos:HNF-4 που μεγάλωσαν παρουσία / απουσία genistein. Ελέγξαμε την ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4 από κάθε περίπτωση σε ηλεκτροφόρηση υστέρησης κινητικότητας χρησιμοποιώντας ως ιχνηλάτη σημασμένη με ^{32}P την αλληλουχία πρόσδεσης του HNF-4 στον υποκινητή HNF-1 ("A") όπου είναι γνωστό ότι δεν προσδένεται κανένας άλλος ορμονικός υποδοχέας. Στο τμήμα Α της **ΕΙΚΟΝΑΣ Β2**, διαπιστώνουμε παντελή έλλειψη πρόσδεσης του HNF-4 όταν αυτός προήλθε από κύτταρα που είχαν υποστεί την επίδραση genistein. Αποκλείσαμε και πάλι το ενδεχόμενο να οφείλεται αυτό στην τοξικότητα του φαρμάκου με δύο τρόπους: ελέγξαμε τη δράση του στην πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων και δεν είχε καμία επίδραση. Τέλος, αφαιρέσαμε τη genistein από τα κύτταρα HepG2 και Cos:HNF-4 αφήνοντάς τα να αναπτυχθούν για άλλες 24 ώρες σε κανονικό θρεπτικό μέσο και επανήλθε πλήρως η ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4. Μια δεύτερη προσέγγιση για το ρόλο της φωσφορυλίωσης σε τυροσίνη προήλθε και πάλι από in vitro πείραμα EMSA (B2B), στο οποίο τα πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα Cos:HNF-4 υπέστησαν επώαση με PTPase (πρωτεϊνική φωσφατάση της τυροσίνης) στους 30°C για 10 λεπτά. Όπως ήταν αναμενόμενο, χάθηκε εντελώς το σύμπλοκο της HNF-4 με τη θέση "A". Το φαινόμενο είναι και πάλι αντιστρεπτό, αφού όταν στο μίγμα της αντίδρασης πρόσδεσης συμπεριλάβαμε τον ειδικό αναστολέα, Na_3VO_4 (βανάδιο), του ενζύμου σε κατάλληλη συγκέντρωση, η HNF-4 είχε την αναμενόμενη ικανότητά της για πρόσδεση. Μια τρίτη προσέγγιση του ερωτήματος φαίνεται στο τμήμα C της εικόνας Β2. Πυρηνικά εκχυλίσματα από Cos:HNF-4 επωάστηκαν πριν τις αντιδράσεις πρόσδεσης με αυξανόμενες ποσότητες P-tyr αντισώματος επάγοντας μια αντίστοιχα μειωνόμενη πρόσδεση του HNF-4 στο στόχο του. Όταν η προσθήκη του αντισώματος συνοδεύτηκε με την προσθήκη P-Tyr-αγαρόζης, που δεσμεύει επιλεκτικά το αντίσωμα, το σύμπλοκο του HNF-4 με τη θέση "A" επανεμφανίστηκε. Τέλος, ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε προ-ανοσοποιημένος ορός για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο κάποιο άλλο συστατικό του ορού να αλληλεπιδρά με τον HNF-4. Πράγματι, όπως φαίνεται στη διαδρομή 4 του C, η παρουσία προ-ανοσοποιημένου ορού δεν επηρέασε καθόλου την πρόσδεση του HNF-4. Μπορούμε

να συμπεράνουμε από τα παραπάνω πειράματα ότι η φωσφορυλίωση του HNF-4 σε τυροσίνη είναι προϋπόθεση για την πρόσδεσή του σε DNA.

Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ HNF-4 ΣΕ ΤΥΡΟΣΙΝΗ ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ

Το ερώτημα που θέσαμε στη συνέχεια ήταν το αν και κατά πόσο η φωσφορυλίωση επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4 (**ΕΙΚΟΝΑ Β3**). Κύτταρα HepG2 και Cos1 διαμολύνθηκαν με κατασκευή στην οποία το γονίδιο CAT βρίσκεται υπό τον έλεγχο χιμαιρικού υποκινητή που περιλαμβάνει 4 αντίγραφα της θέσης "A" μπροστά από τον ελάχιστο υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης (4xA-TK CAT). Τα κύτταρα HepG2 έχουν ενδογενή HNF-4 ενώ τα κύτταρα Cos1 συνδιαμολύνθηκαν με φορέα έκφρασης του HNF-4 (pCBHNF-4). Ως βασικά επίπεδα ενεργοποίησης θεωρήσαμε αυτά που οφείλονται στην κατασκευή TK-CAT. Παρουσία HNF-4, η κατασκευή 4xA TRH CAT δίνει πολύ υψηλά επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Η ενεργότητα πέφτει στα 20 % και 7 % στα κύτταρα HepG2 και Cos1 αντίστοιχα όταν η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε παρουσία genistein ενώ στα κύτταρα όπου μετά από 24 ώρες αφαιρέσαμε το φάρμακο και τα αφήσαμε να αναπτυχθούν σε κανονικό μέσο η ενεργότητα επανήλθε σχεδόν πλήρως στα αρχικά επίπεδα. Το αποτέλεσμα που βλέπουμε δηλαδή δεν οφείλεται στην τοξικότητα του φαρμάκου μια και η δράση του είναι αντιστρεπτή. Αυτό αποδείχτηκε και από το γεγονός ότι δεν είχε καμιά επίδραση στη μεταγραφή της RSV-CAT κατασκευής όπου το γονίδιο CAT βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού Rous sarcoma. Αυτό δείχνει ότι η παρουσία genistein δεν επηρεάζει με μη ειδικό τρόπο τη μεταγραφική μηχανή ή τη βιωσιμότητα των κυττάρων, αλλά η δράση της είναι ειδική για τον HNF-4.

Για επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων μας, μελετήσαμε τη δράση του HNF-4 αυτή τη φορά σε ένα ενδογενές γονίδιο-στόχο του HNF-4. Είναι γνωστό ότι ο HNF-4 είναι ο βασικός μεταγραφικός ρυθμιστής του γονιδίου HNF-1 (66, 70, 148). Επιλέξαμε την κυτταρική σειρά Cos-1 όπου κανένας από τους δύο δεν εκφράζεται. Διαμολύναμε τα κύτταρα με το φορέα έκφρασης pCBHNF-4 και ελέγξαμε την ενεργοποίηση του γονιδίου HNF-1 σε EMSA χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή ολιγονουκλεοτίδιο που περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του HNF-1 από τον υποκινητή της αλβουμίνης (AlbPE). Η παρουσία του HNF-4, και μόνο, στα κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του «σιωπηλού» HNF-1 γονιδίου μια και τα αντίστοιχα πυρηνικά εκχυλίσματα έδωσαν ζώνη μειωμένης κινητικότητας με την

AlbPE θέση που είναι η αλληλουχία πρόσδεσης του HNF-1. Βεβαιωθήκαμε ότι πρόκειται για ειδική σύνδεση του HNF-1 χρησιμοποιώντας αφενός μεν ως κρύο ανταγωνιστή το AlbPE (που εξαφανίζει το σύμπλοκο) και αφετέρου το αντίσωμα abHNF-1 (που έχει σαν αποτέλεσμα τη μερική ανύψωση του συμπλόκου) (B2D). Στο τμήμα E της εικόνας B2, παρατηρούμε ότι στα εκχυλίσματα που έχουν προέλθει από κύτταρα που μεγάλωσαν παρουσία genistein δε σχηματίζεται σύμπλοκο μειωμένης κινητικότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γονίδιο HNF-1 παραμένει «σιωπηλό», όπως ήταν αναμενόμενο αφού η genistein οδηγεί σε απενεργοποίηση του HNF-4.

Επαναλάβαμε το πείραμα σε κύτταρα HepG2 όπου επίσης παρατηρήσαμε ότι η παρουσία genistein στην κυτταροκαλλιέργεια εξαφάνισε αντιστρεπτά το σύμπλοκο του HNF-1 με το στόχο του. Διαμόλυνση των κυττάρων Cos-1 -παρουσία ή απουσία genistein- με pCBHNF-1 και έλεγχος της πρόσδεσης του HNF-1 με το στόχο του. Όπως φαίνεται στην εικόνα B2E, η πρόσδεση του HNF-1 στο στόχο του δεν επηρεάζεται καθόλου από την παρουσία της genistein κατά την καλλιέργεια των κυττάρων.

Για να διασταυρώσουμε αυτά τα αποτελέσματα, διαμολύναμε κύτταρα Cos-1 με pCBHNF-4 και κατασκευή όπου το γονίδιο CAT αποκρίνεται στην πρόσδεση του HNF-1 (3xAlbPE AdML CAT). Όπως διαπιστώσαμε στο πείραμα της **ΕΙΚΟΝΑΣ Β3C**, η παρουσία HNF-4 στα κύτταρα ήταν ικανή και αναγκαία για την ενεργοποίηση του HNF-1, γεγονός που διαπιστώνεται έμμεσα από την ενεργοποίηση του 3xAlbPE AdML CAT. Όπως ήταν αναμενόμενο, η παρουσία genistein στην καλλιέργεια των κυττάρων ήταν αρκετή για την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου HNF-1 με τρόπο αντιστρεπτό.

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η φωσφορυλίωση του HNF-4 σε τυροσίνη είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόσδεση και επακόλουθα, όπως ήταν αναμενόμενο, για τη μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης.

ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΟΥ HNF-4 ΣΕ HEPG2 ΚΑΙ COS1 ΚΥΤΤΑΡΑ

Το τρίτο επίπεδο ρύθμισης της δράσης ενός μεταγραφικού παράγοντα μέσω φωσφορυλίωσης είναι η μετάβασή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Βέβαια κάτι τέτοιο έχει δεχτεί στην περίπτωση των πρωτεϊνών STAT οι οποίες μετά από επαγωγή από κυττοκίνη ή αυξητικό παράγοντα, φωσφορυλιώνονται ενώ ακόμα βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση οδηγεί στη μετάβασή τους στον πυρήνα (31, 61, 129, 133, 134). Είναι βέβαια γνωστό από μελέτες στο δικό μας και σε άλλες ερευνητικές ομάδες ότι ο HNF-4 δεν απαιτεί

κανένα από τα γνωστά εξωκυτταρικά σήματα για τη δράση του. Σκεφτόμενοι, όμως, ότι παρόλα αυτά η φωσφορυλίωσή του σε τυροσίνη μπορεί να καθορίζει την ενδοκυτταρική του τοποθέτηση, προχωρήσαμε στα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω.

Κύτταρα HepG2 και Cos:HNF-4 που μεγάλωσαν παρουσία ή απουσία genistein υποβλήθηκαν σε έμμεσο ανοσοφθορισμό *in situ*. Χρησιμοποιήσαμε ως πρώτο αντίσωμα το abHNF-4, ενώ ως δεύτερο το GaR FITC. Στην **ΕΙΚΟΝΑ Β4** παρατηρούμε ότι και στους δύο κυτταρικούς τύπους το σήμα του HNF-4 είναι αποκλειστικά πυρηνικό ακόμα και παρουσία genistein. Συμπεραίνουμε δηλαδή ότι η φωσφορυλίωση του HNF-4 σε τυροσίνη δεν είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του στον πυρήνα. Παρατηρώντας όμως τα ανοσοφθορίζοντα κύτταρα σε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις παρατηρήσαμε μια εντυπωσιακή διαφορά στην κατανομή του HNF-4 όταν τα κύτταρα είχαν αναπτυχθεί παρουσία genistein. Απουσία του φαρμάκου, το σήμα του HNF-4 φαινόταν εντοπισμένο (ομαδοποιημένο) σε 5-15 τέτοιες περιοχές, πάντα μέσα στον πυρήνα, τόσο στα κύτταρα HepG2 όσο και στα Cos:HNF-4. Η επώαση των κυττάρων με genistein ήταν ικανή να μετατρέψει το διάστικτο μοτίβο σε διάχυτο σήμα σ' ολόκληρο τον πυρήνα.

ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΟΥ HNF-4 ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Για να μελετήσουμε σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια την κατανομή του HNF-4 στον πυρήνα, προχωρήσαμε στην παρατήρηση των δειγμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου μπορούμε να έχουμε μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. Σε λεπτές τομές από ιζήματα κυττάρων HepG2 έπεξεργασμένων και μη με genistein επιδράσαμε αρχικά με abHNF-4 και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με κόκκους χρυσού διαμέτρου 10 ή 20 Å. Στις περισσότερες τομές μπορέσαμε να εντοπίσουμε 1-3 συσσωρεύσεις η κάθε μια από τις οποίες περιελάμβανε 20-40 κόκκους χρυσού. Παρουσία genistein το σήμα έγινε διάχυτο, ενώ σε κάθε περίπτωση το κυτταρόπλασμα ήταν τελείως απαλλαγμένο από ανοσοσώματα (**ΕΙΚΟΝΑ Β5Α**). Στο τμήμα Β της ίδιας εικόνας μπορούμε να παρατηρήσουμε σε μεγαλύτερη μεγέθυνση περιοχές ανοσοσυσσωρεύσεως στον πυρήνα. Τα αποτελέσματα της παρατήρησης σε EM έρχονται να επιβεβαιώσουν το κοκκιδόμορφο μοτίβο που είδαμε σε πειράματα ανοσοφθορισμού.

Για να εξαλείψουμε και την παραμικρή υποψία ότι η genistein μπορεί να προκαλεί κάποιες μεταβολές στην αρχιτεκτονική του πυρήνα, έχουμε να αντιπαραθέσουμε τα εξής:

A. Η δράση της genistein οδηγεί σε αντιστρεπτά αποτελέσματα αφού όταν απομακρύνθηκε μετά από 24 ώρες από την καλλιέργεια, επανήλθε πλήρως το διάστικτο μοτίβο ενδοπυρηνικής κατανομής του HNF-4.

B. Χρησιμοποιήσαμε στο δείγμα ελέγχου το Y12 αντίσωμα (79), ως ανιχνευτή μικρών πυρηνικών νουκλεοπρωτεϊνών που ενέχονται στη συρραφή του pre-mRNA, το οποίο είναι γνωστό ότι δίνει χρώση ίδιου μοτίβου (138, 139). Στο τελευταίο, η παρουσία του genistein δε φάνηκε να έχει καμία επίδραση, και τέλος,

Γ. Παρατηρώντας τόσο την πυρηνική όσο και την κυτταροπλασματική δομή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δε βλέπουμε καμιά μεταβολή παρουσία genistein.

Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η αλλαγή στην ενδοπυρηνική τοποθέτηση του HNF-4 παρουσία της genistein οφείλεται στην καταστολή της φωσφορυλίωσης σε τυροσίνη. Δεν μπορούμε βέβαια με τα μέχρι τώρα δεδομένα μας, να αποφανθούμε για το αν το φαινόμενο αυτό συσχετίζεται με αυτή καθαυτή τη φωσφορυλίωση της HNF-4 ή κάποιας άλλης βοηθητικής πρωτεΐνης. Μια τέτοια θα μπορούσε να είναι κάποια πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας την οποία μπορούμε να φανταστούμε να αλληλεπιδρά με τον HNF-4 κατευθύνοντάς τον στις περιοχές συνάθροισής του.

Δεν είναι η πρώτη φορά που διαπιστώνεται τέτοιου τύπου διαμερισματοποίηση στον πυρήνα. Στο παρελθόν έχει περιγραφεί κάτι ανάλογο για πυρηνικές ενεργότητες που σχετίζονται με σύνθεση DNA ή RNA ή συρραφή του RNA οι οποίες φαίνεται να συγκεντρώνονται σε διακριτές ενδοπυρηνικές περιοχές (138, 139, 17, 55, 98). Οι καλύτερα μελετημένοι τέτοιοι παράγοντες είναι αυτοί που συμμετέχουν στη συρραφή του RNA που συνδέονται με δομές όπως perichromatin fibrils (που αντιστοιχούν στα *in situ* εν τω γίνεσθαι ετερογενή πυρηνικά RNA μετάγραφα), interchromatin granules και coiled bodies (55, 163). Η PML, μια πυρηνική πρωτεΐνη που είναι γνωστή για τη συμμετοχή της στην t 15;17) χρωμοσωμική μετάθεση που συναντάται στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία, φαίνεται να είναι με ανάλογο τρόπο διαμερισματοποιημένη στα λευχαιμικά κύτταρα (35, 63, 158). Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν PML-ρετινοϊκό υποδοχέα, μια σύνθετη πρωτεΐνη που εμφανίζεται σε πολλά μικρά ενδοπυρηνικά συσσωματώματα. Μετά από χορήγηση ρετινοϊκού οξέος, η PML επανατοποθετείται στον πυρήνα σε δομές άγνωστης λειτουργίας που ονομάζονται nuclear bodies (158). Ανάλογες αλλά σίγουρα όχι ταυτόσημες δομές εμφανίζει ο ανοσοφθορισμός του HNF-4 με αυτόν της PML.

Το μοντέλο που προτείνουμε είναι ότι η HNF-4 τοποθετείται σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές του πυρήνα (γονίδια-στόχοι) αν και δεν μπορούμε να πούμε ποιο είναι το αίτιο και ποιο το αιτιατό σ' αυτή τη διαδικασία.

Η ενεργοποίηση γονιδίων είναι κυτταρική λειτουργία που απαιτεί την ταυτόχρονη παρουσία διάφορων γενικών και ειδικών μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τις cis αλληλουχίες των υποκινητών των αντίστοιχων γονιδίων.

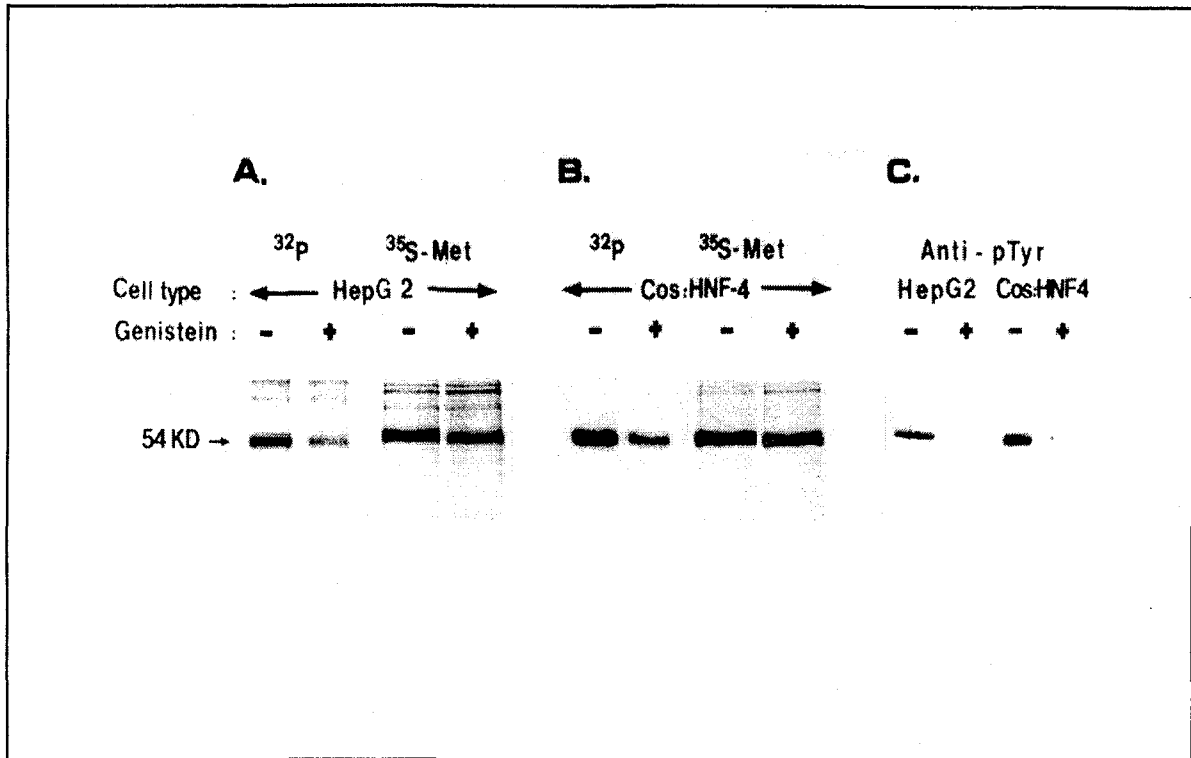
Η παρουσία των παραγόντων αυτών είναι σε περιοριστικά ποσά και μπορούμε να φανταστούμε ότι αν ήταν και τυχαία διεσπαρμένοι στο νουκλεόπλασμα η τοπική συγκέντρωσή τους στις θέσεις δράσης τους θα ήταν εξαιρετικά χαμηλή. Η ομαδοποιημένη κατανομή των μεταγραφικών παραγόντων που θα είχε σαν αποτέλεσμα την τοπικά αυξημένη συγκέντρωσή τους γύρω από τις αλληλουχίες-στόχους τους, είναι ένας τρόπος με τον οποίο θα μπορούσε το κύτταρο να εξασφαλίσει μια αποδοτική μεταγραφική μηχανή.

Τέτοιου είδους συναθροίσεις μεταγραφικών παραγόντων, ειδικών και γενικών, RNA πολυμεράσης καθώς και άλλων παραγόντων που συμμετέχουν σε διαδικασίες συσχετιζόμενες με την παραγωγή (μεταγραφή) και την ωρίμανση (συρραφή) των RNAs θα μπορούσαν να οριοθετήσουν περιοχές μέσα στο νουκλεόπλασμα που, όσο κι αν δεν είναι δόκιμος ο όρος, θα τις ονομάζαμε "transcription factories" («εργοστάσια μεταγραφής»). Έτσι, όπως έχει περιγραφεί για κάθε άλλο κυτταρικό οργανίδιο, και ο πυρήνας δεν είναι ένα δοχείο με ένζυμα και DNA, αλλά με μια πολύ αποτελεσματική διαμερισματοποίησή του, διαδικασίες όπως η μεταγραφή, συμβαίνουν σε συγκεκριμένες περιοχές του.

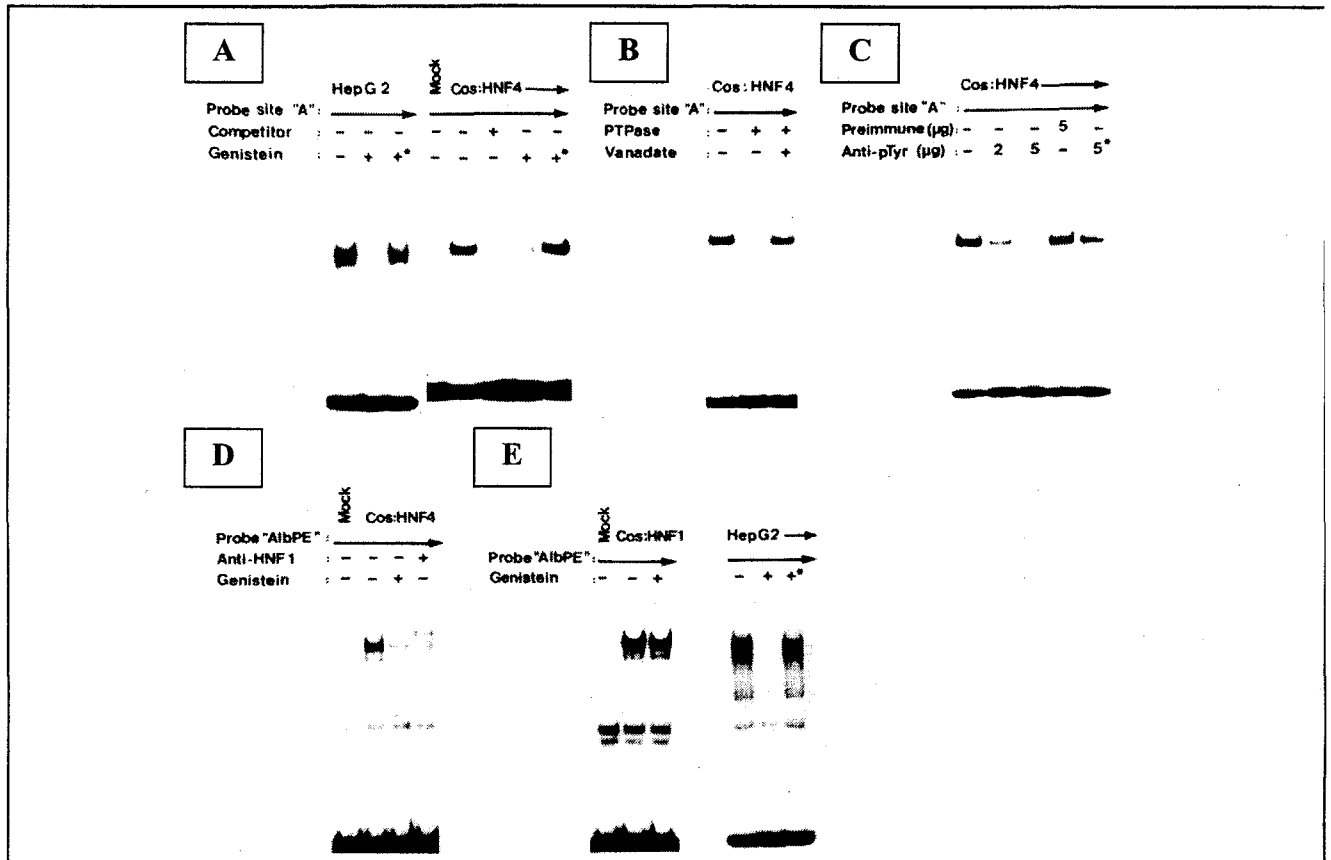
Αν τα παραπάνω αληθεύουν, προστίθεται κι ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης της δράσης ενός μεταγραφικού παράγοντα: δεν είναι δηλαδή ρυθμιζόμενη μόνο η ματάβασή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση (όπως συμβαίνει για παράδειγμα στους παράγοντες STATs) αλλά και η ενδοπυρηνική του τοποθέτηση. Συγκεκριμένα για τον HNF-4, δεν μπορούμε με τα μέχρι τώρα δεδομένα να αποφανθούμε αν η κινάση τυροσίνης που καθορίζει την τοπολογία του HNF-4 στον πυρήνα δρα σ' αυτό καθαυτό το μεταγραφικό παράγοντα ή σε κάποια πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας, ούτε αν αυτή η δράση είναι συνεχής ή επαγόμενη.

Το φαινόμενο μπορεί να είναι ακόμα πιο πολύπλοκο αν, πηγαίνοντας άλλο ένα βήμα πίσω, μελετήσουμε τη ρύθμιση της έκφρασης και δράσης της κινάσης αυτής τόσο κατά τη διαφοροποίηση όσο και σε σχέση με τα εξωτερικά σήματα που δέχεται ένα ηπατοκύτταρο. Όσο κι αν φαίνεται ότι τέτοιες σκέψεις αυξάνουν την εντροπία

του συστήματος, στην πραγματικότητα οδηγούν στη συμπλήρωση του puzzle του καθορισμού και της διατήρησης του ηπατικού φαινοτύπου.



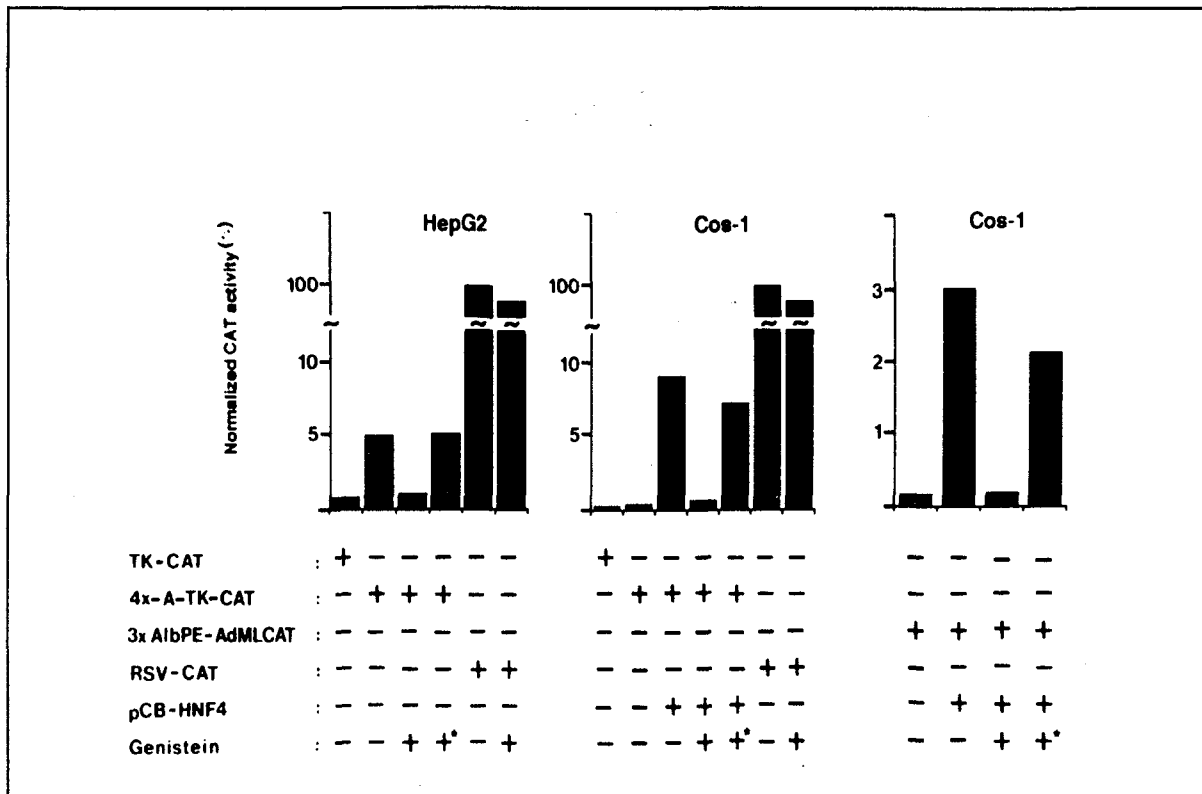
ΕΙΚΟΝΑ Β1: Ο HNF-4 φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπο τυροσίνης. HepG2 (**A**) και κύτταρα Cos1 που είχαν διαμολυνθεί με φορέα έκφρασης pCB-HNF-4 (**B**) επωάστηκαν για 2 ώρες με [^{32}P] ορθοφώσφορο ή [^{35}S] μεθειονίνη, παρουσία (+) ή απουσία (-) του φαρμάκου genistein σε τελική συγκέντρωση 15μg/ml. Το φάρμακο προστέθηκε στην καλλιέργεια 1 ώρα πριν την προσθήκη του ^{32}P και 48 ώρες πριν τη σήμανση με ^{35}S . Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ανοσοκατακρήμνιστηκαν με πολυκλωνικό αντίσωμα για τον HNF-4 και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Στο τμήμα **C** της εικόνας τα κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2 κύτταρα και Cos1 διαμολυσμένα με HNF-4 μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα για HNF-4, SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση και ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, βάφτηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-φωσφοτυροσίνης PY20 (anti-pTyr) συνδεδεμένο με περοξειδάση αγριοράπανου (horseradish peroxidase).



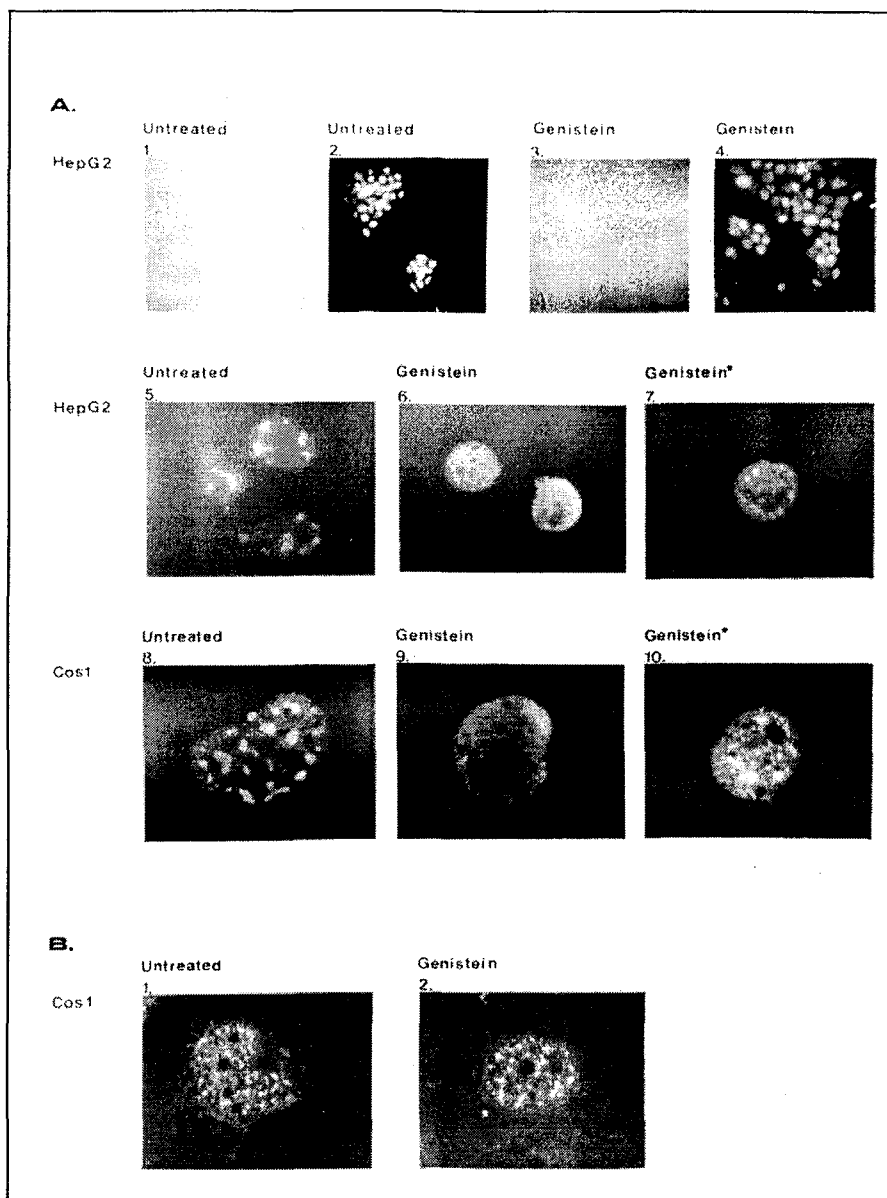
ΕΙΚΟΝΑ Β2: Στα τμήματα A, B, C της εικόνας: Η φωσφορυλίωση τυροσίνης ρυθμίζει την ικανότητα της HNF-4 να προσδένεται στους στόχους της. Στο A, πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2 και Cos1 διαμολυσμένα με pCB-HNF-4 αναλύθηκαν σε EMSA πείραμα όπου χρησιμοποιήσαμε ως ανιχνευτή (probe) την θέση πρόσδεσης του HNF-4 από τον υποκινητή HNF-1 ("A"). Στα κύτταρα επιδράσαμε με genistein (15μg/ml) για 48 ώρες (+), ξεπλύθηκαν με πλήρες μέσο ανάπτυξης και επώαστηκαν για άλλες 24 ώρες (+*) πριν την παρασκευή των πυρηνικών εκχυλισμάτων. Στο B, τα πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα Cos1 που είχαν διαμολυνθεί με pCB-HNF-4 επώαστηκαν πριν τις αντιδράσεις πρόσδεσης με 10 units καθαρισμένης πρωτεϊνικής φωσφατάσης της τυροσίνης 1B (PTPase; Upstate Biotechnology) στους 30°C παρουσία ή απουσία 1mM Na₃VO₄ (sodium vanadate) για 10 λεπτά. Στο C, πριν τις αντιδράσεις πρόσδεσης, τα ίδια πυρηνικά εκχυλίσματα προεπώαστηκαν στον πάγο με 2 ή 5 μg πολυκλωνικού αντισώματος ειδικού για φωσφοτυροσίνη (4G10; Upstate Biotechnology) ή 5μg προανοσοποιημένου αντιορού, για 3 ώρες. Στη διαδρομή που σημειώνεται με αστερίσκο, το αντίσωμα για φωσφοτυροσίνη προεπώαστηκε με 10mM phosphotyrosine agarose πριν να επιδράσουμε μ' αυτό στα εκχυλίσματα.

Στα τμήματα D, E της εικόνας: Η παρουσία ενεργού HNF-4 στα κύτταρα Cos1, επάγει την έκφραση του γονιδίου HNF-1. Cos1 κύτταρα διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης pCB-

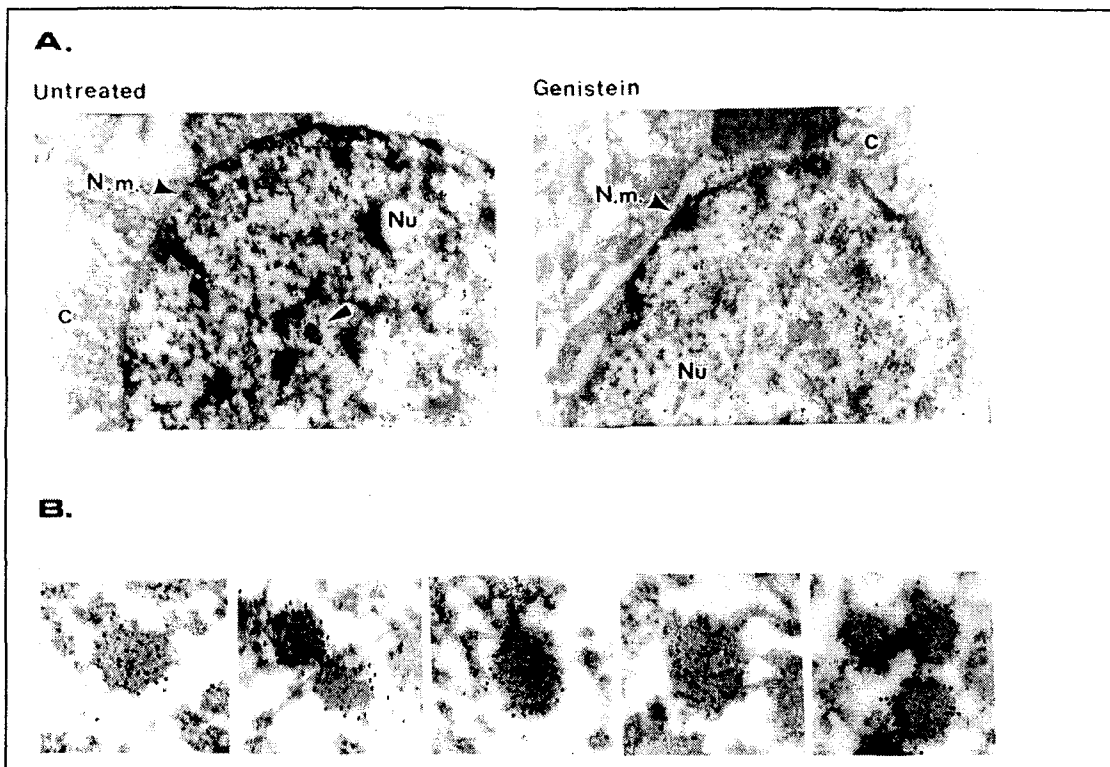
HNF-4 (D), ή pCB-HNF-1(E) και επώαστηκαν παρουσία (+) ή απουσία (-) genistein σε τελική συγκέντρωση 15μg/ml. Από τα κύτταρα αυτά παρασκευάστηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα 48 ώρες μετά τη διαμόλυση και αναλύθηκαν σε EMSA πάνω στη ραδιοσημασμένη θέση πρόσδεσης του HNF-1 στον υποκινητή της αλβουμίνης (AlbPE). Στην τελευταία διαδρομή του D, συμπεριλήφθηκε και 1 μl αντισώματος για τον HNF-1 σε αραιώση 1:6. Στο δεύτερο τμήμα του D μπορούμε να παρατηρήσουμε τα αποτελέσματα πειράματος EMSA με εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2 που επεξεργαστήκαμε όπως έγινε και με τα δείγματα της εικόνας A.



ΕΙΚΟΝΑ Β3: Ανάλυση της HNF-4-εξαρτώμενης μεταγραφής. Κύτταρα HepG2 και Cos1 διαμολύθηκαν με 2 µg DNA γονιδίων αναφοράς CAT όπου η μεταγραφή καθοδηγείται από τον ελάχιστο υποκινητή της θυμιδινικής κινάσης (TK-CAT), 4 αντίγραφα της θέσης "A" σε ακολουθία με τον υποκινητή TK (4xA-TK-CAT), τρία αντίγραφα της θέσης AlbPE σε ακολουθία με τον adenovirus major late υποκινητή (3xAlbPE-AdML-CAT) ή με τον υποκινητή του ιο.υ Rous sarcoma (RSV-CAT). Όπου σημειώνεται, τα Cos1 κύτταρα διαμολύθηκαν και με 2 µg DNA του φορέα έκφρασης pCB-HNF-4. Μετά το shock γλυκερόλης, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία (+) ή απουσία (-) του φαρμάκου genistein σε τελική συγκέντρωση 15 µg/ml για 40 ώρες. Σε κάποιες καλλιέργειες (+*) το θρεπτικό μέσο αλλάχτηκε και τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν για άλλες 24 ώρες. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των κανονικοποιημένων ενεργοτήτων CAT (normalized CAT activity %) από τουλάχιστον τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα και εκφράζονται ως ποσοστό της ενεργότητας του δείγματος ελέγχου RSV-CAT.



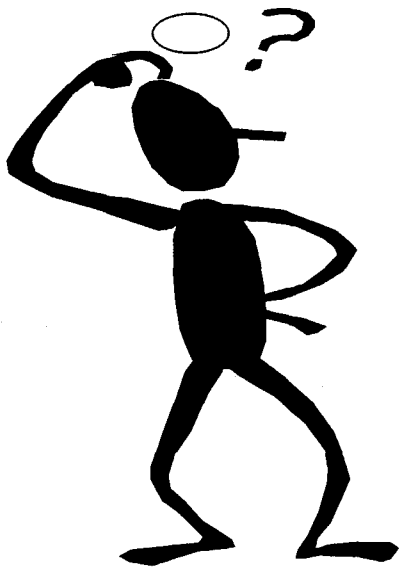
ΕΙΚΟΝΑ Β4: Ανοσοεντοπισμός του HNF-4 σε κύτταρα HepG2 και Cos1. Τα κύτταρα Cos1 μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες όπου διαμολύνθηκαν με φορέα έκφρασης pCBHNF-4 και επώστηκαν απουσία (-) (untreated) ή παρουσία (+) genistein σε τελική συγκέντρωση 15 µg/ml για 48 ώρες. Οπου αναφέρεται, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με πλήρες θρεπτικό μέσο και επώστηκαν για άλλες 24 ώρες (*genistein). Την ίδια επεξεργασία υπέστησαν και τα κύτταρα HepG2. Ο ανοσοεντοπισμός έγινε με anti-HNF-4 (**A**) ή με anti-Sm μονοκλωνικό αντίσωμα Y12 (**B**). Στο A, τα 1 και 3 αντιστοιχούν στις phase contrast εικόνες των 2 και 4 αντίστοιχα. Οι μεγεθύνσεις είναι x60 για τα δείγματα A 1-4, και για τα A 5-10 και B x650.



EΙΚΟΝΑ B5: Ανοσοεντοπισμός του HNF-4 με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε κύτταρα HepG2. Υπέρλεπτες τομές κυττάρων HepG2 που είχαν υποστεί (genistein) ή όχι (untreated) επεξεργασία με genistein (με συνθήκες ίδιες μ' αυτές των πειραμάτων της εικόνας B4), βάφτηκαν με αντί-HNF-4 και μελετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. **A:** χαμηλής μεγέθυνσης εικόνα πυρήνων παρουσία ή απουσία genistein. Τα βέλη δείχνουν τις περιοχές εντοπισμού του HNF-4 μέσα στον πυρήνα. Συμβολισμοί: N.m (πυρηνική μεμβράνη), Nu (πυρήνας), C (κυτταρόπλασμα). Η μεγέθυνση είναι x3600. **B:** μεγαλύτερη μεγέθυνση των περιοχών συνάθροισης του HNF-4 μέσα στον πυρήνα. Η μεγέθυνση σ' αυτά τα δείγματα είναι x28.000.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

**Η ΦΥΣΙΚΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HNF-1 ΜΕ ΤΟΝ
HNF-4 ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΝΤΑΙ
ΑΠΟ ΤΟΝ HNF-4**



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόκειται για έναν από τους σημαντικότερους μεταγραφικούς ρυθμιστές των ηπατοειδικά εκφραζόμενων γονιδίων. Το πιο σύνηθες όνομά του είναι HNF-1, που είναι η σύντμηση του Hepatocyte Nuclear Factor 1, αν και στη βιβλιογραφία συναντάμε συχνά να αναφέρονται σ' αυτόν με τα ονόματα HNF-1α, LF-B1, HP1, APF, και B box protein.

Στον **ΠΙΝΑΚΑ 5** αναφέρονται ενδεικτικά κάποια από τα γονίδια που ρυθμίζει και κάποια άλλα που διαθέτουν στα cis στοιχεία τους συντηρημένη θέση πρόσδεσης για τον HNF-1, άρα δυνητικά ρυθμίζονται απ' αυτόν. Παρατηρούμε μεγάλη ποικιλότητα στο είδος των γονιδίων όσον αφορά στο ρόλο τους σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και στην οργάνωση των υποκινητών και των ενισχυτών που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του HNF-1. Η διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης για τις αλληλουχίες-στόχους του και η συνεργασία του με ποικίλους ιστοειδικούς και γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες σε κάθε περίπτωση, προσδίδουν μια ποικιλομορφία στη δράση του και τον κάνουν να ενέχεται σε πολλές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες και στη διαφοροποίηση πολλών ιστών.

Η συντηρημένη θέση πρόσδεσής του έχει παλινδρομική μορφή, συνήθως ατελή, με δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις που χωρίζονται από μια αδενίνη (90). Είναι γνωστό από εργασίες άλλων ερευνητών ότι ο HNF-1 προσδένεται ως διμερές στις δύο αυτές επαναλήψεις (100, 27). Η ύπαρξη, μετά από ανάλυση με υπολογιστή, λειτουργικών θέσεων πρόσδεσης του HNF-1 σε υποκινητές και ενισχυτές γονιδίων που δεν εκφράζονται καθόλου στο ήπαρ περιέπλεξε λίγο την εικόνα που είχαμε για τον HNF-1 αλλά μπορούν να δοθούν δύο εξηγήσεις: αυτές οι θέσεις μπορεί να είναι ανενεργές λόγω έλλειψης άλλων μεταγραφικών παραγόντων που συνεργάζονται με τον HNF-1 για τη ρύθμιση των συγκεκριμένων γονιδίων. Εναλλακτικά, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο HNF-1 δεν έχει πρόσβαση στις θέσεις αυτές, είτε γιατί είναι μεθυλιωμένες, είτε γιατί η νουκλεοσωμική οργάνωση στην περιοχή αυτή είναι ετεροχρωματινικής φύσεως, κάνοντας αδύνατη τη μεταγραφή των γονιδίων.

Ο HNF-1 απομονώθηκε αρχικά από πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων και βάσει ενός τμήματος της πεπτιδικής αλληλουχίας που προσδιορίστηκε, κλωνοποιήθηκε το cDNA του (8, 5, 41). Λίγο αργότερα κλωνοποιήθηκε μια πολύ παρόμοια πρωτεΐνη με τον HNF-1, η οποία ακούει στο όνομα vHNF-1 (variant HNF-1) (32, 5). Ανιχνεύεται κυρίως σε αποδιαφοροποιημένα κύτταρα ηπατώματος, ενώ φάνηκε να υπάρχει και σε

διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα σε πολύ χαμηλά επίπεδα –τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε σχέση με τα επίπεδα της HNF-1. Η δράση της είναι σε απόλυτη συμφωνία με αυτή της HNF-1 μιας και αναγνωρίζει την ίδια αλληλουχία DNA, προσδέεται ως διμερές, μπορεί να σχηματίζει ετεροδιμερή με την HNF-1 και η οργάνωση του μορίου της είναι πολύ παρόμοια με αυτή του HNF-1 (91).

Για τη δομή του μορίου HNF-1 μπορούμε να συνοψίσουμε τα παρακάτω χαρακτηριστικά (8, 5, 41) :

- Στην αμινοτελική του άκρη εντοπίζουμε μια αλληλουχία 32 αμινοξέων που είναι υπεύθυνα για το διμερισμό του μορίου και αποτελείται από δύο α-έλικες
- Ακολουθεί το domain B του οποίου ο ρόλος –όπως προέκυψε από τη μελέτη των αντίστοιχων ελλείψεων- είναι αφενός μεν να εμποδίζει την πρόσδεση σε άσχετες αλληλουχίες DNA και αφετέρου είναι υπεύθυνη για τη συνεργατικότητα της πρόσδεσης των δύο μονομερών στις παλινδρομικές αλληλουχίες. Έχειδειχτεί επίσης να έχει δράση ανάλογη με την αλληλουχία POU.
- Ακολουθεί η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA (DNA Binding Domain) η οποία έχει μεγάλη ομολογία με το homeo-domain των γνωστών ομοιοπρωτεϊνών. Αποτελείται από τρεις α-έλικες, η τρίτη από τις οποίες δημιουργεί ειδικές επαφές με τη μεγάλη αύλακα (major groove) του DNA, κατευθύνοντας έτσι τον HNF-1 στην αλληλουχία-στόχο του.
- Το καρβοξυτελικό άκρο είναι υπεύθυνο για τη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-1 και χαρακτηρίζεται από τρεις περιοχές που είναι πλούσιες σε σερίνη, γλουταμίνη και προλίνη.

Όσον αφορά στη δομή του γονιδίου, αξίζει να σημειώσουμε τα παρακάτω:

- ◆ Το γονίδιο του αρουραίου, ποντικού και βατράχου αποτελείται από 9 εξόνια που διακόπτονται από 8 εσόνια.
- ◆ Το γονίδιο του αρουραίου εκτείνεται στις 40.000 βάσεις περίπου.
- ◆ Με *in situ* υβριδοποίηση σε χρωμοσώματα, το γονίδιο εντοπίζεται για τον άνθρωπο και τον αρουραίο στην περιοχή 11q24.3 ενώ για το ποντίκι στην 5F. Το vHNF-1 γονίδιο εντοπίζεται στις περιοχές 17q11.2-q21.1 σε άνθρωπο και αρουραίο ενώ στο ποντίκι στη 11B4.

Το cDNA του HNF-1 έχει κλωνοποιηθεί από πολλούς οργανισμούς όπως ποντίκι, αρουραίο, χάμστερ, άνθρωπο, βάτραχο, σολομό και κόκκορα ενώ του vHNF-1 από ποντίκι, αρουραίο, χοίρο, άνθρωπο και βάτραχο (90). Η ομολογία σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας των μορίων από τους παραπάνω οργανισμούς ξεπερνά το 95% (90).

Η κατανομή του HNF-1 σε διάφορους ιστούς όπως φάνηκε από ανάλυση Northern ήταν στο ήπαρ, επιθηλιακά κύτταρα λεπτού εντέρου, νεφρού, παχέος εντέρου, θύμου, στομάχου και αμνιακού σάκου. Η πρωτεΐνη ανιχνεύεται στο ήπαρ, έντερο, νεφρό και πάγκρεας (162). Ο vHNF-1 έχει την ίδια κατανομή στους ιστούς (σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια κυρίως), αλλά ανιχνεύεται επιπλέον σε χαμηλά επίπεδα και στους πνεύμονες (162, 32). Παρατηρούμε δηλαδή ότι ο HNF-1 εκφράζεται σε πολύ διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Χωρίς να είναι ο κανόνας, οι περισσότεροι από αυτούς είναι ενδοδερμικής προέλευσης, πρόκειται συνήθως για πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν κοινά μεταβολικά μονοπάτια (για παράδειγμα αυτό της γλυκονεογένεσης).

Τόσο για τον HNF-1 όσο και για τον vHNF-1 έχουν κλωνοποιηθεί τρεις ισομορφές που διαφέρουν κυρίως στο καρβοξυτελικό άκρο. Στον άνθρωπο, οι τρεις ισομορφές συνυπάρχουν σε όλους τους ιστούς όπου εκφράζεται ο HNF-1, διαφέρουν όμως τα σχετικά τους επίπεδα (6).

Κατά την απομόνωση του HNF-1, συναπομονώνεται η DcoH, μια μικρή διμερής πρωτεΐνη μεγέθους 11kDa της οποίας ο ρόλος δεν έχει μέχρι τώρα διαλευκανθεί. Οι υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί για τη δράση της σχετίζονται με τη σταθεροποίηση του HNF-1 διμερούς προστατεύοντάς το από αποικοδόμηση ή με τη συνεργατικότητα του στη μεταγραφική δράση του HNF-1. Το πρότυπο έκφρασής της στους διάφορους ιστούς είναι ίδιο με αυτό των HNF-1 και vHNF-1.

Η πρωτεΐνη HNF-1 αρχίζει να εμφανίζεται στις 6.5 μέρες μετά την κύηση (21). Η σχεδόν ταυτόχρονη εμφάνιση του mRNA με τη λειτουργική πρωτεΐνη HNF-1 μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η έκφρασή της ρυθμίζεται κυρίως στο επίπεδο της μεταγραφής (69). Ο υποκινητής του γονιδίου στο ποντίκι και στον αρουραίο έχει θέσεις πρόσδεσης για τον HNF-4, AP1 και HNF-3 (70, 148). Από μελέτες άλλων ομάδων, έχει δείχτει ότι ο κύριος μεταγραφικός ρυθμιστής –ικανός και αναγκαίος- για το γονίδιο HNF-1 είναι ο HNF-4 (70, 148). Το ότι η θέση πρόσδεσης του HNF-4 στον ενισχυτή του HNF-1 αλλά όχι και στον υποκινητή του HNF-1 αποκρίνεται στον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος μπορεί να εξηγήσει το γιατί μετά από επίδραση με ρετινοϊκό οξύ σε κύτταρα τερατοκαρκινώματος F9 εμφανίζεται πρώτα ο vHNF-1 και αργότερα ο HNF-1 (69). Η θνησιμότητα του ποντικού hnf-4^{-/-}, υποδεικνύει ότι η δράση του HNF-4 είναι σημαντική ήδη από την έβδομη μέρα, περίπου δηλαδή όταν εμφανίζεται ο vHNF-1 (26).

Αντίθετα, η απαλοιφή (knock-out) του ενός αλληλομόρφου του HNF-1 γονιδίου δεν έχει καμιά επίδραση στην ανάπτυξη και την επιβίωση του ποντικού

(114). Η απαλοιφή και των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου ($hnf1^{-/-}$) οδηγεί σε διόγκωση του ήπατος, αν και τα επίπεδα του mRNA των γονιδίων στόχων του είναι σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα (όπως για παράδειγμα αυτά της αλβουμίνης και της α1-αντιπρυψίνης), ενώ τα επίπεδα του ν HNF-1 ανεβαίνουν λίγο. Τα ποντίκια πάντως και στην ολική εξάρθρωση του HNF-1 επιβιώνουν (114).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, ο HNF-1 και ο HNF-4 ρυθμίζουν ο καθένας μια πληθώρα ηπατοειδικά εκφραζόμενων γονιδίων (90, 136). Δεν έχουμε όμως να κάνουμε με μονοπάτια, αλλά με πλέγματα μεταγραφικής ρύθμισης μια και ο HNF-4 μεταξύ των άλλων στόχων του είναι ο βασικός μεταγραφικός ενεργοποιητής του γονιδίου HNF-1. Έτσι, έμμεσα, ρυθμίζει και τα HNF-1- εξαρτώμενα γονίδια.

Ο HNF-4 ΠΡΟΣΔΕΝΕΤΑΙ ΣΤΗ ΘΕΣΗ "Α" ΤΟΥ HNF-1 ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ

Στην **ΕΙΚΟΝΑ Γ1** βλέπουμε το αποτέλεσμα της ανάλυσης αποτυπώματος του υποκινητή HNF-1. Η θέση "Α" αντιστοιχεί σε συντηρημένη αλληλουχία-στόχο του HNF-4. Η ακριβής θέση πρόσδεσής του οριοθετήθηκε από το πείραμα παρεμπόδισης σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης όπως φαίνεται στην **ΕΙΚΟΝΑ Γ2**.

Πυρηνικά εκχυλίσματα από την καλλιέργεια κυττάρων CaCo₂, HeLa και από κύτταρα ήπατος, νεφρών και σπλήνας αρουραίου επώαστηκαν με τη ραδιοσημασμένη θέση "Α". Η αυτοραδιογραφία της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (**ΕΙΚΟΝΑ Γ3**) δείχνει ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται στα κύτταρα του ήπατος και σπλήνας καθώς και στην καρκινική σειρά CaCo₂.

ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ apoCIII, apoAI, ΚΑΙ HNF-1 ΡΥΘΜΙΖΟΝΤΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΑΠΟ ΤΟΥΣ HNF-1 & vHNF-1.

Στη συνέχεια σκεφτήκαμε να ελέγξουμε το αν και ο HNF-1 έχει λόγο στην έκφραση των HNF-4 εξαρτώμενων γονιδίων. Επιλέξαμε τους υποκινητές των γονιδίων της απολιποπρωτεΐνης CIII (apoCIII), της απολιποπρωτεΐνης AI (ApoAI) και του HNF-1 που είναι γνωστό ότι αποκρίνονται στην παρουσία του HNF-4. Σε πλασμιδιακές κατασκευές τοποθετήθηκε το γονίδιο CAT υπό τον έλεγχο των παραπάνω υποκινητών. HepG2 κύτταρα που έχουν χαμηλά επίπεδα ενδογενούς HNF-1 επιμολύνθηκαν με τις παραπάνω κατασκευές και παράλληλα με φορείς έκφρασης για τον HNF-1 και τον vHNF-1 σε αυξανόμενες ποσότητες. Η κανονικοποιημένη ενεργότητα CAT σε κάθε περίπτωση στο ιστόγραμμα της **ΕΙΚΟΝΑΣ Γ4** είναι ενδεικτική της δράσης του HNF-1 στην έκφραση του γονιδίου. Αυξανόμενες ποσότητες των HNF-1 και vHNF-1 οδηγούν σε αντιστοίχως μειωνόμενη μεταγραφή του CAT, με πιο δραματικά αποτελέσματα παρουσία του HNF-1 παρά παρουσία του vHNF-1 και στους τρεις υποκινητές που μελετήσαμε.

Η παρουσία του RSV-HNF-1 στα κύτταρα είχε ως συνέπεια τη μείωση της ενεργότητας του αρoCIII (Γ4A), αρoAI (Γ4B) και HNF-1 (Γ4C) υποκινητή στα 3 %, 20 % και 8 % συγκρινόμενη με τα κύτταρα που δεν διαμολύνθηκαν με RSV-HNF-1. Δοκιμάσαμε τα ίδια πειράματα και με CMV-HNF-1 φορέα έκφρασης για να αποκλείσουμε την πιθανότητα αυτό που βλέπουμε να οφείλεται σε κάποιου είδους αλληλεπίδραση των εν λόγω μεταγραφικών παραγόντων με τον RSV υποκινητή. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν αυτά του προηγούμενου πειράματος. Η παρουσία του RSV-vHNF-1 κατέστειλε την ενεργότητα του αρoCIII, αρoAI και HNF-1 στα 18%, 30% και 30% αντίστοιχα.

Για πρώτη φορά ο HNF-1, γνωστός ως τώρα για την ισχυρή ενεργοποίηση που επάγει στα γονίδια που ρυθμίζει, φαίνεται να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής των παραπάνω HNF-4-εξαρτώμενων γονιδίων. Ανάλυση των αντίστοιχων υποκινητών απέκλεισε κάθε ενδεχόμενο πρόσδεσης του HNF-1 ή του vHNF-1. Το ενδεχόμενο να πρόκειται για artifact αποκλείστηκε ύστερα από διαμολύνσεις με διαφορετικούς φορείς έκφρασης (RSV, CMV), με φορείς έκφρασης άσχετων μεταγραφικών παραγόντων (RSV-NF-1) ή τέλος με τους άδειους φορείς έκφρασης (RSV-CAT, CMV-CAT). Σε όλες τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε καμιά μεταβολή στα επίπεδα μεταγραφής των υπό έλεγχο κατασκευών, ούτε στην ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό έλεγχο των πειραμάτων μας.

Ένα ακόμα πείραμα ελέγχου στη σειρά αυτή των δοκιμών της ενεργότητας του CAT, ήταν να δούμε το αποτέλεσμα των RSV-HNF-1 και RSV-vHNF-1 στη μεταγραφή της Alb-CAT κατασκευής στην οποία το γονίδιο CAT έχει τεθεί υπό τον έλεγχο του υποκινητή της αλβουμίνης. Όπως ήταν αναμενόμενο (πίνακας 5), η έκφραση του CAT αυξήθηκε κατά 28 και 20 φορές παρουσία του HNF-1 και vHNF-1 αντίστοιχα (εικόνα Γ4D). Μπορούμε δηλαδή με ασφάλεια να ισχυριστούμε ότι το φαινόμενο είναι απόλυτα ειδικό.

Θέλοντας να διευκρινίσουμε το αν αρκεί απλά η φυσική παρουσία του HNF-1 ή χρειάζεται ένα λειτουργικό HNF-1 μόριο γι' αυτή την καταστολή, διαμολύναμε κύτταρα HepG2 με το φορέα έκφρασης pRSV-ΔHNF-1. Η πρωτεΐνη που παράγεται στερείται των αμινοξέων 18-53 που χαρτογραφούνται στην περιοχή διμερισμού, καθιστώντας την πρωτεΐνη ανίκανη να προσδεθεί στο DNA εφόσον γνωρίζουμε ότι ο διμερισμός της είναι προϋπόθεση για την πρόσδεση. Η παρουσία της μεταλλαγμένης μορφής του HNF-1 αφήνει ανεπηρέαστη την έκφραση των γονιδίων αναφοράς.

ΟΙ HNF-1 & vHNF-1 ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ HNF-4.

Και οι τρεις υποκινητές που μελετήσαμε έχουν το κοινό χαρακτηριστικό ότι στρατολογούν HNF-4 στο αντίστοιχο cis ρυθμιστικό στοιχείο που περιλαμβάνουν και ρυθμίζονται κατά κύριο λόγο απ' αυτόν. Θελήσαμε να δούμε πώς επηρεάζεται η HNF-4-εξαρτώμενη μεταγραφή από την παρουσία του HNF-1 και του vHNF-1 κι αν στο φαινόμενο καταστολής που καταγράψαμε συμμετέχει κι ο HNF-4.

Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν όπως προηγουμένως με τις κατασκευές αναφοράς (aroCIII-CAT, aroAI-CAT, HNF-1-CAT), με αυξανόμενες ποσότητες φορέων έκφρασης HNF-1 και vHNF-1 (pRSV-HNF-1 και pRSV-vHNF-1) και με το φορέα έκφρασης HNF-4 (pMTHNF-4). Όπως φαίνεται στα ιστογράμματα της **ΕΙΚΟΝΑΣ Γ5**, παρουσία του HNF-4, η μεταγραφή των aroCIIICAT, aroAICAT και HNF-1CAT αυξήθηκε κατά 6.9, 2.4 και 3.8 φορές αντίστοιχα. Η ενισχυμένη αυτή έκφραση έπεσε στα 11-25 % όταν τα κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης HNF-1 ή vHNF-1. Έτσι, η δράση των HNF-1 και vHNF-1 είναι πιθανά πάνω στην HNF-4-εξαρτώμενη μεταγραφή. Είναι γνωστό από βιβλιογραφικές αναφορές και από πειράματα όπως αυτό της εικόνας Γ5 ότι η παρουσία HNF-1 ή vHNF-1 δεν επηρεάζει τη μεταγραφή που καθοδηγείται από τον υποκινητή pMT. Επομένως, το αποτέλεσμα που βλέπουμε δεν οφείλεται στην κατάργηση της έκφρασης του εξωγενούς HNF-4 μέσα στα κύτταρα.

Μπορούμε επίσης να παρατηρήσουμε ένα άμεσο συσχετισμό μεταξύ του βαθμού καταστολής από τον HNF-1 και του αντίστοιχου βαθμού ενεργοποίησης από τον HNF-4. Όπως φαίνεται στα ιστογράμματα της εικόνας η σειρά αυτή είναι aroCIII>HNF-1>aroAI. Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε το συσχετισμό μεταξύ της HNF-4 εξαρτώμενης μεταγραφής και της HNF-1 εξαρτώμενης καταστολής, ελέγξαμε πώς συμπεριφέρονται οι μεταλλαγμένες θέσεις πρόσδεσης του HNF-4. Τέτοιου είδους πειράματα, δεν μπορούσαν να οδηγήσουν σε συμπεράσματα μιας και χανόταν εντελώς η HNF-4 εξαρτώμενη μεταγραφή με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατόν να παρατηρήσουμε τη δράση του HNF-1. Προχωρήσαμε όμως στη μελέτη συνθετικών υποκινητών που είχαν απομονωμένη την θέση πρόσδεσης του HNF-4 των aroCIII, HNF-1 και aroAI μπροστά από έναν ελάχιστο υποκινητή (CIIIB-TK-CAT, AID-TK-CAT, και HNF-1-TK-CAT). Όπως ήταν αναμενόμενο, η παρουσία των θέσεων αυτών αύξησε τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης. Συνδιαμόλυνση των κυττάρων με φορέα έκφρασης HNF-4 ενίσχυσε τα επίπεδα μεταγραφής των χιμαιρικών αυτών κατασκευών κατά 5-7 φορές ενώ ταυτόχρονη

διαμόλυνση και με φορέα έκφρασης HNF-1 έριξε τα αυξημένα επίπεδα μεταγραφής στο 20-40 % (**ΕΙΚΟΝΑ Γ6**). Συνυπολογίζοντας τα παραπάνω δεδομένα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι HNF-1 και vHNF-1 δρουν έμμεσα μέσω των θέσεων πρόσδεσης HNF-4 καταστέλλοντας τη μεταγραφή των εν λόγω γονιδίων.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HNF-1 ΜΕ ΤΟΝ HNF-4.

Η ιδιαιτερότητα αυτών των cis-ρυθμιστικών στοιχείων να επάγουν αφενός μεν HNF-4 εξαρτώμενη θετική ρύθμιση της μεταγραφής και HNF-1 εξαρτώμενη αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής μας οδήγησε στη διερεύνηση του αν με τρόπο άμεσο ή έμμεσο αυτά μπορούν να αναγνωριστούν και από τους δύο αυτούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Αποκλείσαμε το ενδεχόμενο πρόσδεσης των HNF-1 και vHNF-1 στις θέσεις πρόσδεσης του HNF-4 σ' αυτούς τους υποκινητές με πειράματα EMSA χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένες τις θέσεις CIIIB, AID, και HNF-1A και ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα Cos-1 που είχαν διαμολυνθεί με φορείς έκφρασης για HNF-1 και vHNF-1. Με ανάλογα πειράματα, αναμιγνύοντας τα παραπάνω κυτταρικά εκχυλίσματα με άλλα που ήταν εμπλουτισμένα με HNF-4 αποκλείσαμε το ενδεχόμενο διμερισμού του HNF-1 με τον HNF-4. Αν και δεν είχαμε ενδείξεις για τέτοιου είδους αλληλεπίδραση ή ετεροδιμερισμό δεν μπορούσαμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι τέτοιου είδους επαφές μεταξύ των δύο πρωτεϊνών μπορούν να συμβούν στα ηπατικά κύτταρα ως συνέπεια ειδικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων ή / και με τη βοήθεια ενδιάμεσων, βοηθητικών πρωτεϊνών. Έτσι, προχωρήσαμε σε επανάληψη των παραπάνω πειραμάτων χρησιμοποιώντας πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2 και από ηπατοκύτταρα αρουραίου. Στην **ΕΙΚΟΝΑ Γ7** παρατηρούμε ότι και με τους τρεις ανιχνευτές (CIIIB, AID, HNF-1A), παρουσία μη ραδιενεργού ανταγωνιστή που προσδένει HNF-4 (CIIIB, AID, HNF-1A), χάνεται η ζώνη μειωμένης κινητικότητας ενώ η παρουσία κρούου ανταγωνιστή που προσδένει HNF-1 (AlbPE) δεν επηρεάζει το σχηματισμό του συμπλόκου. Καμία επίδραση στο σύμπλοκο δεν προκαλεί η παρουσία αντισώματος εναντίον του HNF-1. Αν όντως υπήρχε αλληλεπίδραση του HNF-1 με τον HNF-4, θα παρατηρούσαμε διαφορετική κινητικότητα του συμπλόκου που σχηματίστηκε με τον ανιχνευτή AlbPE. Το αντίσωμα εναντίον του HNF-1 φάνηκε να αντιδρά με τον HNF-1 δίνοντας μια διπλή ζώνη μειωμένης κινητικότητας. Αντίθετα, η παρουσία του δεν επηρέασε καθόλου τα σύμπλοκα που σχηματίστηκαν με τους ανιχνευτές CIIIB, AID και HNF-1A. Το

γεγονός ότι ούτε η παρουσία του αντισώματος HNF-1 δεν τροποποίησε την κινητικότητα του συμπλόκου που σχηματίζεται στις θέσεις-στόχους του HNF-4, μας έκανε να πιστέψουμε ότι δεν είναι πολύ πιθανή μια άμεση ή έμμεση (μέσω άλλων, βοηθητικών πρωτεϊνών) αλληλεπίδραση του HNF-1 με τον HNF-4 *in vitro*.

Η ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ HNF-1 Η vHNF-1 ΑΠΟ IN VITRO ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΚΑΜΙΑ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΣΤΗΝ HNF-4-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Εξετάσαμε στη συνέχεια τη συνέπεια της απομάκρυνσης του HNF-1 και του vHNF-1 από σύστημα *in vitro* μεταγραφής γονιδίων που ρυθμίζονται θετικά από τον HNF-4. Τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων μεταγραφής έδωσαν (**ΕΙΚΟΝΑ Γ8**) μια σοβαρή ένδειξη της έμμεσα κατασταλτικής δράσης του HNF-1 σε HNF-4 εξαρτώμενους στόχους. Το σύστημα αυτό μας προσφέρει τη δυνατότητα να μελετήσουμε το ρόλο των ρυθμιστικών πρωτεϊνών πάνω σε γυμνή μήτρα DNA.

Οι αρoCIII-GI380, αρoAI-GI380 και HNF-1-GI380 επώαστηκαν με πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου τα οποία είχαν προεπωαστεί (όπως φαίνεται στις αντίστοιχες διαδρομές της εικόνας Γ8) με αντίσωμα HNF-4 ή HNF-1 ή με δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια που προσδένουν HNF-4 (CIIIB, AID, HNF-1A) ή HNF-1 (AIBPE). Όπως ήταν αναμενόμενο, μόνο η απομάκρυνση του HNF-4 από την αντίδραση (είτε λόγω δέσμευσης με το αντίστοιχο αντίσωμα είτε λόγω της παρουσίας του δίκλινου ολιγονουκλεοτιδίου που το προσδένει) ήταν ικανή να μειώσει το προϊόν της *in vitro* μεταγραφής. Η απομάκρυνση του HNF-1 από τα πυρηνικά εκχυλίσματα δεν οδήγησε σε αυξημένη μεταγραφή των παραπάνω κατασκευών.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝ Η ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HNF-1 ΣΤΗΝ HNF-4-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΕΙΝΑΙ ΗΠΑΤΟΕΙΔΙΚΗ.

Θελήσαμε στη συνέχεια να ελέγξουμε το κατά πόσο αυτό το φαινόμενο, δηλαδή η κατασταλτική δράση του HNF-1 και vHNF-1 σε *ex vivo* συστήματα όπως τα κύτταρα που μεγαλώνουν σε κυτταροκαλλιέργεια, είναι γενικό, αν μπορούμε δηλαδή να το αναπαράγουμε και σε άλλες κυτταρικές σειρές. Επιλέξαμε την κυτταρική σειρά HeLa που δεν εκφράζει κανένα από τους παραπάνω μεταγραφικούς παράγοντες αλλά ούτε και τα γονίδια αναφοράς που μελετάμε. Επίσης, από παλαιότερες μελέτες μας, ξέρουμε ότι ο HNF-4 μπορεί να είναι πλήρως ενεργός σ' αυτή την κυτταρική σειρά. Όπως αναμενόταν, ο HNF-4 ήταν ικανός να επάγει τη μεταγραφή στους υποκινητές

αροCIII και HNF-1 60 και 10 φορές πάνω από τα βασικά επίπεδα αντίστοιχα. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση του αροAI υποκινητή, γεγονός που υποδηλώνει την αναγκαιότητα ύπαρξης και άλλων παραγόντων που φαίνεται να μην περιλαμβάνονται σ' αυτά τα εκχυλίσματα ή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που δεν είναι συμβατές μ' αυτή την κυτταρική σειρά. Οι HNF-1 και vHNF-1 κατέστειλαν την HNF-4 επαγόμενη μεταγραφή των HNF-1 και αροCIII στα 23-26 % και στα 8-22 % αντίστοιχα (**ΕΙΚΟΝΑ Γ9**).

Από τα μέχρι τώρα δεδομένα ευσταθεί ο ισχυρισμός ότι ο HNF-1 κι ο λειτουργικά ομόλογός του vHNF-1 καταστέλλουν την HNF-4 εξαρτώμενη μεταγραφή των υποκινητών αροCIII, αροAI και HNF-1 σε ηπατοκύτταρα και σε κύτταρα HepG2, ενώ για κάποιους από αυτούς τους υποκινητές το φαινόμενο γενικεύεται και σε άλλους κυτταρικούς τύπους.

Με τα παραπάνω πειράματα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι HNF-1 και vHNF-1 δεν είναι γενικοί μεταγραφικοί καταστολείς, αλλά καταστέλλουν συγκεκριμένα τη μεταγραφή που επάγεται από τον HNF-4.

Με *in vitro* πειράματα σύνδεσης αποκλείσαμε το ενδεχόμενο της πρόσδεσης του HNF-1 ή vHNF-1 στις θέσεις αυτές. Έμμεση αλληλεπίδραση με αυτά τα στοιχεία, θα μπορούσαμε να έχουμε είτε σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των HNF-1 και HNF-4, είτε με ετεροδιμερισμό είτε τέλος με τη βοήθεια κάποιας άλλης πρωτεΐνης. Έχουμε αναφορές στη βιβλιογραφία για άλλες τέτοιες περιπτώσεις όπως τη σύνδεση των ενδιάμεσων μεταγραφικών παραγόντων (transcription intermediary factors) με τον υποδοχέα της προγεστερόνης, το σύμπλοκο VP16-Oct1, τα ομοπολυμερή που σχηματίζει ο Sp1 ή τους "coactivators" και τους "tethering" παράγοντες που έχουν την ικανότητα να γεφυρώνουν δύο ή περισσότερους απομακρυσμένους μεταγραφικούς παράγοντες με τους βασικούς παράγοντες της μεταγραφικής μηχανής, συντελώντας έτσι στη συντονισμένη δράση τους (36, 64, 77, 109, 116, 143, 146). Οι ενδείξεις που έχουμε από την εργασία αυτή δείχνουν ότι κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στην περίπτωση του HNF-1 και HNF-4 *in vitro*. Δεν είχαμε δηλαδή ούτε απευθείας πρόσδεση του HNF-1 στις θέσεις πρόσδεσης του HNF-4, ούτε ετεροδιμερισμό αυτών των δύο παραγόντων. Επιπλέον, δεν είχαμε αύξηση της μεταγραφής σε *in vitro* σύστημα όταν αφαιρέσαμε με μη ραδιοσημασμένο ανταγωνιστή (AlbPE) ή abHNF-1 τον HNF-1 από το μίγμα της αντίδρασης. Τέτοια αύξηση θα ήταν αναμενόμενη στην περίπτωση που ο HNF-1 δρούσε στους συγκεκριμένους HNF-4-εξαρτώμενους υποκινητές άμεσα ή μέσω άλλων παραγόντων

που υπάρχουν στα πυρηνικά εκχυλίσματα. Αυτά τα δεδομένα βέβαια δεν αποκλείουν εντελώς την αλληλεπίδραση των HNF-1/HNF-4 *in vivo*.

Μπορεί δηλαδή αυτό το σύμπλοκο να είναι ασταθές στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες ή να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή του. Συγκρίνοντας βέβαια τις περιοχές διμερισμού των δύο πρωτεϊνών (τύπου μυσσίνης για τον HNF-1 και τύπου στεροειδών υποδοχέων για τον HNF-4) τέτοιου είδους σύνδεση τουλάχιστον μέσω της περιοχής διμερισμού, φαίνεται απίθανη.

Τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να εξηγηθούν με το φαινόμενο "squenching" (42). Τα υψηλά επίπεδα δηλαδή HNF-1 μέσα στα κύτταρα μπορεί να απομακρύνουν με μη ειδικό τρόπο συμπράγοντες του HNF-4 από τους ενδοκυτταρικούς του στόχους ή βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες από τον HNF-4. Κάτι τέτοιο όμως αντιβαίνει στο αποτέλεσμα του αντιστοίχου πειράματος με το μεταλλαγμένο HNF-1 να αναπαράγει το αποτέλεσμα του αγρίου τύπου HNF-1. Η αναγκαιότητα για πλήρως ενεργή πρωτεΐνη HNF-1 –όσον αφορά στην ικανότητα πρόσδεσής της σε DNA και στην ικανότητά της να ενεργοποιεί τη μεταγραφή- μας οδήγησε στην υπόθεση ότι μπορεί η δράση της να είναι έμμεση, ενεργοποιώντας έναν καταστολέα της έκφρασης του HNF-4 ή έναν ανταγωνιστή της δράσης του. Η πρώτη μας σκέψη ήταν η ενεργοποίηση του *extinguishing locus* στο χρωμόσωμα 1 που θα οδηγούσε στην καταστολή της έκφρασης του HNF-4 (13, 109). Σύντομα όμως απορρίψαμε αυτή την εξήγηση μια και οι HNF-1 και vHNF-1 ασκούν την ίδια δράση όχι μόνο στα ενδογενή γονίδια αλλά και στους φορείς έκφρασης με τους οποίους διαμολύναμε τα κύτταρα. Εναλλακτικά, υποθέσαμε ότι οι HNF-1 και vHNF-1 ενεργοποιούν την έκφραση ή επάγουν τη δράση κάποιου αρνητικού παράγοντα ο οποίος με τη σειρά του ανταγωνίζεται τη δράση του HNF-4. Τέτοιοι παράγοντες θα μπορούσαν να είναι οι Arp-1, Ear-2 και Ear-3 που όπως είναι γνωστό από βιβλιογραφικές αναφορές ανταγωνίζονται τον HNF-4 για κοινή θέση πρόσδεσης στους υποκινητές του *apoCIII* και του *apoAI*, κάτι τέτοιο όμως δεν θα εξηγούσε τι συμβαίνει στην περίπτωση του υποκινητή HNF-1 όπου δείξαμε ότι προσδένεται αποκλειστικά ο HNF-4 (71, 72). Δεν μπορούμε όμως να αποκλείσουμε την ύπαρξη κάποιου –ως τα τώρα- μη ταυτοποιημένου μεταγραφικού καταστολέα που υπονομεύει τη δράση του HNF-4.

Πιο πιθανό μας φάνηκε, το ενδεχόμενο η υπερέκφραση του HNF-1 να οδηγεί σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HNF-4 που επηρεάζουν την ενδοκυτταρική τοποθέτηση, είτε την ενεργότητά του. Τέτοιος ρόλος έχει αποδοθεί στη φωσφορυλίωση και συγκεκριμένα στην επίδρασή της στη μεταφορά στον

πυρήνα, στην ικανότητα πρόσδεσης ή στη μεταγραφική ενεργότητα παραγόντων όπως AP-1, Oct1, GHF1/Pit1, cAMP response element binding factor, NFκB/IκB, NF-IL6 και ISGF3 (11, 25, 56, 93, 61, 60). Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις περιοχές στο μόριο του HNF-4 που είναι πλούσιες σε σερίνη / θρεονίνη και θα ήταν δυνητικοί στόχοι για τη δράση της κινάσης της καζείνης II (135). Επίσης υπάρχουν αρκετές τυροσίνες που θα μπορούσαν να είναι υπόστρωμα για τη δράση κάποιας κινάσης τυροσίνης. Όποιες κι αν είναι όμως αυτές οι τροποποιήσεις, σίγουρα δεν είναι περιορισμένες μόνο στα ηπατοκύτταρα μια και το φαινόμενο ήταν επαναλήψιμο σε διάφορες κυτταρικές σειρές (όπως αναφέρθηκε για παράδειγμα στα HeLa κύτταρα).

Στο μοντέλο της **ΕΙΚΟΝΑΣ Γ10** απλουστεύουμε τα μέχρι τώρα δεδομένα μας αναπαριστώντας σχηματικά το δίκτυο μεταγραφικών ρυθμίσεων που καθορίζουν το φαινότυπο του ήπατος. Με το μοντέλο αυτό φέρνουμε σε αμοιβαία εξάρτηση δύο μεταγραφικούς παράγοντες που μέχρι πρότινος φαινόταν να μην εμπλέκονται ο ένας στη δράση του άλλου. Η παρατήρησή μας δηλαδή μπορεί να διαμορφώσει μια τελείως διαφορετική εικόνα διαπλεκόμενων μεταγραφικών ρυθμίσεων κάνοντας τα ηπατοκύτταρα πιο πολύπλοκο αλλά συνάμα πιο ελκυστικό μοντέλο για τη μελέτη της ιστοειδικής ρύθμισης γονιδίων.

Η ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ HNF-1 ΣΕ HEPG2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΑ ΕΝΔΟΓΕΝΗ HNF-4-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ.

Αποφασίσαμε λοιπόν να εμβαθύνουμε στον τρόπο δράσης του HNF-1 πάνω στη μεταγραφή του ίδιου του γονιδίου του στα πλαίσια του χρωμοσώματος, in vivo εφόσον τα μέχρι τώρα δεδομένα μας στηρίζονταν μόνο σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης. Δημιουργήσαμε λοιπόν κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν σταθερά τον HNF-1 σε διαφορετικά επίπεδα (H1A, H1B). Παρασκευάσαμε poly-A mRNA από τα κύτταρα αυτά και με ανάλυση Northern ελέγξαμε τη μεταγραφή διάφορων ενδογενών γονιδίων, καθώς και του εξωγενούς, σταθερά εκφραζόμενου HNF-1. Στην **ΕΙΚΟΝΑ Γ11** φαίνονται τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης. Ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής GAPDH (glycerol aldehyde phosphate dehydrogenase) χρησιμοποιήθηκε στο δείγμα ελέγχου μια και η έκφρασή του δεν επηρεάζεται από κανέναν από τους υπό εξέταση μεταγραφικούς παράγοντες. Στην πρώτη σειρά, ο ανιχνευτής είναι το σύνολο του μορίου cDNA του HNF-1 του αρουραίου με το οποίο υβριδοποιείται το mRNA (3.0kb) που παράγεται από το εξωγενώς προστιθέμενο γονίδιο (μόνο στις H1a και H1B σειρές) και λιγότερο το ενδογενές του οποίου η υβριδοποίηση μειώνεται σταδιακά στις σειρές H1B και H1A (3.6kb). Όταν ο ανιχνευτής ήταν ειδικός για την 3'

UTR περιοχή του ανθρώπινου HNF-1, μπορέσαμε να δούμε (δεύτερη σειρά) τη μείωση του ενδογενούς mRNA (μικρότερη στην H1B και μεγαλύτερη στην H1A κυτταρική σειρά). Δραματική ήταν η μείωση της μεταγραφής ενός άλλου HNF-4 εξαρτώμενου γονιδίου, του apoCIII όπως φαίνεται στην τρίτη σειρά, ενώ αντίθετα ήταν εντυπωσιακή η αύξηση της μεταγραφής του HNF-1 εξαρτώμενου γονιδίου της αλβουμίνης (τέταρτη σειρά). Σε όλες τις περιπτώσεις οι διαφορές στην έκφραση ήταν πιο αισθητές στην κυτταρική σειρά H1A που εκφράζει σε υψηλότερα επίπεδα τον εξωγενή HNF-1. Τέλος, η έκφραση του ενδογενούς HNF-4 παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη. Το αποτέλεσμα αυτό αποκλείει οριστικά το ενδεχόμενο της επαγωγής – τουλάχιστο στο επίπεδο της μεταγραφής- ενός καταστολέα της έκφρασης του HNF-4 ως πιθανό μηχανισμό δράσης του HNF-1. Μπορούμε επίσης να αποκλείσουμε και το ενδεχόμενο αμοιβαίας θετικής ρύθμισης των δύο παραγόντων. Αυτό είναι σύμφωνο και με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών όπου απαλοιφή (knockout) του γονιδίου HNF-1 δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα του HNF-4. Ελέγξαμε τα επίπεδα mRNA και άλλων HNF-4 εξαρτώμενων γονιδίων και τα αποτελέσματα ήταν πολύ παρόμοια με αυτά στην περίπτωση του apoCIII.

Η ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ HNF-1 ΣΕ HEPG2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΟΥΣ HNF-4-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΥΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ ΣΕ ΔΟΚΙΜΕΣ CAT.

Οι μεταγραφικές ενεργότητες των χιμαιρικών υποκινητών των κατασκευών Alb-CAT, apoCIII-CAT, HNF-1-CAT και 4xTRH-TK-CAT (που περιλαμβάνει 4 θέσεις πρόσδεσης του HNF-4 από τον υποκινητή του HNF-1) ελέγχθηκαν με δοκιμές του ενζύμου CAT και επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της ανάλυσης Northern. Στην **ΕΙΚΟΝΑ Γ12** παρατηρούμε μια βαθμιαία αύξηση στην μεταγραφή του AlbCAT στις σειρές H1B και H1A αντιστοίχως ενώ δραματική είναι η ανάλογα βαθμιαία μείωση στην περίπτωση των apoCIII-CAT, HNF-1-CAT και 4xTRH-CAT. Τέλος, καμιά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση του δείγματος ελέγχου RSV-CAT, όπως ήταν άλλωστε αναμενόμενο.

Η ΘΕΣΗ "Α" ΤΟΥ HNF-1 ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΕΙ ΤΟΝ HNF-4 ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΤΟΝ HNF-1.

Παρασκευάσαμε στη συνέχεια κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2 κι από τις σειρές H1A και H1B και χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή τη θέση πρόσδεσης του HNF-1, AlbPE, διαπιστώσαμε την αυξημένης έντασης (4-11 φορές) ζώνη

μειωμένης κινητικότητας στην περίπτωση των δύο κυτταρικών σειρών. Στο πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε ως ανιχνευτή τη θέση πρόσδεσης του παράγοντα Sp1, ο οποίος δίνει αμετάβλητης έντασης σύμπλοκο σε κάθε περίπτωση.

Το ότι δεν υπάρχει πλήρης συσχετισμός μεταξύ των διαφορών στα επίπεδα του HNF-1 mRNA και στην ένταση της ζώνης του συμπλόκου με το AlbPE θα μπορούσε να εξηγηθεί με διάφορους τρόπους. Πιο πιθανή εξήγηση είναι αυτή η διαφορά να οφείλεται σε πρόσθετους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που ελέγχουν τη μετάφραση, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ή τη σταθερότητα του μορίου. Τέλος μπορεί η ύπαρξη κάποιου επικουρικού παράγοντα μέσα στα κύτταρα να μην επιτρέπει την ανεξέλεγκτη δράση του διμερούς HNF-1 (89). Χρησιμοποιώντας στη συνέχεια ως ανιχνευτή τη θέση πρόσδεσης του HNF-1, παρατηρήσαμε ότι δεν υπάρχει καμιά μεταβολή στη συγγένεια πρόσδεσής του με το στόχο του σε εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2, H1A και H1B. Πιστοποιήσαμε ότι πρόκειται για τον HNF-4, περιλαμβάνοντας στην αντίδραση αντισώμα για τον HNF-4 το οποίο οδηγεί σε μειωμένη κινητικότητα το σύμπλοκο σχεδόν στο σύνολό του. Αντίθετα, η παρουσία του αντισώματος HNF-1 δεν είχε καμία επίπτωση στην κινητικότητα ή στην ένταση του. Έτσι, αποκλείουμε το ενδεχόμενο ο HNF-1 ή κάποιος άλλος παράγοντας που επάγεται από τον HNF-1 να προσδένεται ανταγωνιστικά στη θέση στρατολόγησης του HNF-4.

Ο HNF-1 ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ HNF-4 ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ Ε ΤΟΥ HNF-4 ΜΟΡΙΟΥ IN VIVO.

Παρόλο που με τα πειράματα υστέρησης κινητικότητας δεν διαπιστώσαμε κάποιου είδους σύνδεση του HNF-1 με τον HNF-4, τέτοιου είδους σχέση θα μπορούσε να υπάρχει μεταξύ των δύο μεταγραφικών παραγόντων αλλά να μην διατηρείται στις συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος. Αποφασίσαμε λοιπόν να διερευνήσουμε με πιο μεγάλη λεπτομέρεια το θέμα αυτό. Με μια σειρά κατασκευών διάφορες αλληλουχίες του HNF-4 συντήχθηκαν με την περιοχή πρόσδεσης της Gal4 του σακχαρομύκητα σε DNA (16) για να χαρτογραφηθεί η περιοχή της HNF-4 που τυχόν αλληλεπιδρά με τον HNF-1 (**ΕΙΚΟΝΑ Γ14**). Χρησιμοποιώντας τα χιμαιρικά αυτά μόρια παρακάμπουμε τα προβλήματα που δημιουργεί η αδυναμία της HNF-4 να διμεριστεί, άρα να προσδεθεί σε DNA και να είναι δραστική όταν λείπει η περιοχή διμερισμού της. Η κατασκευή Gal4-HNF-4E που περιλαμβάνει ολόκληρη την περιοχή διμερισμού και πρόσδεσης του προσδέτη έδειξε να είναι ικανός ενεργοποιητής της μεταγραφής του Gal4-αποκρινόμενου γονιδίου αναφοράς τόσο στα κύτταρα HepG2

όσο και στα Cos1. Αυτή η ενεργοποίηση καταστάθηκε από τα αυξημένα ποσά του HNF-1 που προήλθαν από την εκτοπική έκφραση στις σταθερά διαμολυσμένες σειρές HerG2 H1A και H1B ή από τα παροδικά διαμολυσμένα με φορέα έκφρασης HNF-1 κύτταρα Cos-1. Ανάλογα αποτελέσματα έδωσε και η διαμόλυνση με τη μεταλλαγμένη μορφή της HNF-1 [HNF-1(440)] στην οποία λείπει η καρβοξυτελική περιοχή ενεργοποίησης ενώ η παρουσία της μεταλλαγής HNF-1(280) που περιλαμβάνει την περιοχή διμερισμού και πρόσδεσης και σε DNA του μορίου δεν κατάφερε να καταστείλει τη μεταγραφή. Μια έλλειψη της περιοχής ενεργοποίησης του HNF-4 στην κατασκευή Gal4 HNF-4 (E354) από την οποία απουσιάζουν τα αμινοξέα 337-368 είχε σαν συνέπεια την απώλεια της μεταγραφικής ενεργότητας του μορίου. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμιά διαφορά στις περιπτώσεις όπου στα κύτταρα υπερεκφράστηκε η Gal4-VP16 (123) που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου.

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HNF-1 ΜΕ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ AF2 ΤΟΥ HNF-4 IN VITRO.

Τα παραπάνω πειράματα λοιπόν αναδεικνύουν ότι ο HNF-1 καταστέλλει τη μεταγραφή μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης με τον HNF-4. Η επιβεβαίωση των παραπάνω in vitro δεδομένων προήλθε από το πείραμα της **ΕΙΚΟΝΑΣ Γ15**: διάφορα μεταλλάγματα της HNF-4 σε σύντηξη με GST (GST-HNF-4 130-368, GST-HNF-4 AF2, GST-HNF-4ΔAF2) αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνη HNF-1 που είχε παραχθεί και ραδιοσημανθεί in vitro με ³⁵S-μεθειονίνη. Η πιθανότητα ύπαρξης τέτοιου είδους αλληλεπίδρασης διερευνήθηκε και στην περίπτωση της χιμαιρικής GST-TFIIIB. Για δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η GST-Gal4, και η πρωτεΐνη GST. Οι δύο τελευταίες δεν είχαν, όπως ήταν άλλωστε αναμενόμενο, καμιά αλληλεπίδραση με τον HNF-1. Σημαντική αλληλεπίδραση όμως φάνηκε να έχουμε τόσο με τον TFIIIB όσο και με τα δύο μεταλλάγματα της HNF-4 που περιελάμβαναν την AF2 αλληλουχία. Εξίσου καλή ήταν η αλληλεπίδραση στην περίπτωση όπου το AF2 ήταν το μόνο τμήμα του HNF-4 που συγκολλήθηκε με το GST. Έτσι, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το μόνο τμήμα της HNF-4 που αλληλεπιδρά με τον HNF-1 είναι τα νουκλεοτίδια 354-368 που συνιστούν το AF2.

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HNF-1 ΜΕ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ AF2 ΤΟΥ HNF-4 IN VIVO.

Την αλληλεπίδραση των δύο μεταγραφικών ρυθμιστών μπορέσαμε να την ανιχνεύσουμε και σε άθικτα κύτταρα. Διαμολύναμε κύτταρα Cos-1 με το φορέα έκφρασης pMT-HNF-4 (227-455) από τον οποίο λείπει το σήμα μετάβασης στον

πυρήνα. Συνδιαμόλυνση των κυττάρων με τον άδειο φορέα έκφρασης pCB6 αφήνει τον μεταλλαγμένο HNF-4 έξω από τον πυρήνα όπως φαίνεται στο πρώτο τμήμα της **ΕΙΚΟΝΑΣ Γ16** μετά από χρώση τους με αντίσωμα HNF-4 in situ. Αντίθετα, συνδιαμόλυνση των κυττάρων με HNF-1 και μετέπειτα χρώση τους με αντίσωμα HNF-4 έδειξε τη μεταλλαγμένη HNF-4 πρωτεΐνη να είναι στο σύνολό της πυρηνική. Το ίδιο αποτέλεσμα είχε και η υπερέκφραση της HNF-1 η οποία στερείται του καρβοξυτελικού της άκρου (HNF-1 440) ενώ η έλλειψη της περιοχής διμερισμού και πρόσδεσης σε DNA (HNF-1 280) έκανε αδύνατη την αλληλεπίδραση του HNF-1 με τον HNF-4 και συνεπώς τη μεταφορά του HNF-4 στον πυρήνα. Επίσης, υπερέκφραση του Gal4 άφησε τον HNF-4 227-455 στο κυτταρόπλασμα.

Table II

potential HNF1 binding sites

gene	specie	position	sequence	in vitro binding	
hepatic genes					
plasma proteins					
hepatic lipase	rat	-609	GGTTAATTAATGTC	+++	
		-58	GGTTAATAATTAATG		
hepatic lipase	human	-66	GGTTAATTAATTAATG	+++	
apolipoprotein (a)	human	+52	AGTTAATGATTCCTCT		
		intron 1	GGTTAATGTTTGCC		
C5 gene	human	-74	GGTTAATTAATTAATG	++	
C4b-binding protein	mouse		TGTTAATCATTACCC		
factor IX	human		GGTTAATTTTTTCA		
		intron 3	AGTTAATCATTAAAC		
		intron 4	AGTTACTCATTATCA		
		intron 6	AGTTAATGTTTACCT		
factor XIII B subunit	human	0	AGTTAATAATTTATA	+++	
		intron 10	GGTTACTGATTCTA		
		intron 11	GGTTAATTTTTGCAC		
corticosteroid BG 5'	human	-66	GGTTAATGTTAGAG		
serum amyloid A (GSAA1)	human		GGTTAATTTTTTCA		
alpha-2-macroglobulin	rat		GGTTAATTTATACAG		
pregnancy-specific B 1 glycoprotein	human		GGTTAATTTTTGTA	+++	
alpha-2-plasmin inhibitor	human		GGTTACTCATTAGAA		
thyroxine-binding globulin	human		GGTTAATTTATAACT		
alpha 2-macroglobulin	human		TGTTAATTTTTGTC		
vitamin D-binding prot.	rat	-1777	AGTTAATCCTTAGCT		
		-855	AGTTAATTTATAGCA		
		-209	AGTTAATGATTAATA	+++	
carbo-hydrate metabolism					
Liver pyruvate K	rat		AGTTAATCATTAAAA	++	
tyrosine aminotransferase 5'	rat		AGTTAATAATTTCA		
non-neuronal enolase	human	-1814	TGTTAATGATTACTA	+++	
detoxification					
UDP-glucuronosyltransferase	human	promoter	AGTTACTTATTACCC		
cytochrome P450IIE1	human		TGTTAATTAATCAGCA		
steroid hydroxylase IIa2 (CYP2A2)	rat		AGTTAATTTTTATCT		
other liver genes					
B1 vitellogenin 5'	xenopus	-280	GGTTAATAATTACCC	+++	
insulin-like GFI	rat	intron 4.	GGTTAATATTAACT		
dipeptidase	human		GGTTACTTATGAAC	+++	
serine protease hepsin	human		TGTTAATGATTCCT		
carcinoembryonic antigen (CEA)	human		AGTTAATCATTACTG		
gene 33 5'	rat		AGTTAATAGTTAAC	+++	
senescence marker 2B 5'	rat	-925	AGTTAATAATGATA		
connexin (Cx32) 5'	mouse	-856	AGTTAATGGTTGACA		
		-307	GGTTAATGTTTCTCT	++	
glutamine synthetase	rat		AGTTAATTTTTGCCT		
Hepatitis B virus	human		AGTTAATAATGATC		
intestinal genes					
sucrase-isomaltase	mouse	-172	AGTTAATTAATAACT	++	
cytokeratin 20	human	(-3180)	TGTTAATGATTAATA		
cellular retinol binding protein II	rat		AGTTATTCATTTCCA		
pancratic genes					
prohormone converting enzyme	human		GGTTAATAATTTGCTT	+	
glucose transporter 2 5'	human	(-1048)	GGTTAATCTTACTG		
renal genes					
sodium/glucose cotransporter	rat		AGTTAATGATCATCC	+	
sodium dependent sulfate transporter	rat		GGTTAATGTTCCCA		

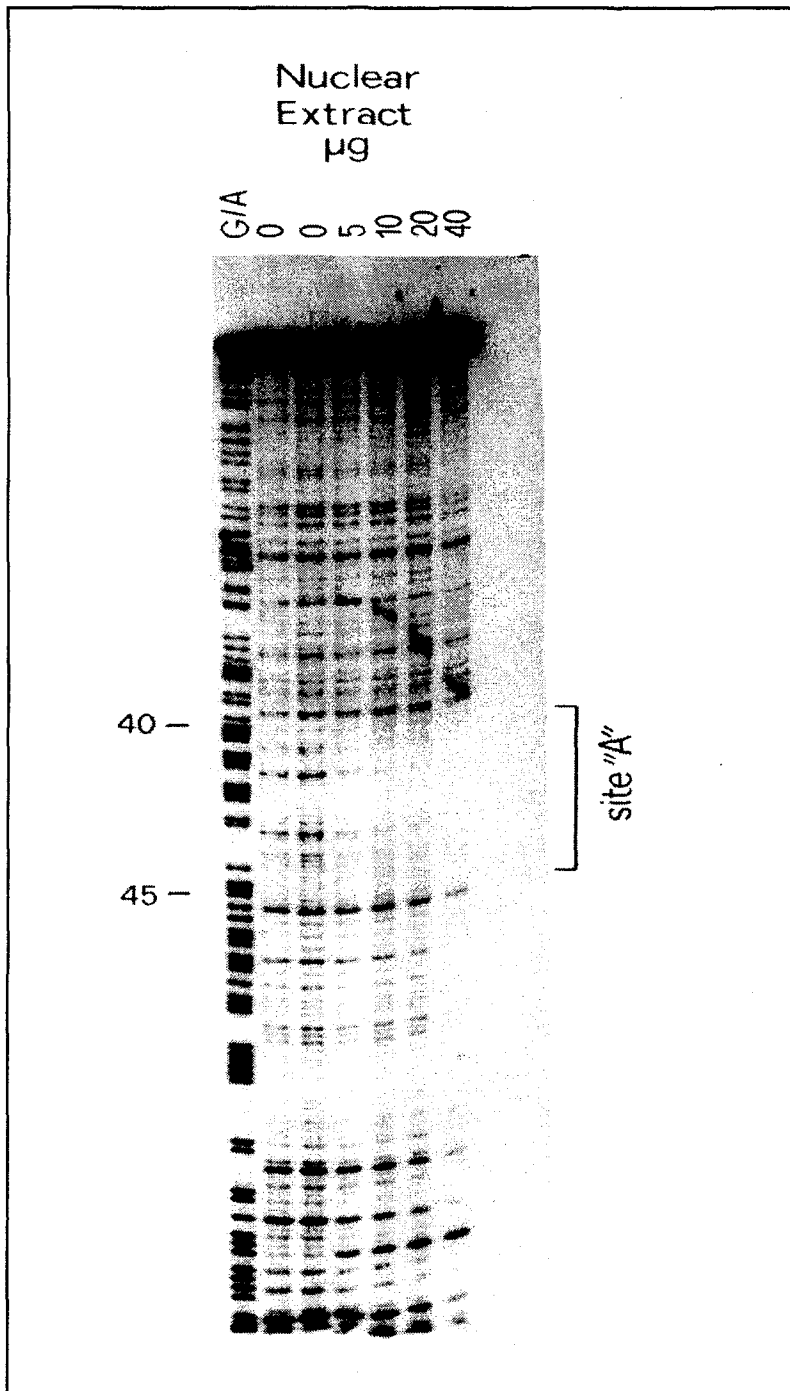
Table I

functional HNF1 binding sites

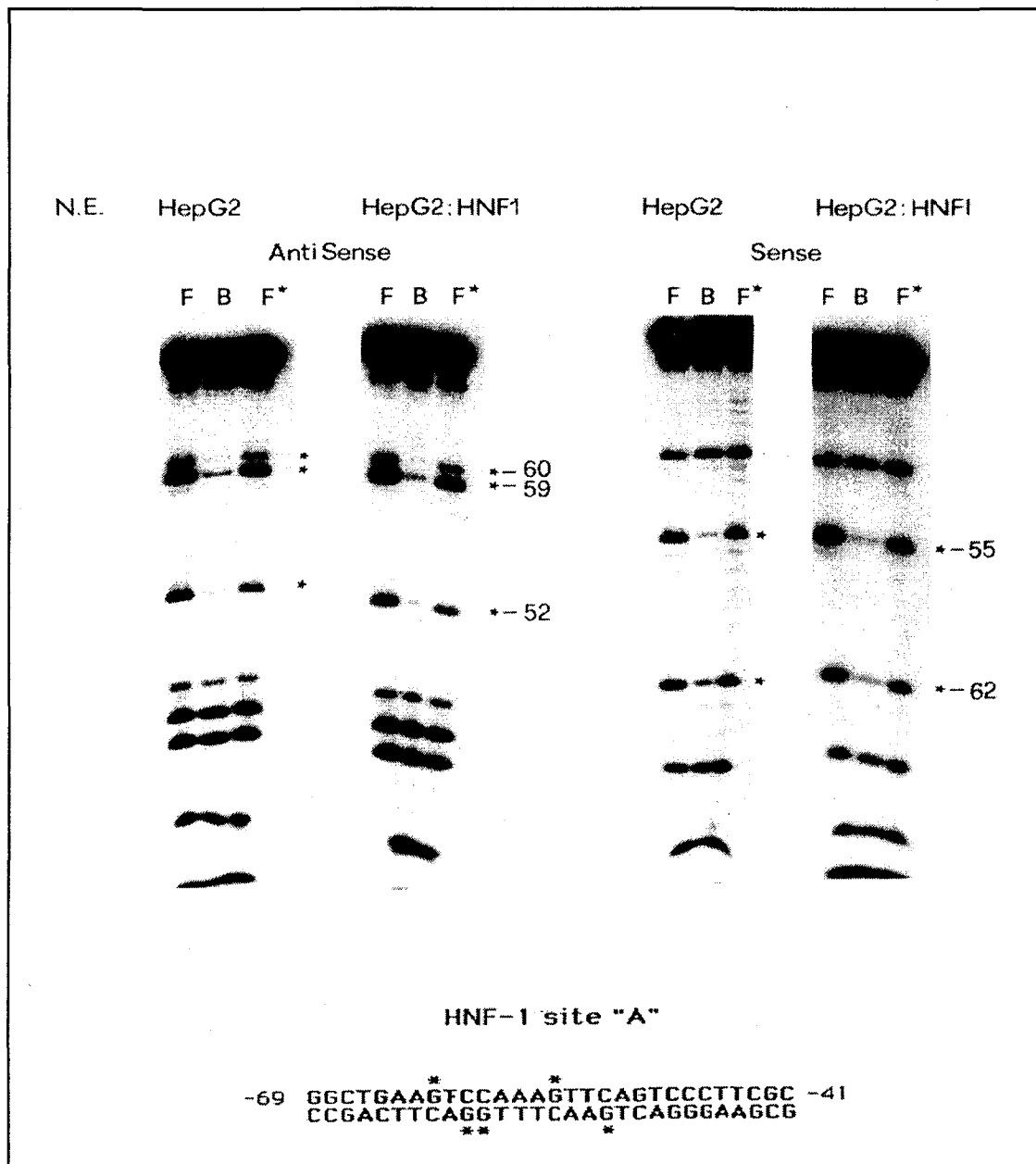
gene	species	sequence and position relative to the CAP site
albumin	mouse, rat	-80 GGTTAATGATCTACA
	human, bovin	-64 A A
	Xenopus 68kd	-66 GGTTAATAATTTTTCC
	Xenopus 74kd	-65 C
	human	-358 GGTTAGTAATFACTA
α-fetoprotein	human	-1774 TGTTACTAATTGACA
	rat, mouse, human	-64 GGTTACTAGTTAACA
transferrin	rat, mouse, human	-131 TGTTAATTAATGGCA
	human	-3445 GATTAATAATTAAC
	mouse, human	-133 GGTTACTTATTTCC
α1 Antitrypsin	human	-75 GGTTAATTAATCACCA
α-fibrinogen	mouse	T
	rat	GGTTAATCATCACCC
β-fibrinogen	rat	AGTTAATATTGACA
C reactive protein	human	A T
	human	-75 GGAATAATTTTACA
IGF-BP1	human	AGTTAATTTTACAA
	human	GGTTAATGATTTGCA
	human	GGTTAATTTTAAA
α1-microgl./fibrin	human	-2801 GGTTAATAATCTCAG
	human	-2732 GGTTAAGCTAGTAT
apoB	human	
apoA-II	human	-554 AGTTAATGTTAATG
L-pyruvate kinase	rat	
aldolase B	human	-119 AGTTAAGTATAACC
PEPCK	rat	
cytochrome P450 2E1	rat, human	
Glutathione S Transf.-YA	rat	-1035 GGTTAATTAATAGCT
	human	-860 TGTTAATATAAAGT
vitellogenin A2	xenopus	-115 ATTAATCATTACC
α2,6-S-Transferase	rat	-54 GGTTAATGTTTACAC
hepatitis B virus (preS1)	human	-87 TGTTAATGTTTACCG
aminopeptidase N	pig	-78 AGTTAATCATACT
insulin I	rat	-222 GGTTAATTTTTGCC
		TGTTAATAACTAAT



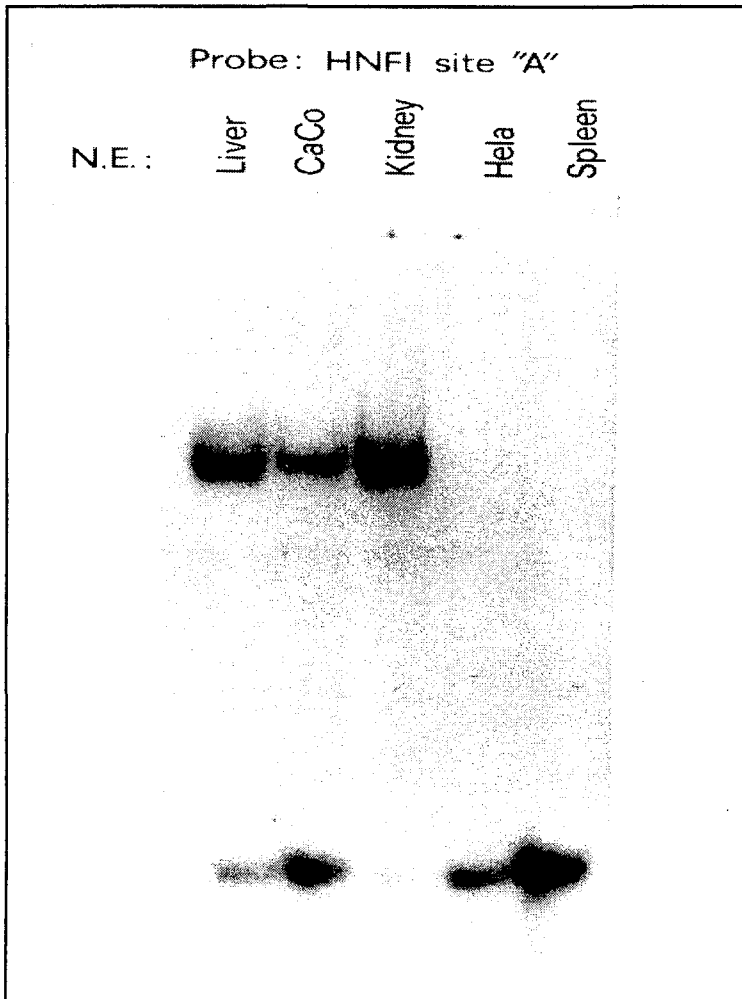
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Γονίδια που ρυθμίζονται από τον HNF-1 και δυνητικοί στόχοι ΤΟΥ



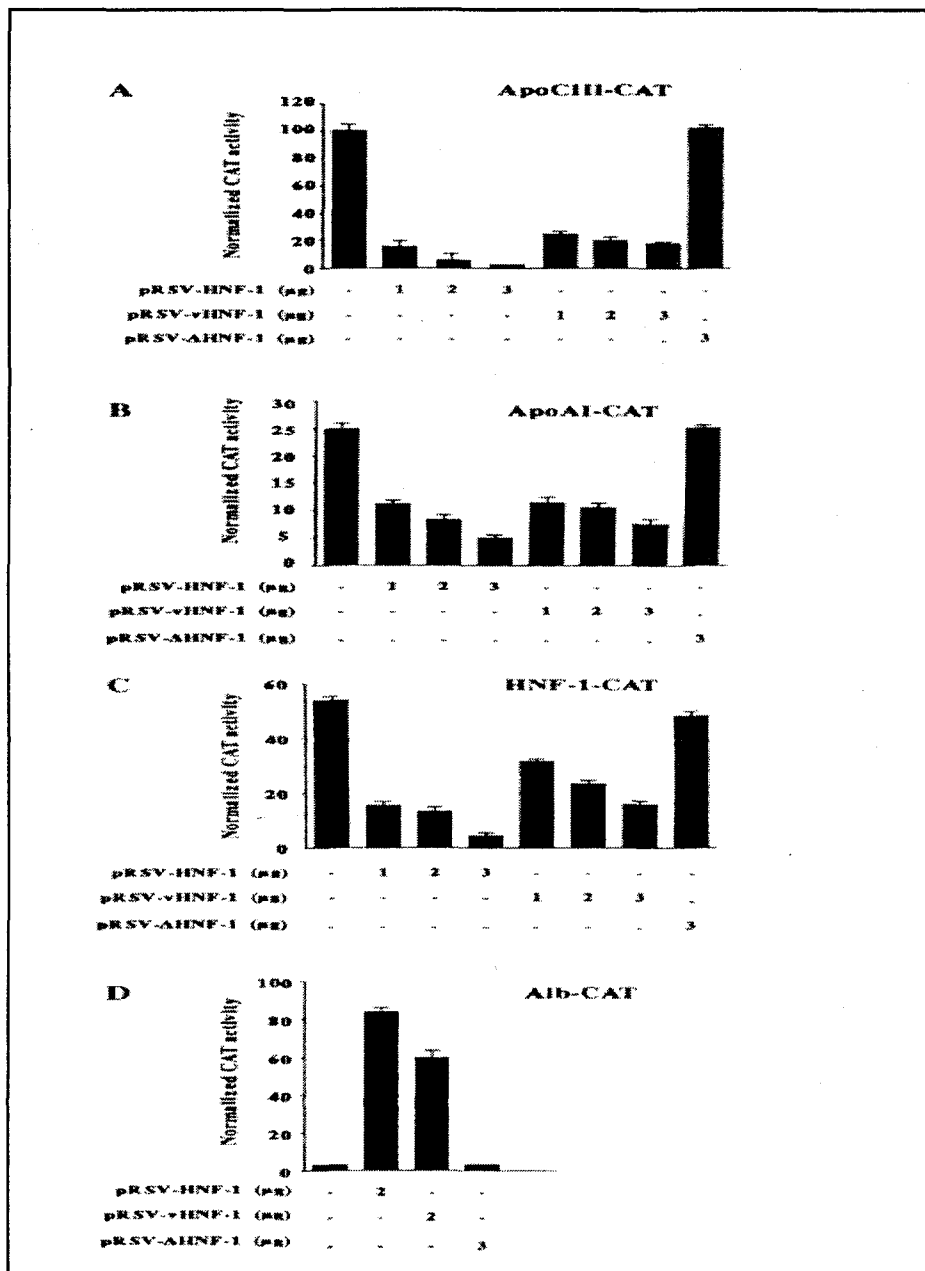
ΕΙΚΟΝΑ Γ1: Με ανάλυση αποτυπώματος, χρησιμοποιώντας πυρηνικά εκχυλίσματα (nuclear extract) από ήπαρ αρουραίου σε αυξανόμενες ποσότητες (5, 10, 20 και 40 μg ανά αντίδραση), μπορέσαμε να εντοπίσουμε τη θέση πρόσδεσης του HNF-4 στον υποκινητή του HNF-1 στην περιοχή A όπως σημειώνεται στην εικόνα. Η διαδρομή G/A αντιπροσωπεύει τον κατά Maxam-Gilbert προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των ανιχνευτών.



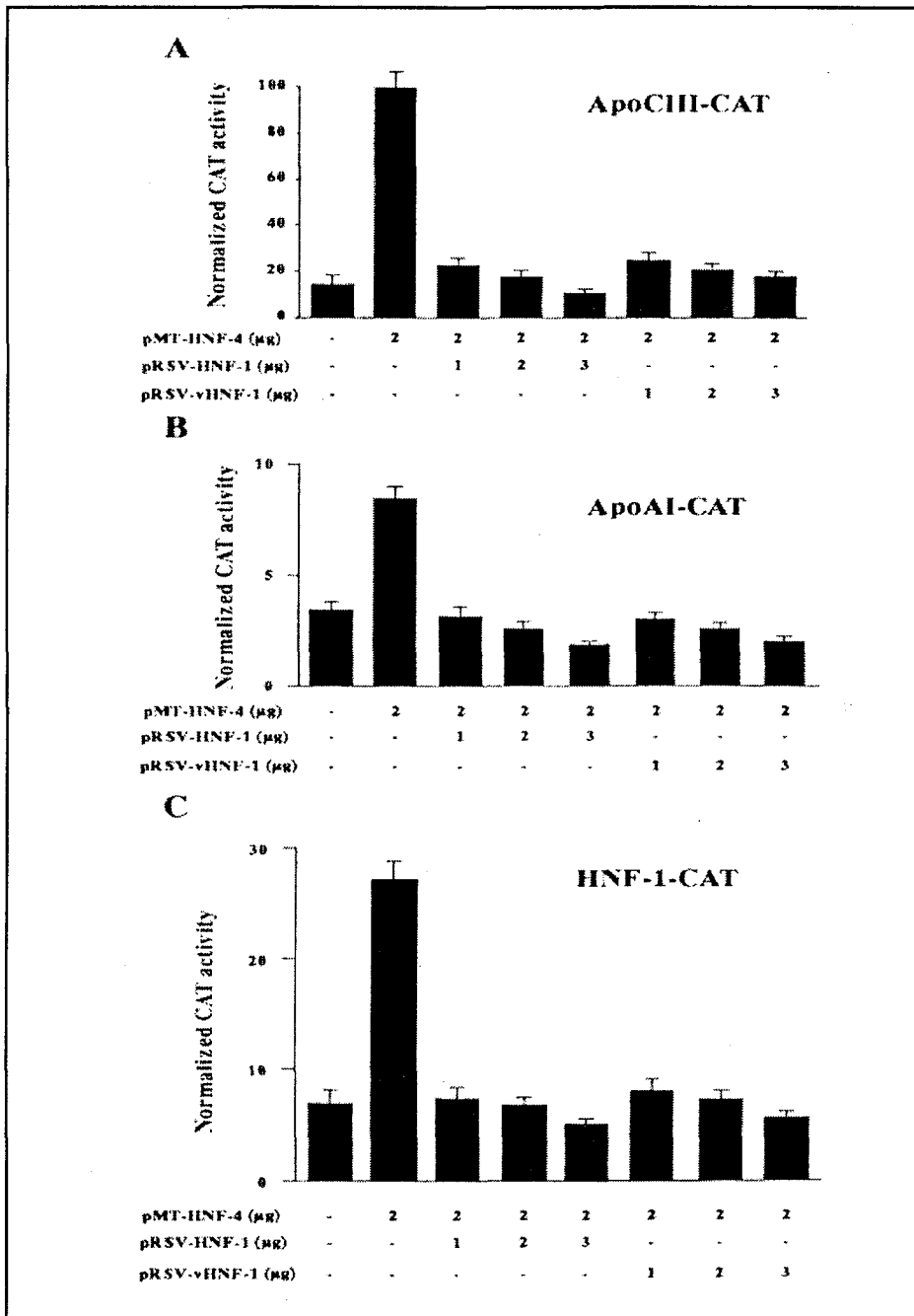
ΕΙΚΟΝΑ Γ2: Χαρτογράφηση των θέσεων πρόσδεσης πυρηνικών παραγόντων στον υποκινητή του HNF-1. Η ανάλυση αποτυπώματος έγινε με σημασμένους στο 5' άκρο ιχνηθέτες (sense & antisense) και πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου στις ποσότητες που αναφέρονται.



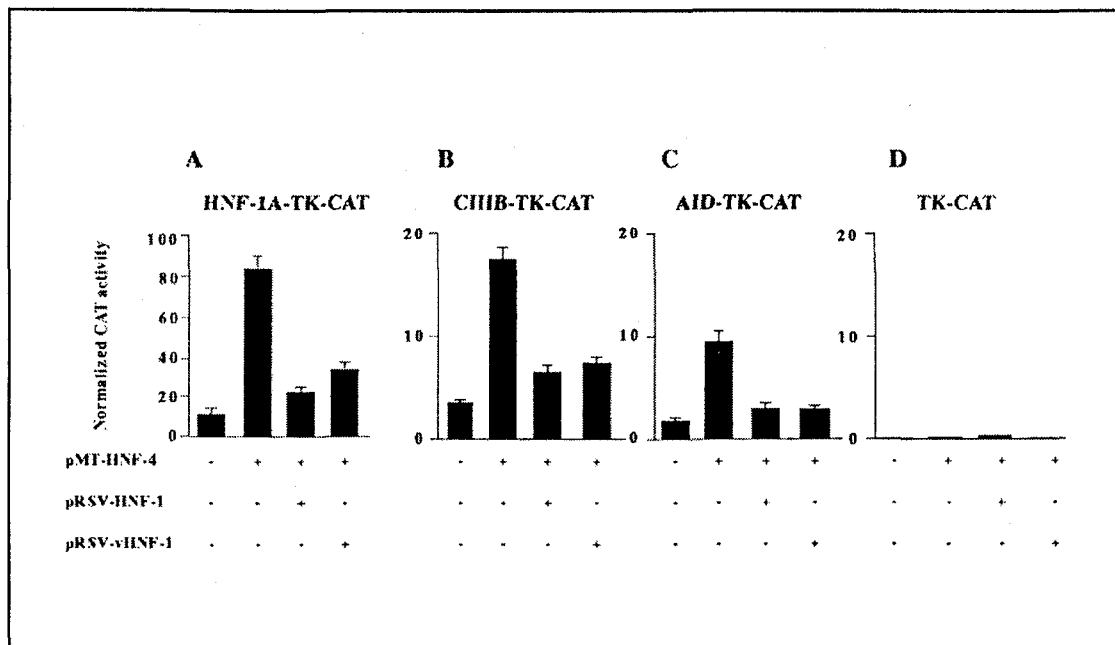
ΕΙΚΟΝΑ Γ3: Διερεύνηση της έκφρασης και ικανότητας πρόσδεσης του HNF-4 στη θέση-στόχο του σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Ο ιχνηλάτης είναι η ραδιοσημασμένη θέση πρόσδεσης του HNF-4 (probe) από τον υποκινητή του γονιδίου του HNF-1 η οποία αφέθηκε να αλληλεπιδράσει με πυρηνικά εκχυλίσματα (N.E.) που παρασκευάστηκαν από τις κυτταρικές σειρές που αναγράφονται.



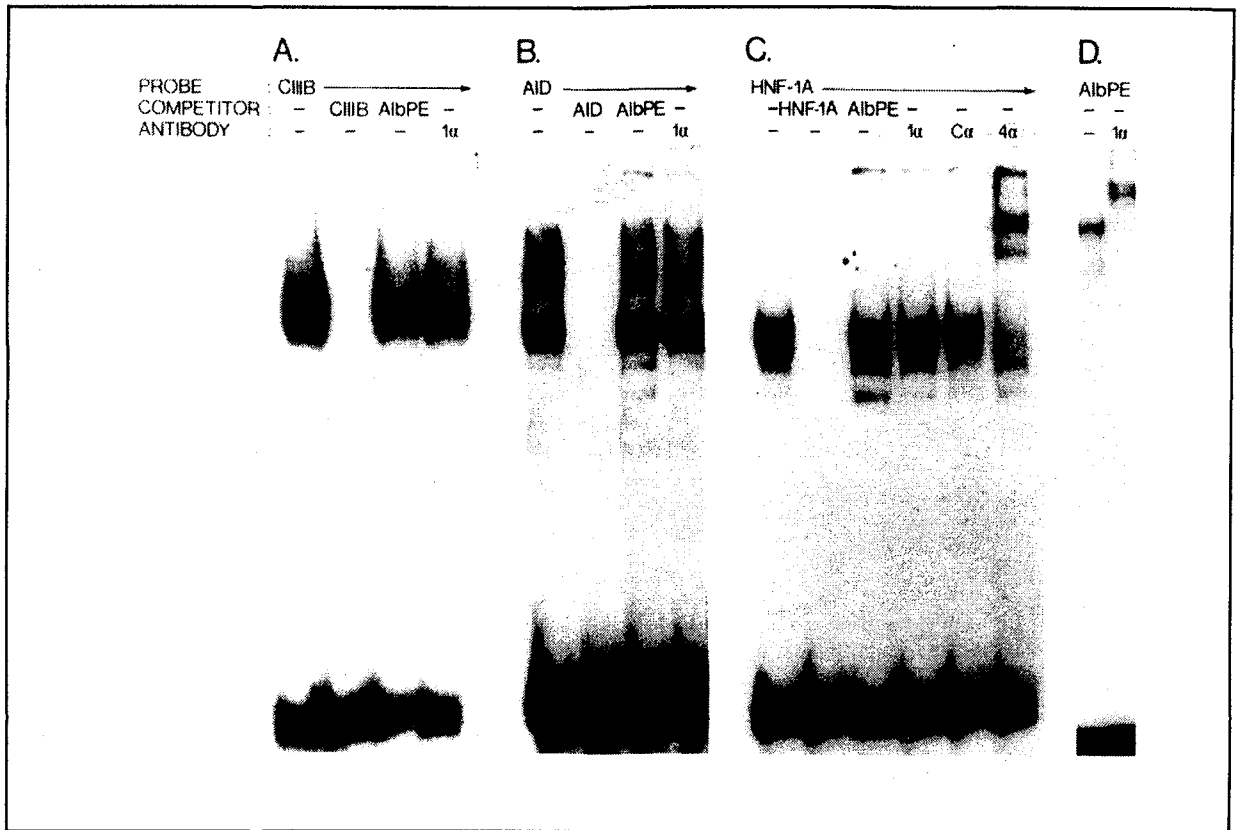
ΕΙΚΟΝΑ Γ4: Αρνητική ρύθμιση των υποκινητών των γονιδίων apoCIII, apoAI και HNF-1 από τους HNF-1 και vHNF-1. Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν με διάφορα ποσά DNA (1,2,3 μg) από τους φορείς έκφρασης pRSV-HNF-1, pRSV-vHNF-1 και pRSV-ΔHNF-1 και με 2 μg DNA από τα γονίδια αναφοράς apoCIII-CAT (A), apoAI-CAT (B), HNF-1-CAT (C) ή Albumin-CAT (D). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των κανονικοποιημένων ενεργοτήτων CAT (normalized CAT activities %) από έξι διαφορετικά πειράματα. Όλες οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστό της ενεργότητας που δίνει η κατασκευή apoCIII-CAT (100%) που αντιστοιχεί στο 15% της ενεργότητας του RSV-CAT. Η κλίμακα στα ιστογράμματα είναι διαφορετική.



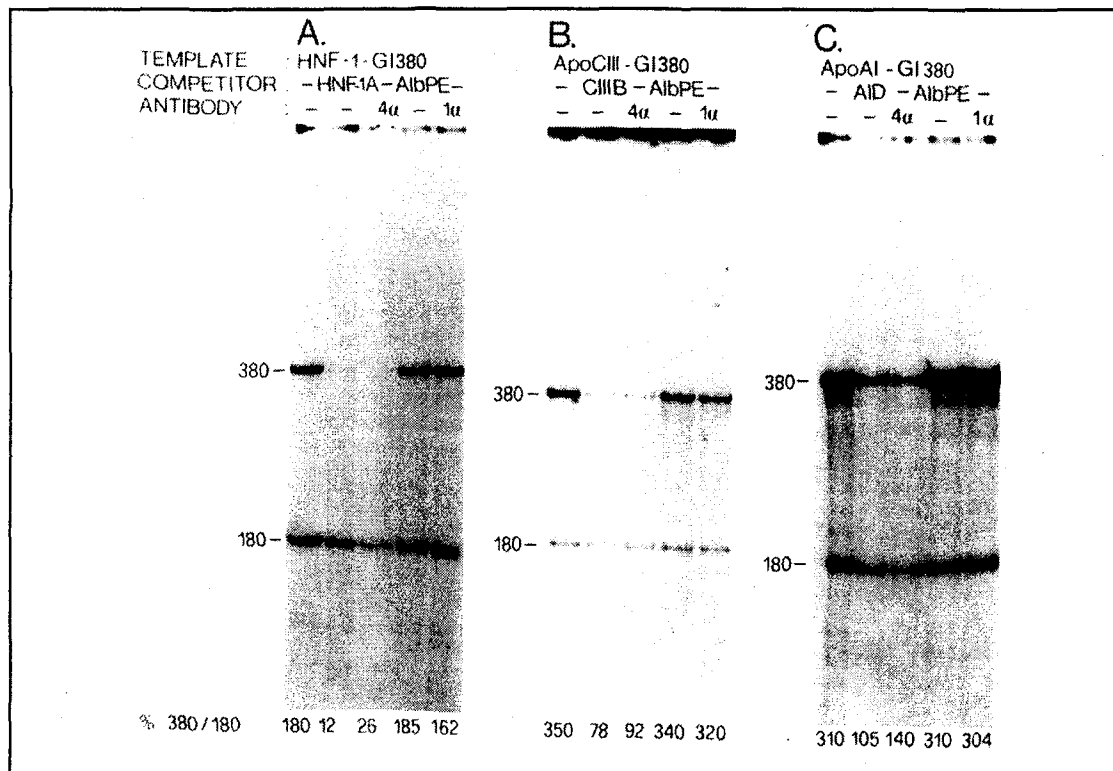
ΕΙΚΟΝΑ Γ5: Παρεμπόδιση της μεταγραφής που επάγεται από τον HNF-4, από τους HNF-1 και vHNF-1. Οι δοκιμές CAT έγιναν με κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2 που είχαν συδαιμολυνθεί με 2 μg DNA των γονιδίων αναφοράς apoCIII-CAT (**A**), apoAI-CAT (**B**), HNF-1-CAT (**C**) και τις ποσότητες DNA που σημειώνονται από τους φορείς έκφρασης pMT-HNF-4, pRSV-HNF-1 και pRSV-vHNF-1. Οι στήλες των ιστογραμμάτων αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των κανονικοποιημένων ενεργοτήτων CAT (normalized CAT activities%) από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Οι τιμές που αναφέρονται εκφράζονται ως ποσοστό της HNF-4- επαγόμενης ενεργότητας του apoCIII-CAT (100%). Κάθε ιστογράμμο έχει φτιαχτεί με διαφορετική κλίμακα.



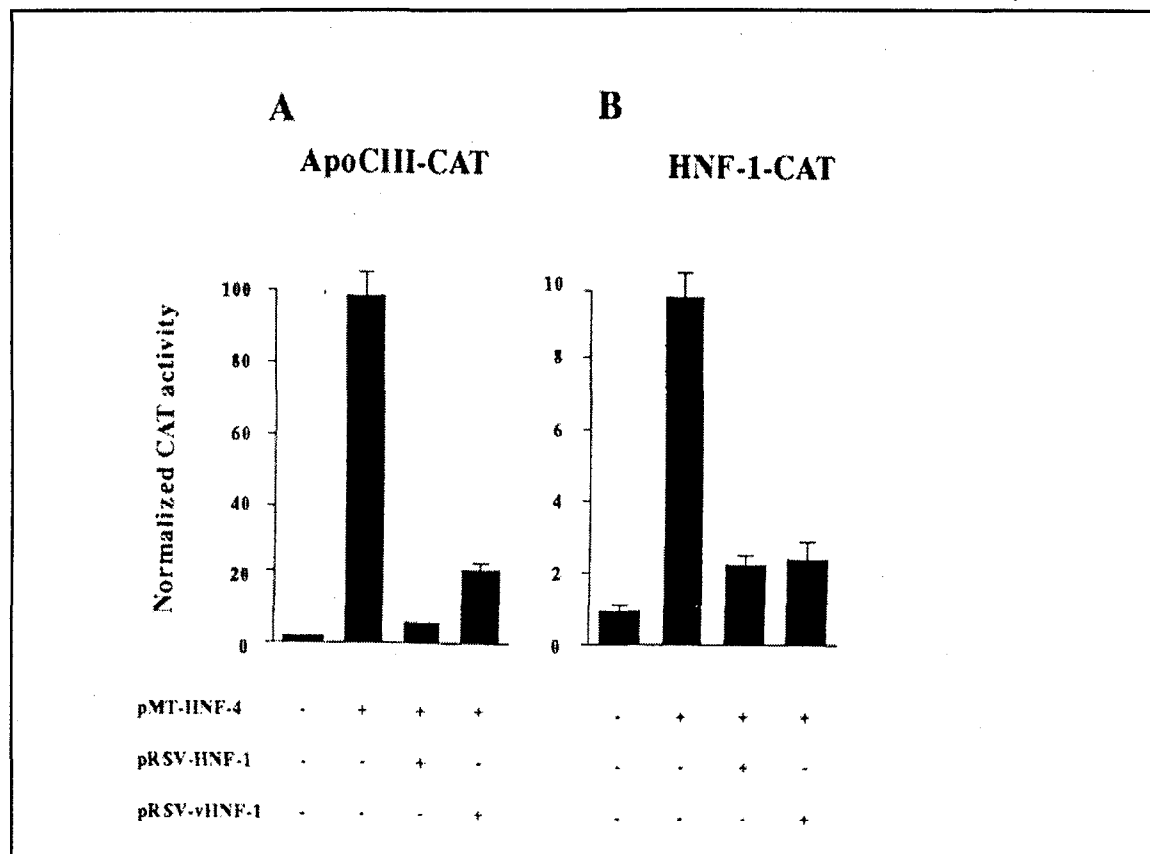
ΕΙΚΟΝΑ Γ6: Η επίδραση των HNF-1 και vHNF-1 στην HNF-4-εξαρτώμενη έκφραση χιμαιρικών κατασκευών. Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν με 5 µg DNA από τα γονίδια αναφοράς HNF-1-A-TK-CAT (A), CIIIB-TK-CAT (B), AID-TK-CAT (C) και TK-CAT, παρουσία (+) ή απουσία (-) 2 µg DNA από τους φορείς έκφρασης pMT-HNF-4, pRSV-HNF-1 και pRSV-vHNF-1. Η κατασκευή περιλαμβάνει τέσσερα αντίγραφα της θέσης πρόσδεσης του HNF-4 στον υποκινητή HNF-1 ("A"), ενώ στους άλλους δύο χιμαιρικούς υποκινητές περιλαμβάνεται ένα αντίγραφο της αντίστοιχης θέσης πρόσδεσης του HNF-4 ("CIIIB", "AID") μπροστά από τον ελάχιστο υποκινητή της θυμιδικής κινάσης (TK). Οι κολώνες των ιστογραμμάτων αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των κανονικοποιημένων ενεργοτήτων CAT (normalized CAT activities %) από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Οι τιμές που αναφέρονται εκφράζονται ως ποσοστό της ενεργότητας του pRSV-CAT (100%). Κάθε ιστόγραμμα έχει φτιαχτεί με διαφορετική κλίμακα.



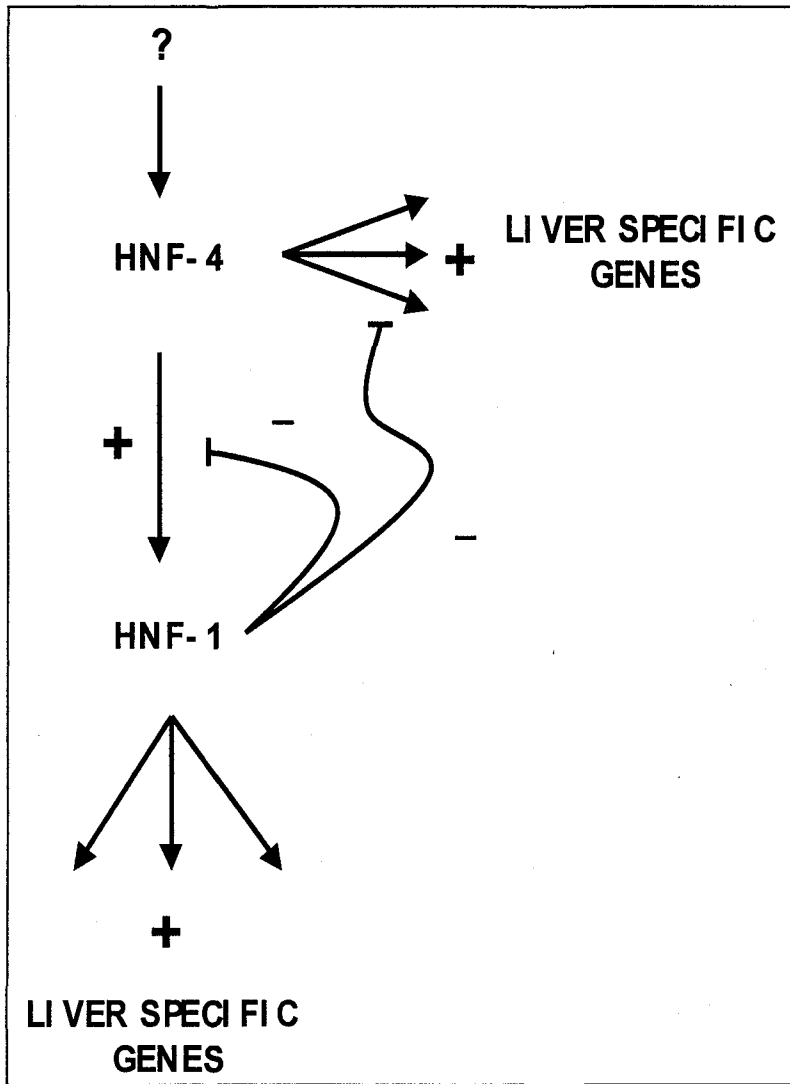
ΕΙΚΟΝΑ Γ7: Οι HNF-1 και HNF-4 δε φαίνεται να αλληλεπιδρούν *in vitro* σε πυρηνικά εκχυλίσματα ήπατος αρουραίου. Στο πείραμα EMSA που φαίνεται στην εικόνα, χρησιμοποιήσαμε πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου (10 µg ανά αντίδραση πρόσδεσης) που αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν με τους ραδιοσημασμένους ανιχνευτές (probe) CIIIB (A), AID (B), HNF-1A (C) ή AlbPE (D). Όπου αναφέρεται, συμπεριλάβαμε στην αντίδραση 100 φορές μοριακή περίσσεια μη σημασμένων ανταγωνιστικών ολιγονουκλεοτιδίων (competitor) ή 1 µl αντισώματος (antibody) HNF-1 (1a), COUP-TF (Ca), HNF-4 (4a) σε αραιώση 1:6.



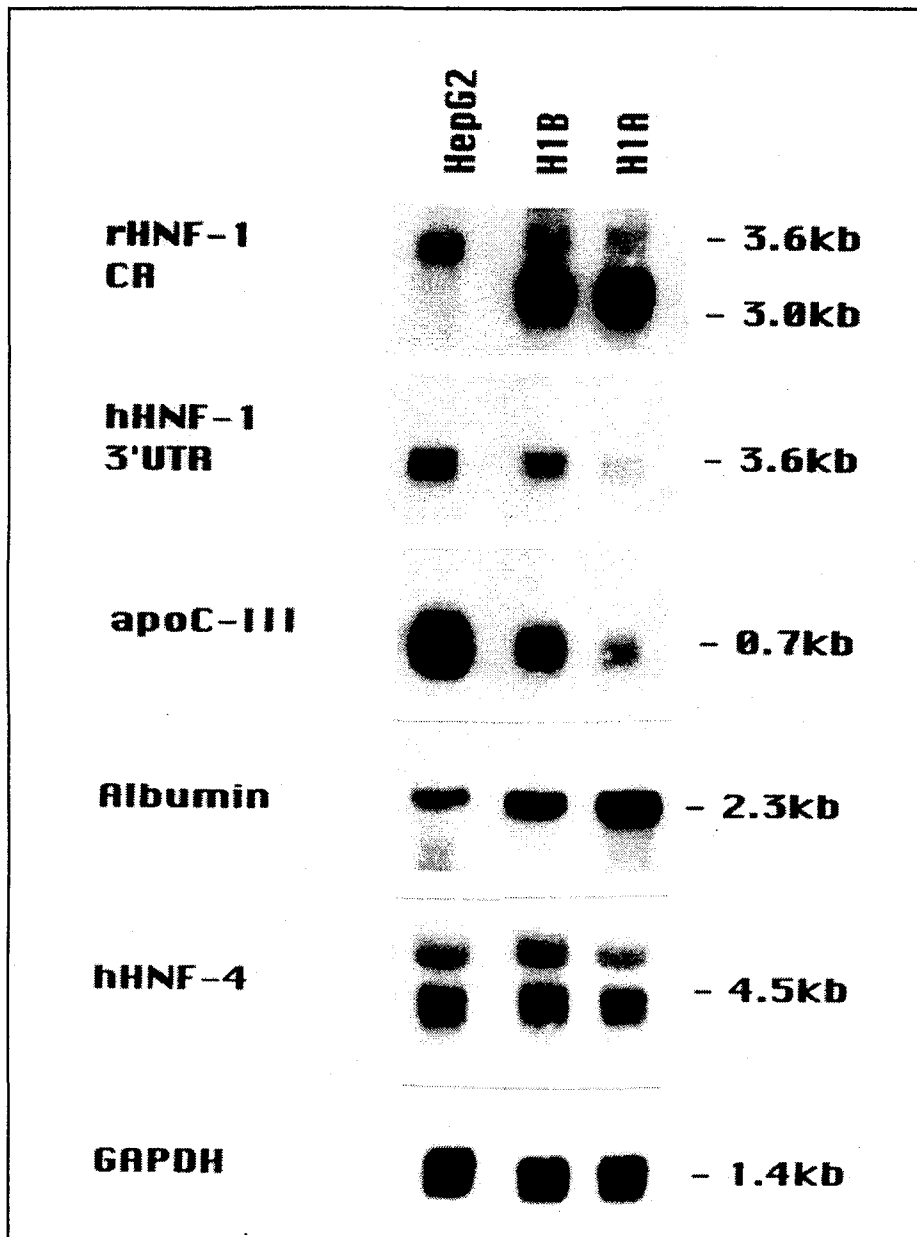
ΕΙΚΟΝΑ Γ8: Οι HNF-1 και vHNF-1 δεν επηρεάζουν τη μεταγραφή των υποκινητών HNF-1, apoCIII, apoAI σε in vitro σύστημα μεταγραφής παρουσία πυρηνικών εκχυλισμάτων από ήπαρ αρουραίου. Συγκεκριμένα, 200 ng από τις κατασκευές (template) HNF-1-GI380 (A), ApoAI-GI380 (C), και 100 ng από την κατασκευή ApoCIII-GI380 (B) επωάστηκαν για μεταγραφή με πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου in vitro. 100 ng από την κατασκευή AdML(180) συμπεριλήφθηκαν σε όλες τις αντιδράσεις ως εσωτερικό δείγμα ελέγχου. Όπου αναφέρεται, τα πυρηνικά εκχυλίσματα (30-40 ng ανά αντίδραση) προεπωάστηκαν με 200 ng ολιγονουκλεοτιδίων ανταγωνιστών (competitor) (HNF-1A, CIII B, AID ή AlbPE), ή με 2 μl αντισωμάτων (antibody) για HNF-1 (1a), HNF-4 (4a) σε αραιώση 1:3. Τα μετάγραφα που πήραμε από τους υποκινητές HNF-1, apoCIII, και apoAI (380) και από τον υποκινητή AdML (180) ποσοτικοποιήθηκαν από την αυτοραδιογραφία με μετρητή πυκνότητας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου από τον υποκινητή AdML (380/180x100).



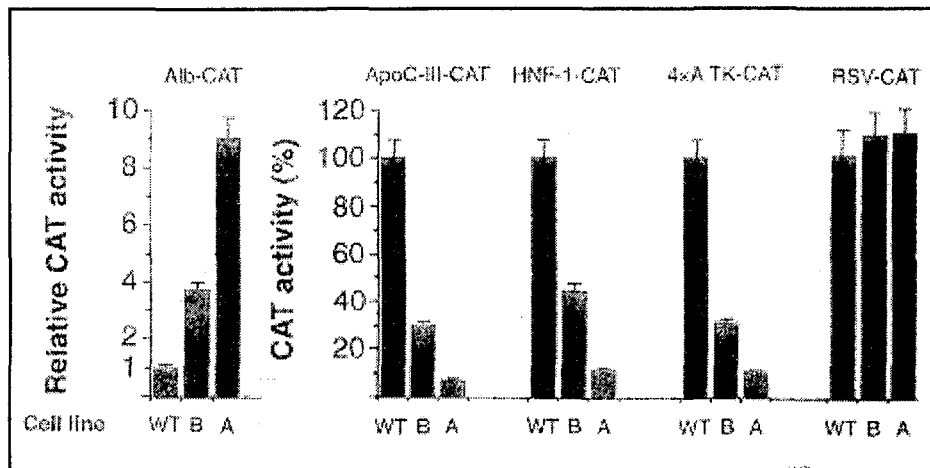
ΕΙΚΟΝΑ Γ9: Οι HNF-1 και vHNF-1 καταστέλλουν την HNF-4 επαγόμενη μεταγραφή σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με 2 µg DNA από τους φορείς έκφρασης pMT-HNF-4, pRSV-HNF-1 ή pRSV-vHNF-1. Οι στήλες των ιστογραμμάτων αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των κανονικοποιημένων ενεργοτήτων CAT (normalized CAT activities%) από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Οι τιμές που αναφέρονται εκφράζονται ως ποσοστό της HNF-4-επαγόμενης ενεργότητας του apoCIII-CAT (100 %).



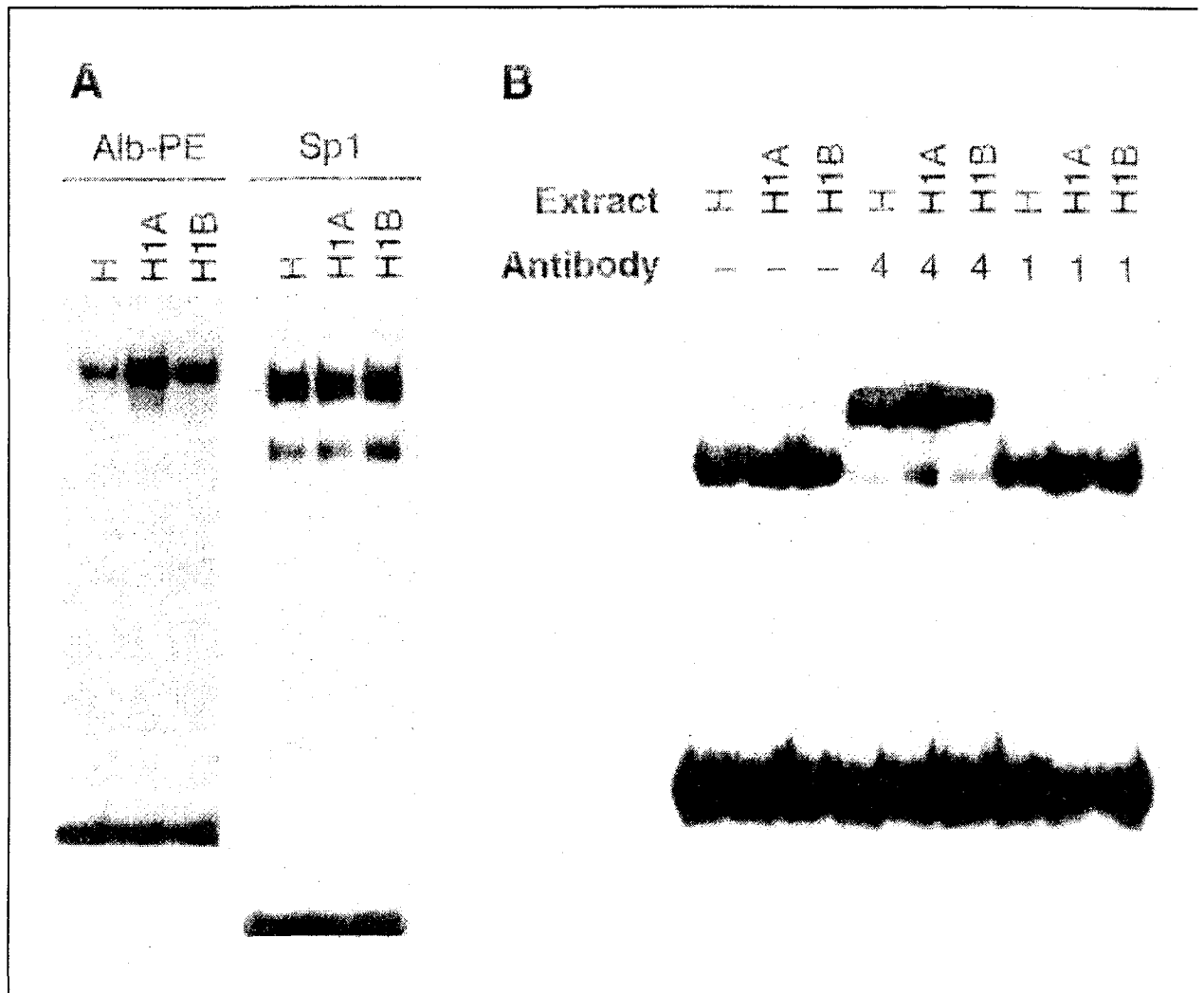
ΕΙΚΟΝΑ Γ10: Ιεραρχία μεταγραφικών μηχανισμών στο ήπαρ







ΕΙΚΟΝΑ Γ11: Εκτοπική έκφραση του HNF-1 στα κύτταρα HepG2 καταστέλλει τη μεταγραφή του ενδογενούς HNF-1 και apoCIII. Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης rCB-HNF-1 και τα κύτταρα που παρήγαγαν σταθερά την πρωτεΐνη επιλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε μέσο καλλιέργειας που συμπεριλάμβανε G418 σε τελική συγκέντρωση 150μg/ml (Geneticin, BRL). Poly-A-RNAs από κύτταρα που εκφράζουν σε διαφορετικά επίπεδα HNF-1 (H1A και H1B) παρασκευάστηκαν και συγκρίθηκαν με αυτά από κύτταρα HepG2 με ανάλυση Northern παρουσία των παρακάτω ανιχνευτών: rHNF-1-CR (που περιλαμβάνει ολόκληρη την κωδική περιοχή του HNF-1 από αρουραίο), hHNF-1 3'UTR(που περιλαμβάνει τα νουκλεοτίδια 2305-2783 από την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του ανθρώπινου HNF-1) καθώς και τα cDNAs που κωδικοποιούν για ανθρώπινη apoCIII, αλβουμίνη ποντικού, ανθρώπινη HNF-4 (hHNF-4) και τέλος GAPDH ως δείγμα ελέγχου. Στο δεξιό τμήμα της εικόνας σημειώνονται τα μεγέθη των υβριδοποιημένων σημάτων.



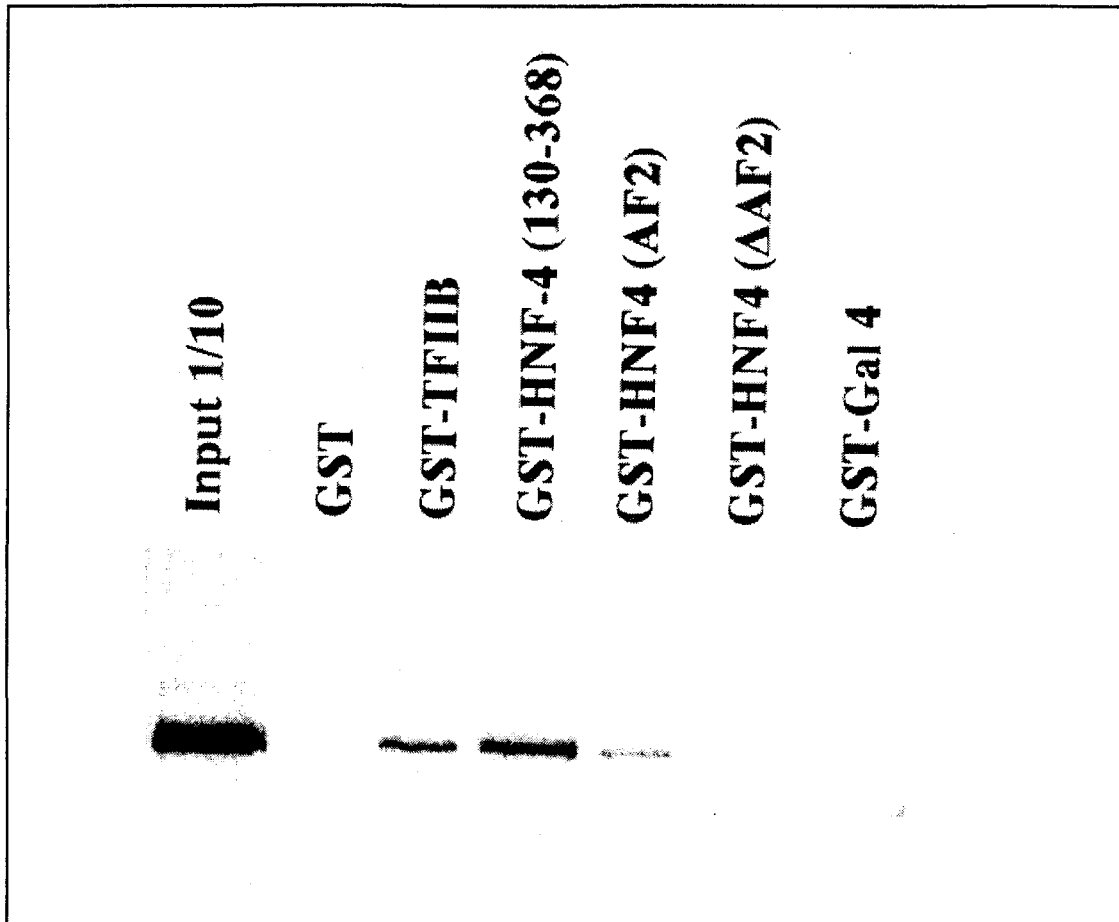
ΕΙΚΟΝΑ 12: Αρνητική μεταγραφική ρύθμιση των HNF-4 εξαρτώμενων υποκινητών από τον HNF-1. Κύτταρα HepG2 αγρίου τύπου ή υπερεκφράζοντα HNF-1 (A, B) (cell line) διαμολύνθηκαν με 2 µg DNA των γονιδίων αναφοράς Alb-CAT, apoCIII-CAT, HNF-1-CAT, 4xTK-CAT και RSV-CAT. Οι στήλες των ιστογραμμάτων αντιστοιχούν στους μέσους όρους των κανονικοποιημένων ενεργοτήτων CAT από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Οι τιμές εκφράζονται σε συσχέτισμό με την ενεργοποίηση του Alb-CAT ή ως ποσοστό της αντίστοιχης ενεργότητας που μετρήθηκε στα αγρίου τύπου HepG2 (relative CAT activity).



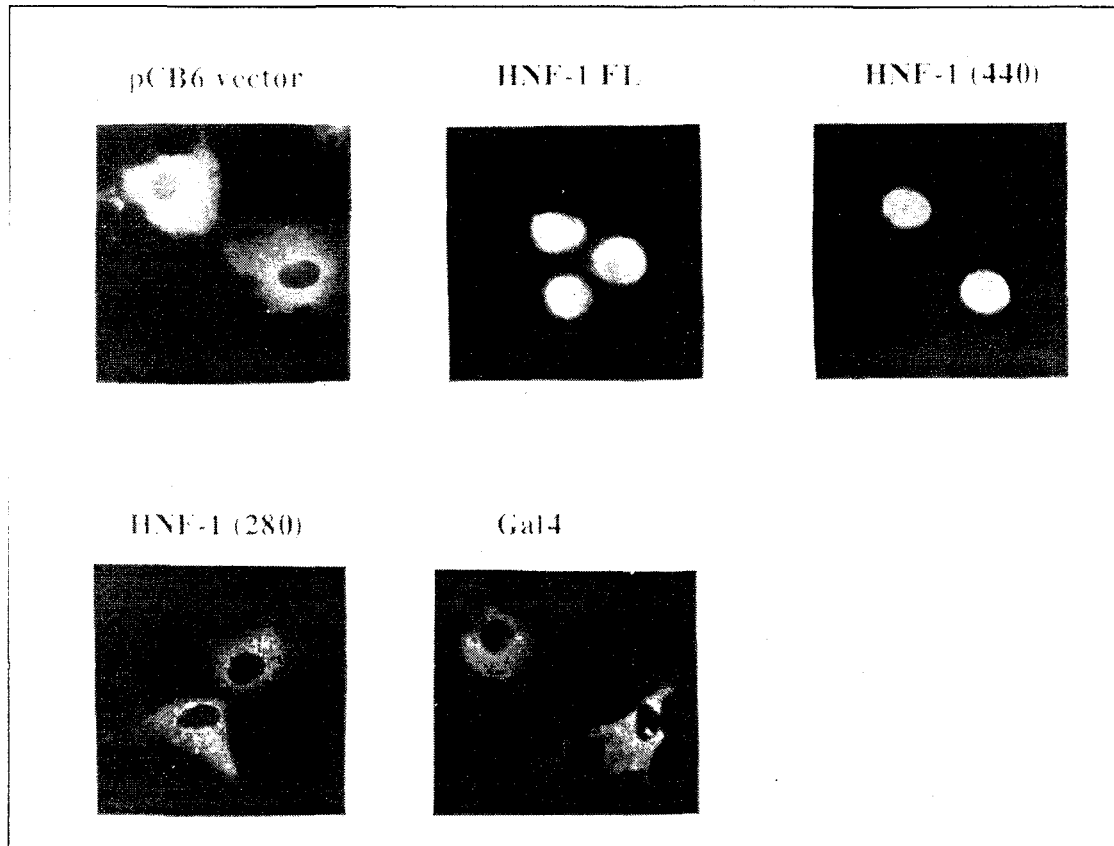
ΕΙΚΟΝΑ 13: Η θέση "Α" του HNF-1 υποκινητή στρατολογεί τον HNF-4 αλλά όχι τον HNF-1. Πυρηνικά εκχυλίσματα από αγρίου τύπου (H) και υπερεκφράζονται (H1A και H1B) HepG2 κύτταρα παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν σε EMSA. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν οι θέσεις πρόσδεσης AlbPE και Sp1 (A) ή η θέση "Α" (B). Οπου σημειώνεται, συμπεριλάβαμε στην αντίδραση πρόσδεσης και 1μl αντισώματος που αναγνωρίζει HNF-4 (4) ή HNF-1 (1) σε αραιώση 1:6. Η πρόσδεση του HNF-1 στη θέση AlbPE επιβεβαιώθηκε με την επίδραση HNF-1 αντισώματος.

		COS-1 cells						
		HepG2 cell lines			+HNF-1			
		WT	H1B	H1A	-HNF-1	FL	M280	M440
Gal4 DBD		1.0	0.9	1.1	1.0	1.1	1.1	0.9
Gal4 HNF-4(E)		18.2	9.8	5.1	23.5	2.8	22.6	3.5
Gal4 HNF-4(E354)		1.2	1.1	1.3	1.1	1.0	0.9	1.2
Gal4 VP16		159.0	143.5	150.8	182.7	178.5	185.2	175.6

ΕΙΚΟΝΑ Γ14: Ο HNF-1 καταστέλλει την ενεργότητα του HNF-4 μέσω αλληλεπίδρασης με την περιοχή E του HNF-4 μορίου *in vivo*. Κυτταρικές σειρές Cos-1 και HepG2 (WT, H1B, H1A) διαμολύνθηκαν με 2 µg DNA του γονιδίου αναφοράς G4CAT που περιέχει τέσσερα αντίγραφα της θέσης πρόσδεσης της Gal4 και 0.5 µg DNA από τους φορείς έκφρασης που αναφέρονται στην εικόνα. Στα κύτταρα Cos1 συμπεριλάβαμε και 0.5 µg DNA των αναγραφόμενων φορέων έκφρασης pCB-HNF-1(FL), pCB-HNF-1(M280), pCB-HNF-1(440) (M440). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των κανονικοποιημένων ενεργοτήτων CAT από τουλάχιστον έξι πειράματα και εκφράζονται ως ποσοστά της ενεργότητας που παίρνουμε από την κατασκευή Gal4DBD. Η μέγιστη ενεργότητα που πήραμε ήταν με την κατασκευή που περιλαμβάνει ολόκληρη την περιοχή E του HNF-4 [Gal4-HNF-4(E)]. Καμιά ενεργότητα δεν είχαν οι κατασκευές που περιλαμβάνουν συνδυασμούς διαφόρων άλλων τμημάτων του HNF-4 (337-368, 337-455, 368-455, 227-455), γεγονός που δείχνει την αναγκαιότητα της παρουσίας ολόκληρης της περιοχής E προκειμένου να είναι ενεργό το AF2.



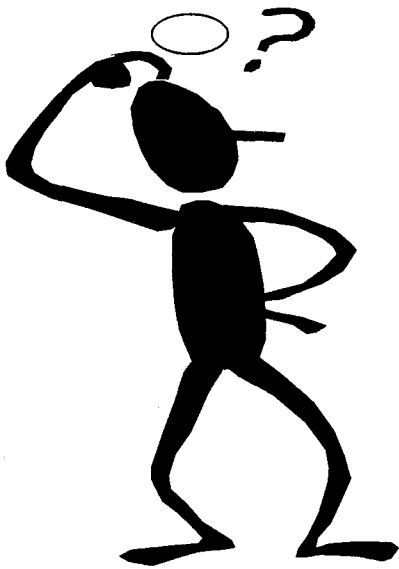
ΕΙΚΟΝΑ Γ15: Αλληλεπίδραση του HNF-1 με την περιοχή AF2 του HNF-4 in vitro. Συνθέσαμε in vitro HNF-1 με το σύστημα TNT (reticulocyte lysate system, Promega) σημασμένο με [³⁵S] μεθειονίνη και το προϊόν αφέθηκε να αλληλεπιδράσει με τις εκφρασμένες σε βακτήρια πρωτεΐνες που αναγράφονται. Πρόκειται για διάφορα τμήματα του μορίου HNF-4 με συγχώνευση με GST (GST-HNF-4(130-368), GST-HNF-4(AF2), GST-HNF-4(ΔAF2)), καθώς και τους παράγοντες TFIIB, ή Gal4 σε σύντηξη με την GST (GST-TFIIB, GST-Gal4 αντίστοιχα), ή τέλος την GST μόνη της. Μετά την παραγωγή τους σε JM109, οι πρωτεΐνες αυτές προσδέθηκαν σε Glutathione Sepharose beads (σφαιρίδια σεφαρόζης με γλουταθειόνη), επώαστηκαν παρουσία κατάλληλου διαλύματος με την in vitro συνθεμένη HNF-1. Στην εικόνα βλέπουμε τα αποτελέσματα αυτής της αλληλεπίδρασης. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 10 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η αυτοραδιογραφία αποκαλύπτει την αλληλεπίδραση του HNF-1 με κάποιες από τις βακτηριακές πρωτεΐνες. Η παρουσία του AF2 είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών. Η HNF-1 φαίνεται να αλληλεπιδρά ακόμα με τον TFIIB ενώ δεν αναγνωρίζει την GST και την GST-Gal4. 8 % από το προϊόν της in vitro σύνθεσης φαίνεται στην πρώτη διαδρομή (input).



ΕΙΚΟΝΑ Γ16: Κύτταρα Cos1 διαμολύνθηκαν με 500 ng από φορέα έκφρασης που παράγει μετάλλαγμα της HNF-4 το οποίο δεν έχει την αλληλουχία που οδηγεί το μόριο στον πυρήνα (pMT-HNF-4(227-455)), ή από το φορέα pCB μόνο του (vector), ή 1 μg DNA από τους φορείς έκφρασης pCB-HNF-1, pCB-HNF-1(440), pCB-HNF-1(280) ή από το φορέα έκφρασης pBx-Gal4. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες και βάφτηκαν με αντίσωμα που αναγνωρίζει στο καρβοξυτελικό άκρο του HNF-4 μια αλληλουχία 11 αμινοξέων. Οι εικόνες ανοσοφθορισμού είναι σε μεγέθυνση x284. Όπως παρατηρούμε, η συνύπαρξη του μεταλλάγματος της HNF-4 με τον HNF-1 είναι ικανή να οδηγήσει τον πρώτο στον πυρήνα. Το φαινόμενο αυτό έδειξε να είναι ειδικό μια και η παρουσία του Gal4 δεν είχε καμιά επίδραση στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση του HNF-4.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

**Η ΦΥΣΙΚΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ COUP-TFS ΜΕ
ΤΟΝ HNF-4 ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ
ΥΠΕΡΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ HNF-4**



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι COUP-TFs (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factors) είναι μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων στεροειδών, θυρεοειδών ορμονών και βιταμινών (28, 59, 86). Ο COUP-TFI είναι γνωστός και με το όνομα Ear3 (erbA-related factor) (125, 156), ενώ ο COUP-TFII με το όνομα Arp1 (apoAI regulatory protein) (71). Από HeLa πυρηνικά εκχυλίσματα συναπομονώνονται με την S300II, μια πρωτεΐνη που δεν προσδένεται σε DNA, χωρίς όμως να έχει μέχρι τα τώρα διασαφηνιστεί ο λειτουργικός τους συσχετισμός με την πρωτεΐνη αυτή (151). Οι COUP-TFs μπορούν να ενεργοποιηθούν από νευροδιαβιβαστικές ουσίες όπως οι κατεχολαμίνες και οι ντοπαμίνες παρόλο που δεν έχουν τη δυνατότητα να τις προσδένουν (117). Μολονότι δεν έχει βρεθεί προσδέτης για τους COUP-TFs, αν ένα τέτοιο μόριο υπάρχει μπορεί ο υποδοχέας να έχει διαφορετικό τρόπο δράσης παρουσία και απουσία του προσδέτη του. Οι COUP-TFI και COUP-TFII παρουσιάζουν μεταξύ τους υψηλή ομολογία που φτάνει στα 87 %. Πολύ συντηρημένες σε επίπεδο αμινοξέων είναι οι περιοχές που προσδέονται σε DNA (98 %) και οι δυνητικές θέσεις αναγνώρισης από τον προσδέτη (97 %) (71). Παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τη δροσοφιλική πρωτεΐνη seven up που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ματιού (117).

Η αλληλουχία τους που προσδένεται σε DNA σχηματίζει δύο δακτύλους ψευδαργύρου (Zn-fingers) που είναι χαρακτηριστικοί για όλα τα μέλη της υπερικογένειας. Η ομολογία αυτή δεν χαρακτηρίζει μόνο τους παράγοντες μέσα στο ίδιο είδος αλλά και από είδος σε είδος. Για παράδειγμα, η αμινοξική αλληλουχία του COUP-TFI είναι στο σύνολο του μορίου συντηρημένη κατά 90% από τη δροσόφιλα μέχρι τον αχινό (117). Η υψηλή συντήρηση του μορίου, με την πάροδο της εξέλιξης είναι μια σοβαρή ένδειξη για το πόσο σημαντικό ρόλο διαδραματίζει αυτό στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τις ζωτικές λειτουργίες κάποιου ιστού.

Μεταξύ των γονιδίων που έχει βρεθεί ότι ρυθμίζονται από τους COUP-TFs, συγκαταλέγονται αυτά της οβαλβουμίνης του κοτόπουλου, της ινσουλίνης II του αρουραίου, της απολιποπρωτεΐνης πολύ χαμηλής πυκνότητας II (apo VLDL II) και της προπιομελανοκορτίνης (POMC) (28, 37, 86, 117, 125). Συγκεκριμένα για τα θηλαστικά, οι COUP-TFs είναι βασικοί μεταγραφικοί ρυθμιστές των γονιδίων που εκφράζονται στο ήπαρ, το έντερο, τη μήτρα και διάφορους νευρικούς ιστούς (117). Επίσης εκφράζονται ευρέως στο κεντρικό νευρικό σύστημα με επικαλυπτόμενο

πρότυπο έκφρασης και ενέχονται στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του συστήματος αυτού ειδικά στην εξειδίκευση των νευρομερών του διεγκέφαλου (117, 156).

Δείχθηκε ότι οι COUP-TFs ρυθμίζουν αρνητικά τα γονίδια που έχουν στοιχεία cis για ετεροδιμερή RaR/RxR και για ομοδιμερή RxR/RxR (15, 29, 62, 78, 82, 95, 99, 122). Η αρνητική δράση τους μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της ανταγωνιστικής πρόσδεσης των COUP-TFs στις θέσεις πρόσδεσης των ρετινοϊκών υποδοχέων, ή της κατάσχεσης των μονομερών RxR, συνεπώς της παρεμπόδισης του σχηματισμού των διμερών RxR/RxR και RxR/RaR. Όσον αφορά στη συγγένεια πρόσδεσης, είναι γνωστό ότι για παράδειγμα στη θέση A του υποκινητή apoAI, οι COUP-TFs και RaRa προσδένονται με 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια ως ετεροδιμερή παρά ως ομοδιμερή (122, 149, 156).

Το διμερές των COUP-TFs αναγνωρίζει δύο "GGTCA" επαναλήψεις ως στόχο πρόσδεσης σε DNA. Το διμερές χαρακτηρίζεται από μια σχετική «ευκαμψία», υφίσταται δηλαδή συχνά τροποποιήσεις στη στερεοδιαμόρφωσή του για να προσδεθεί σε παραλλαγές του στόχου του. Μια συνέπεια της επιπόλαιας πρόσδεσής του σε DNA είναι η ικανότητά του να ρυθμίζει αρνητικά γονίδια τα οποία απαντούν σε ορμόνες όπως θυρεοειδείς, στεροειδείς, ρετινοϊκό οξύ και στη βιταμίνη D3, και κατά συνέπεια διαθέτουν στους υποκινητές τους τις θέσεις πρόσδεσης των αντίστοιχων υποδοχέων (29).

Εντούτοις, η συγγένεια πρόσδεσης και η σχετική συγγένεια πρόσδεσης δεν είναι ίδιες σε όλες τις περιπτώσεις. Μπορούμε να αναφέρουμε για παράδειγμα την ιδιαίτερη προτίμηση του COUP-TFI να προσδένεται σε ευθείες επαναλήψεις (DR1) και σε TREs (thyroid hormone response element) ενώ με πολύ μικρότερη συγγένεια προσδένεται σε EREs (estrogen response element) και πολύ ασθενώς σε GREs (glucocorticoid response element). Εντελώς ανάλογες προτιμήσεις έχουν αναφερθεί και για την πρόσδεση του RxRa. Έτσι, οι δύο αυτοί ορμονικοί υποδοχείς ενέχονται στη ρύθμιση των ίδιων γονιδίων συμμετέχοντας άλλοτε ως ομοδιμερή και άλλοτε ως ετεροδιμερή (29, 15, 82).

Οι COUP-TFs μπορούν να δράσουν ως καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης με δύο τρόπους (78):

ΠΑΘΗΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ: όπου ο καταστολέας καταργεί την πρόσδεση ενός ενεργοποιητή της μεταγραφής λόγω ανταγωνιστικής πρόσδεσης στα ίδια ή επικαλυπτόμενα cis ρυθμιστικά στοιχεία.

ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ: όταν μέσω διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων οδηγεί στο σχηματισμό ανενεργού συμπλόκου μεταγραφής. Μπορούμε επίσης να

αποδώσουμε την κατασταλτική φύση της δράσης τους στον ανταγωνισμό με κάποιον ενεργοποιητή για στρατολόγηση κάποιου βοηθητικού παράγοντα ή γενικού μεταγραφικού παράγοντα που βρίσκεται σε περιορισμένες συγκεντρώσεις. Τέλος μπορεί να έχουμε το φαινόμενο του quenching ή masking όπου πλησίον αλληλουχίες DNA καταλαμβάνονται από έναν ενεργοποιητή και ένα καταστολέα. Στην περίπτωση αυτή η δράση του δεύτερου υπερισχύει έναντι του πρώτου λόγω αλληλεπίδρασης και «φίμωσης» της αλληλουχίας ενεργοποίησης του πρώτου.

Στην περίπτωση των COUP-TFs βρέθηκε ότι δύο διαφορετικά τμήματα του μορίου ευθύνονται για την παθητική και την ενεργητική καταστολή. Η ενεργητική καταστολή φαίνεται να είναι ο πιο συνηθής τρόπος δράσης των COUP-TFs κι ο μηχανισμός του είναι μέσω στερεοχημικής παρακώλυσης της αλληλουχίας δράσης του ενεργοποιητή (78).

Αντίθετα, σύμφωνα με τους τελευταίους, είναι πιο πιθανό οι COUP-TFs να ασκούν την κατασταλτική τους δράση μέσω ανταγωνισμού με ομοδιμερή άλλων ορμονικών υποδοχέων για πρόσδεση στα ίδια cis ρυθμιστικά στοιχεία (15, 95).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΟΙ COUP-TFI & COUP-TFII ΕΝΙΣΧΥΟΥΝ ΤΗΝ HNF-4-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ HNF-1

Κατά τη μελέτη του υποκινητή HNF-1 εντοπίστηκε μια θέση πρόσδεσης για τον HNF-4 (θέση «A») που αποτελεί στόχο για τον HNF-4 τόσο σε ομόλογες όσο και σε ετερόλογες κατασκευές υποκινητών. Έτσι, ο HNF-4 χαρακτηρίστηκε ως ο κυριότερος ενεργοποιητής του γονιδίου του HNF-1 και τοποθετήθηκε στην κορυφή της μεταγραφικής ιεραρχίας των μεταγραφικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τη διαμόρφωση και τη διατήρηση του ηπατικού φαινοτύπου. Η διαπίστωση ότι η θέση «A» είναι τύπου ευθέων επαναλήψεων 1 (DR1) μας οδήγησε στην ιδέα να διερευνήσουμε την πιθανότητα να προσδένονται σ' αυτήν και οι παράγοντες COUP-TFI & COUP-TFII μια και είναι γνωστό ότι η DR1 είναι δυνητική θέση πρόσδεσης και για άλλους ορμονικούς υποδοχείς.

Επιλέξαμε την κυτταρική σειρά Cos-1 γιατί είναι γνωστό ότι σ' αυτήν δεν εκφράζονται οι παράγοντες HNF-4 και οι COUP-TFs (**ΕΙΚΟΝΑ Δ1**). Τα κύτταρα διαμολύθηκαν με κατασκευή στην οποία το γονίδιο CAT βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή HNF-1. Παράλληλα μ' αυτή την κατασκευή, τα κύτταρα διαμολύθηκαν με φορείς έκφρασης για τους παράγοντες HNF-4 και COUP-TFs καθώς και συνδυασμό τους. Στην **ΕΙΚΟΝΑ Δ2** φαίνονται διαγραμματικά τα αποτελέσματα της δοκιμής CAT απουσία των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων(1), παρουσία HNF-4 (2), παρουσία COUP-TFI (3), HNF-4 & COUP-TFI (4), και HNF-4 & COUP-TFII (5). Οι αντίστοιχες συνδιαμολύσεις έγιναν και με την κατασκευή όπου ο υποκινητής αροCIII ελέγχει την έκφραση του CAT. Στην περίπτωση του υποκινητή αροCIII, τα αποτελέσματα ήταν απολύτως αναμενόμενα: παρουσία του HNF-4, η ενεργότητα του υποκινητή αροCIII αυξάνεται 25 φορές, ενώ παρουσία των COUP-TFI ή COUP-TFII δεν φαίνεται να επηρεάζεται η μεταγραφή του γονιδίου. Η ταυτόχρονη παρουσία του HNF-4 με κάποιον από τους COUP-TFI ή COUP-TFII καταργεί την ενεργοποίηση του γονιδίου από τον HNF-4. Είναι γνωστό από προηγούμενες εργασίες ότι στην περίπτωση του υποκινητή αροCIII ότι ο HNF-4 ανταγωνίζεται με τους COUP-TFI & II για κοινή θέση πρόσδεσης (CIIIB) (**ΕΙΚΟΝΑ Δ3**) με αποτέλεσμα η θετική δράση του HNF-4 να αναστέλλεται κατά ένα σημαντικό ποσοστό παρουσία των COUP-TFs.

Προς μεγάλη μας έκπληξη, η κατάσταση δεν είναι ίδια στην περίπτωση του υποκινητή HNF-1. Η, συγκριτικά με την περίπτωση του υποκινητή αροCIII, μικρή αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας παρουσία του HNF-4 ενισχύεται δραματικά παρουσία COUP-TFI & II (15 και 13 φορές αντίστοιχα).

Οι COUP-TFs που μέχρι τώρα ήταν γνωστοί να παίζουν το ρόλο του «κακού» σε υποκινητές όπου προσδένονται μια και είναι πιο ασθενείς ενεργοποιητές της μεταγραφής έχοντας όμως παρόμοια συγγένεια πρόσδεσης με τον HNF-4, φαίνεται να ενισχύουν στην συγκεκριμένη περίπτωση αυτή τη δράση του HNF-4. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που πήραμε με τους δύο υποκινητές, επαναλάβαμε την ίδια σειρά συνδιαμολύνσεων (**ΕΙΚΟΝΑ Δ4**), χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά το γονίδιο CAT υπό τον έλεγχο μιας ή περισσότερων μεμονωμένων θέσεων πρόσδεσης του HNF-4 από διάφορους HNF-4-εξαρτώμενους υποκινητές, μπροστά από τον ελάχιστο υποκινητή της θυμιδικής κινάσης (TK). Επιλέξαμε τη θέση πρόσδεσης του HNF-4 από διάφορους υποκινητές όπως αυτόν της α1-αντιπρυψίνης (1xLFA1), της τρανσθυροτίνης (2xTTR), του HNF-1 (1xA) και της αροCIII (1xCIIIB). Οι δύο πρώτες από τις παραπάνω θέσεις πρόσδεσης είναι γνωστοί στόχοι για τον HNF-4 κι όχι για τους COUP-TFs ενώ για τη θέση CIIIB είναι γνωστό ότι σ' αυτό προσδένονται με συγκρινόμενες συγγένειες πρόσδεσης τόσο ο HNF-4 όσο και οι COUP-TFs. Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών επιβεβαιώνουν αυτά των ομόλογων υποκινητών. Στην περίπτωση του "1xCIIIB"TK CAT, τα αποτελέσματα είναι εντελώς ανάλογα μ' αυτά που πήραμε στην κατασκευή με ολόκληρο τον υποκινητή αροCIII. Για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο ότι οι υπό έλεγχο μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με τον ελάχιστο υποκινητή της θυμιδικής κινάσης του herpes simplex virus, κάναμε τις αντίστοιχες συνδιαμολύνσεις χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το CAT υπό τον έλεγχο του ελάχιστου αυτού υποκινητή.

Στην περίπτωση του "1xA" TK CAT, η κατά επτά φορές ενεργοποίηση του χιμαιρικού υποκινητή από τον HNF-4 αυξάνεται επιπλέον κατά 16 και 17 φορές παρουσία του COUP-TFI και COUP-TFII αντίστοιχα. Στην περίπτωση του "1xLFA1"TK-CAT η παρουσία του HNF-4 αυξάνει τα επίπεδα του CAT 2-7 φορές ενώ η ταυτόχρονη παρουσία του COUP-TFI ή COUP-TFII ανεβάζει επιπλέον κατά 13 και 12 φορές αντίστοιχα τα επίπεδα του CAT. Η παρουσία του HNF-4 στο χιμαιρικό υποκινητή "2xTTR"TK CAT αυξάνει τη μεταγραφή κατά 3.2 φορές ενώ η ταυτόχρονη παρουσία των COUP-TFs επιπλέον κατά 19 και 21 φορές αντίστοιχα. Όλοι οι παραπάνω υποκινητές φάνηκε να μην αποκρίνονται στους COUP-TFs απουσία του HNF-4. Η διαπίστωση αυτή σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στις HNF-4 θέσεις των

TTR και α1AT προσδένεται επιλεκτικά ο HNF-4 κι όχι οι COUP-TFs μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η ενίσχυση της δράσης του HNF-4 που παρατηρούμε μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής του με τους COUP-TFs. Κάτι ανάλογο μπορεί να συμβαίνει και στην περίπτωση της θέσης A του υποκινητή HNF-1.

ΟΙ COUP-TFI ΚΑΙ COUP-TFII ΔΕΝ ΠΡΟΣΔΕΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΘΕΣΗ Α ΤΟΥ HNF-1 ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ

Το ερώτημα που προέκυψε από τα παραπάνω είναι αν πραγματικά και η θέση A του υποκινητή HNF-1 που είναι τύπου DR1 που προσδένει επιλεκτικά HNF-4 κι όχι COUP-TFs. Κύτταρα Cos1 διαμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης για HNF-4, COUP-TFI, COUP-TFII καθώς και με συνδυασμούς τους. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από αυτά τα κύτταρα ελέγχθηκαν με ανιχνευτή τη ραδιοσημασμένη θέση "A" και ως control με τη θέση CIIIB που είναι στόχοι πρόσδεσης του HNF-4 στον HNF-1 και στον υποκινητή apoCIII αντίστοιχα (**ΕΙΚΟΝΑ Δ5**). Στην περίπτωση του ολιγονουκλεοτιδίου CIIIB παρατηρούμε ότι όπως αναμένεται, προσδένονται και οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες. Στο ολιγονουκλεοτίδιο A προσδένεται μόνο ο HNF-4 ενώ στα εκχυλίσματα των κυττάρων που υπερεκφράζουν COUP-TFs δεν παρατηρήθηκε καμιά πρόσδεση στον ανιχνευτή. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των κυτταρικών εκχυλισμάτων που προήλθαν από κύτταρα τα οποία συνδιαμολύνθηκαν με συνδυασμό του HNF-4 και των COUP-TFs. Τα σύμπλοκα του HNF-4 και των COUP-TFI ή COUP-TFII έχουν την ίδια κινητικότητα. Για να ελέγξουμε την πιθανότητα ετεροδιμερισμού του, επαναλάβαμε τις ίδιες διαμολύνσεις χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά φορέα έκφρασης για μια μεταλλαγή του HNF-4 (HNF-4 1-368) από την οποία απουσιάζει το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου το οποίο όμως εξακολουθεί να διατηρεί όλες τις υπόλοιπες ιδιότητες της wtHNF-4 (διμερισμό, πρόσδεση σε DNA, μεταγραφική ενεργότητα). Σε πειράματα υστέρησης κινητικότητας, δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε ετεροδιμερισμό του HNF-4 (1-368) με τους COUP-TFI , II, επιβεβαιώνοντας τη μέχρι τώρα γνωστή ανικανότητα του HNF-4 για σχηματισμό ετεροδιμερών με άλλους ορμονικούς υποδοχείς. Τα πειράματα που περιγράφονται στις εικόνες Δ6 και Δ7 αποτελούν μια άλλη προσέγγιση για να δείξουμε την αδυναμία της θέσης "A" να στρατολογήσει τους μεταγραφικούς ρυθμιστές COUP-TFI & COUP-TFII.

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ COUP-TFS ΜΕ ΤΟΝ HNF-4 IN VIVO & IN VITRO.

Με σκοπό να ανιχνεύσουμε αλληλεπιδράσεις του HNF-4 με τους COUP-TFs οι οποίες λόγω του ότι μπορεί να είναι αρκετά ασθενείς δεν ήταν δυνατόν να διατηρηθούν στις συνθήκες ηλεκτροφόρησης του παραπάνω πειράματος, φτιάξαμε μια σειρά 3' ελλείψεων του HNF-4 όπως φαίνεται στην **ΕΙΚΟΝΑ Δ8Α**. Η ενεργότητα καθώς και η ενίσχυσή της από την παρουσία των COUP-TFI και COUP-TFII ελέγχθηκε σε δοκιμές ενεργότητας του ενζύμου CAT. Στην κατασκευή HNF-4(1-368) λείπει η περιοχή F του μορίου από το καρβοξυτελικό άκρο, ενώ συμπεριλαμβάνει 30 νουκλεοτίδια (337-368) που παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με την περιοχή που δρα ως ενεργοποιητής της μεταγραφής (activation function 2 -AF2-) άλλων ορμονικών υποδοχέων. Αντίθετα, η ειδοποιός διαφορά της κατασκευής HNF-4(1-354) με την προηγούμενη είναι η έλλειψη της αλληλουχίας AF2. Όπως φαίνεται στην εικόνα Δ8Α, η έλλειψη της αλληλουχίας AF2 συνεπάγεται την απώλεια της μεταγραφικής ενεργότητας του μορίου HNF-4 και της ενίσχυσής της από τους COUP-TFs. Αντίθετα, η κατασκευή HNF-4 (1-368) συμπεριφέρεται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο όπως το αγρίου τύπου μόριο, παρατήρηση που αναδεικνύει την περιοχή AF2 ως απαραίτητη για την ενίσχυση της δράσης του HNF-4 από τους COUP-TFs.

Έτσι, φάνηκε ότι δεν είχε νόημα να γίνουν ελλείψεις που να προχωρούν βαθύτερα από το 3' άκρο μια και θα οδηγούσαν σε αδυναμία διμερισμού, πρόσδεσης και μεταγραφικής ενεργότητας του μορίου. Για να παρακάμψουμε την αναγκαιότητα της ύπαρξης της περιοχής διμερισμού που είναι προϋπόθεση για την πρόσδεση, συγχωνεύσαμε διάφορα τμήματα του HNF-4 με την αλληλουχία του Gal4 ενεργοποιητή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του τελευταίου στο στόχο του. Στις διαμολύνσεις αυτές, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το G4CAT που στρατολογεί τις χιμαιρικές πρωτεΐνες. Στην εικόνα Δ8Β φαίνονται διαγραμματικά οι υβριδικές πρωτεΐνες HNF-4, η μεταγραφική τους ενεργότητα καθώς και το κατά πόσο μπορεί να ενισχυθεί παρουσία COUP-TFI και COUP-TFII. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία πρόσδεσης του Gal4 (Gal4 DBD) καθώς και το υβριδικό μόριο της Gal4 DBD με την αλληλουχία ενεργοποίησης VP16 για να ελέγξουμε πόσο ειδικό φαινόμενο είναι η ενίσχυση του HNF-4 από τους COUP-TFs.

Η χιμαιρική κατασκευή που περιλαμβάνει ολόκληρη την περιοχή E του HNF-4 είναι ισχυρός ενεργοποιητής της μεταγραφής και η δράση του ενισχύεται κατά 8.5 φορές ή 9 φορές παρουσία του COUP-TFI ή COUP-TFII αντίστοιχα. Όπως φαίνεται από τις τιμές της εικόνας απαραίτητη τόσο για την ενεργότητα του μορίου αυτού

καθαυτού όσο και για την απόκρισή του παρουσία των COUP-TFs είναι η περιοχή 227-368 της περιοχής E αν και η παρουσία ολόκληρης της E φαίνεται να δίνει σημαντικά υψηλότερες ενεργότητες. Μπορούμε δηλαδή να ισχυριστούμε ότι η αλληλουχία AF2 είναι αναγκαία αλλά όχι και ικανή από μόνη της –απομονωμένη από την περιοχή E- για να αποκριθεί στην παρουσία των COUP-TFs. Φαίνεται ότι η όποιου τύπου αλληλεπίδραση του HNF-4 με τους COUP-TFs απαιτεί πέραν της AF2 και την περιοχή 227-271 της περιοχής E μια και στην κατασκευή Gal4HNF-4 (Δ227-271) όπου αφαιρέσαμε επιλεκτικά αυτό το τμήμα της περιοχής E δεν παρατηρήθηκε καμιά αλλαγή στη μεταγραφική ενεργότητα παρουσία των COUP-TFs.

Η άμεση απόδειξη για το αν κάποιο τμήμα του μορίου HNF-4 αλληλεπιδρά με τους COUP-TFs προέκυψε από πειράματα αλληλεπίδρασης *in vitro* (**ΕΙΚΟΝΑ Δ9**). Οι διάφορα μεταλλάγματα της HNF-4 που παρουσιάζονται διαγραμματικά στην εικόνα κλωνοποιήθηκαν σε φορέα Bluescript KS και ακολούθησε *in vitro* μεταγραφή & μετάφραση παρουσία ³⁵S μεθειονίνης. Παράλληλα παράχθηκαν σε βακτήρια οι πρωτεΐνες TFIIB και COUP-TFI συνδεδεμένες με GST και οι υβριδικές αυτές ακινητοποιήθηκαν μέσω του GST σε glutathione Sepharose beads. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε και GST προσδεδεμένο σε κολώνα για να αποκλειστεί το ότι οι τυχόν αλληλεπιδράσεις οφείλονται σε αλληλουχία του GST κι όχι του HNF-4. Η διαδρομή του "input" της εικόνας αντιπροσωπεύει το 10 % της συνολικής πρωτεΐνης που συντέθηκε *in vitro* και χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση πρόσδεσης εκτός από την περίπτωση του HNF-4 (1-185) όπου αντιπροσωπεύει το 20 %. Παρατηρούμε ότι το GST τμήμα των πρωτεϊνών δεν αλληλεπιδρά με τον HNF-4. Αντίθετα, έχουμε σημαντική πρόσδεση στο GST-COUP-TFI των HNF-4 (1-354), HNF-4 (Δ271-354) από τα οποία απουσιάζουν διάφορα τμήματα του AF2, καθώς και με την κατασκευή HNF-4(227-455). Αντίθετα το GST-TFIIB φάνηκε να αλληλεπιδρά μόνο με το HNF-4 (1-185) που περιλαμβάνει το αμινοτελικό τμήμα του HNF-4. Η HNF-4 FL (ολόκληρο το HNF-4 μόριο), όπως ήταν αναμενόμενο αλληλεπιδρά και με τις δύο GST-συντηγμένες πρωτεΐνες.

Μπορούμε λοιπόν με ασφάλεια να ισχυριστούμε ότι το τμήμα του HNF-4 μορίου που είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με τους COUP-TFs παράγοντες εμπεριέχεται στα νουκλεοτίδια 227-271 της περιοχής E. Η περιοχή αλληλεπίδρασης του HNF-4 με τον TFIIB εντοπίζεται κάπου στο αμινοτελικό άκρο μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1-185. Το επόμενο βήμα ήταν να ανιχνεύσουμε με κάποιο τρόπο την αλληλεπίδραση HNF-4 – COUP-TFs σε κύτταρα συμπληρώνοντας τις *in vitro* παρατηρήσεις μας με *in vivo* δεδομένα. Κύτταρα Cos1, που όπως αναφέρθηκε

προηγουμένως δεν εκφράζουν κανένα από τους παραπάνω παράγοντες, διαμολύνθηκαν με φορέα έκφρασης για μια μεταλλαγμένη μορφή της HNF-4 (pMTHNF-4 (227-455)) η οποία στερείται το αμινοτελικό άκρο στο οποίο έχει δείχθει να υπάρχει το σήμα μετάβασής της στον πυρήνα. Όπως ήταν αναμενόμενο, με ανοσοφθορισμό *in situ* (**ΕΙΚΟΝΑ Δ10**), η HNF-4 (227-455) πρωτεΐνη είναι στο σύνολό της κυτταροπλασματική (Δ10Α). Συνδιαμόλυνση των κυττάρων με COUP-TFI ή COUP-TFII έχει σαν αποτέλεσμα το αντίσωμα HNF-4 να δίνει αυστηρά πυρηνικό σήμα (Δ10 Β, C) γεγονός που αποδεικνύει και την αλληλεπίδραση *in vivo* αυτών των ορμονικών υποδοχέων. Η αλληλεπίδραση αυτή με τον HNF-4 που οδηγεί στη μεταφορά του στον πυρήνα οφείλεται ειδικά στην παρουσία των COUP-TFI ή II μιας και συνδιαμόλυνση με κάποια άλλη πρωτεΐνη (pBxGal4-800), αφήνει τον HNF-4 στο κυτταρόπλασμα.

ΟΙ COUP-TFS ΕΝΙΣΧΥΟΥΝ ΤΗΝ HNF-4 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΣΕ HEPG2 ΚΑΙ CACO2 ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΣΕ C33 ΚΥΤΤΑΡΑ.

Η βιολογική σημασία των παραπάνω παρατηρήσεων μας έδωσε το έναυσμα να εξετάσουμε το κατά πόσο αυτές ισχύουν και σε άλλες κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τους HNF-4 και COUP-TFs ορμονικούς υποδοχείς. Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήσαμε ήταν το G4CAT (**ΕΙΚΟΝΑ 11**). Η ενεργότητα του Gal4HNF-4 παρουσία COUP-TFI και COUP-TFII αυξήθηκε κατά 3.7 και 3.9 φορές στα HepG2 ενώ 4.3 και 5.1 σε κύτταρα Caco2. Το φαινόμενο δηλαδή ισχύει και σε αυτές τις κυτταρικές σειρές, χωρίς όμως να είναι τόσο έντονο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις ήδη υψηλές συγκεντρώσεις των COUP-TFs σ' αυτά τα κύτταρα, με αποτέλεσμα η μεταγραφική ενεργότητα του Gal4HNF-4 να είναι ήδη αυξημένη λόγω της παρουσίας τους. Αντίθετα, η παρουσία των COUP-TFs δε φάνηκε να επηρεάζει καθόλου την ενεργότητα του Gal4HNF-4 στην κυτταρική σειρά C33. Οι COUP-TFs όχι μόνο δεν οδηγούν σε υπερενεργοποίηση λόγω αλληλεπίδρασης με HNF-4 στον υποκινητή G4CAT, αλλά έδρασαν ανταγωνιστικά μ' αυτόν σε γονίδια αναφοράς CIIIICAT όπως είχε ήδη παρατηρηθεί και σε πειράματα σε άλλες κυτταρικές σειρές. Ο μηχανισμός δηλαδή καταστολής της δράσης του HNF-4 φάνηκε να είναι πολύ πιο γενικό φαινόμενο, ενώ πιθανά αυτός της υπερενεργοποίησης είναι πιο σύνθετο και πολυπαραγοντικό φαινόμενο. Ίσως δηλαδή από τα κύτταρα C33 απουσιάζουν κάποιοι συμπαραγοντες ή ενδοκυτταρικοί προσδέτες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αντίθετα με τα AF2 των RxR, Ra, TR (28) το AF2 της HNF-4 (AF2h) δεν έχει καμία αυτονομία (autonomous activation function): όπως δείχτηκε από πειράματα όπου το Gal4-AF2 δεν έχει καμία ενεργότητα. Έχουμε δηλαδή να κάνουμε με ένα νέου τύπου AF2 που χρειάζεται την ταυτόχρονη παρουσία της περιοχής E. Είναι αξιοπερίεργη αυτή η παρατήρηση μιας και για άλλους ορμονικούς υποδοχείς η περιοχή E προσδίδει στο AF2 μια ειδική εξάρτηση από τον προσδέτη του. Στην περίπτωση όμως του HNF-4, όχι μόνο δεν έχει βρεθεί ο προσδέτης του μορίου, αλλά ούτε και φαίνεται να είναι απαραίτητος για τη μεταγραφική του ενεργότητα.

Δεν μπορούμε να αποδώσουμε στους COUP-TFs το χαρακτηρισμό του co-activator (συνενεργοποιητή) τουλάχιστον με τη στενή έννοια του όρου. Αυτό γιατί δεν αρκεί να στρατολογηθούν με κάποιο τρόπο στον υποκινητή για να δράσουν. Η αλληλεπίδρασή τους φαίνεται να είναι αυστηρά ειδική και να απαιτεί την παρουσία της αλληλουχίας AF2h. Έτσι, για παράδειγμα το μετάλλαγμα Gal4HNF-4 (E354) ενώ μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους COUP-TFs (σύμφωνα με τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων αλληλεπίδρασης) αλλά δε φαίνεται να αποκρίνεται στην παρουσία τους, δηλαδή να μεταβάλλεται η ενεργότητά.

Μπορούμε να αποκλείσουμε και το ενδεχόμενο η παρουσία των COUP-TFs να αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4 στο στόχο του. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε σε πειράματα πρόσδεσης σε DNA (EMSA). Επίσης η παρουσία των COUP-TFs ήταν ικανή να αυξήσει τη μεταγραφική ενεργότητα ακόμα και στη χιμαιρική HNF-4, Gal4-HNF-4(E), που έχει την περιοχή πρόσδεσης της Gal4 πρωτεΐνης σε DNA.

Εξετάσαμε και το ενδεχόμενο οι COUP-TFs να παίζουν το ρόλο της «γέφυρας» (bridging factor) μεταξύ της περιοχής E του HNF-4 και των γενικών ή άλλων ειδικών μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν στη μεταγραφική συγκεκριμένων γονιδίων. Ο ρόλος δηλαδή των COUP-TFs σε ένα τέτοιο μοντέλο θα μπορούσε να είναι η διευκόλυνση στο σχηματισμό ή στη σταθεροποίηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής. Ένας υποψήφιος για τέτοιου είδους αλληλεπίδραση θα μπορούσε να είναι ο TFIIB που έχει δείξει να αλληλεπιδρά τόσο με τον HNF-4 –μέσω της αμινοτελικής περιοχής- όσο και με τους COUP-TFs. Το ότι στα πειράματα αλληλεπίδρασης *in vitro* δε φάνηκε να αυξάνεται η αλληλεπίδραση του HNF-4 με τον TFIIB δε μπορεί να αποκλείσει το να συμβαίνει κάτι τέτοιο *in vivo*. Τα

πράγματα περιπλέκονται περισσότερο με την παρατήρηση ότι οι μεταλλαγές Gal4HNF-4 (E) και Gal4HNF-4 (227-455) αποκρίνονται στην παρουσία των COUP-TFs παρόλο που τους λείπει το τμήμα που είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με τον TFIIB.

Εξετάσαμε στη συνέχεια την πιθανότητα κάποιος από τους δύο ορμονικούς υποδοχείς που συμμετέχουν στο μοντέλο μας να υφίσταται μεταβολές της τριτοταγούς του δομής κάνοντάς τον πιο δραστικό μέτοχο στη μεταγραφική μηχανή. Η περίπτωση να υφίστανται τέτοιες μεταβολές οι COUP-TFs παρουσία του HNF-4 έχοντας έτσι καλύτερη επαφή με τον TFIIB και τους άλλους συντελεστές του συμπλόκου μεταγραφής, φάνηκε μάλλον απίθανη μιας και το φαινόμενο ενίσχυσης είναι απόλυτα εξαρτώμενο από την παρουσία του AF2. Επίσης τέτοιου είδους αλληλεπίδραση των COUP-TFs με το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής έχει περιγραφεί να έχει σαν αποτέλεσμα το πάγωμα του συμπλόκου σε ανενεργή μορφή. Αυτό εξάλλου είναι και το μοντέλο δράσης των COUP-TFs ως καταστολείς της μεταγραφής στα μέχρι τώρα περιγραφέντα γονίδια-στόχους τους.

Η δεύτερη πιθανότητα είναι να αλλάζει η διαμόρφωση του HNF-4 λόγω της αλληλεπίδρασής του με τους COUP-TFs. Η τελική του διαμόρφωση μπορεί να είναι τέτοια που ο προσανατολισμός της AF2h να γίνεται ο καλύτερος δυνατός για να μεταβιβάζει την ενεργότητα σε άλλους συντελεστές της μεταγραφικής μηχανής όπως TIF2 και γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες που έπονται του TFIIB (μιας και οι COUP-TFs και ο τελευταίος αλληλεπιδρούν με τον HNF-4 μέσω τελείως διαφορετικής περιοχής).

Ένα τέτοιο μοντέλο θα ήταν σύμφωνο με όλα τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάζονται σ' αυτή αλλά και σε προηγούμενες εργασίες με εξαίρεση την παρατήρηση ότι ο μηχανισμός ενίσχυσης δεν είναι γενικός για όλες τις κυτταρικές σειρές. Στην περίπτωση των κυττάρων C33, η παρουσία των COUP-TFs δεν μπόρεσε να αυξήσει τη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4 σε υποκινητές όπου οι COUP-TFs δεν προσδένονται. Αντίθετα, σε υποκινητές όπου οι εν λόγω παράγοντες μοιράζονται την ίδια θέση πρόσδεσης, οι COUP-TFs έδειξαν τη γνωστή κατασταλτική δράση τους. Θα μπορούσαμε να ερμηνεύσουμε τα παραπάνω αν προσθέσουμε στο σκηνικό κάποιους συμπαράγοντες των COUP-TFs απαραίτητους για να προσδώσουν την αλλαγή της στερεοδιάταξης του HNF-4. Υποθέτουμε ότι οι παράγοντες αυτοί υπάρχουν στα Cos1, HepG2, Caco2 αλλά όχι και στα κύτταρα C33. Εναλλακτικά, αυτή η ιδιαιτερότητα μπορεί να εξηγηθεί από μια πιθανή απαίτηση για προσδέτη ή

κάποιες ειδικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των COUP-TFs που δεν μπορούν να συμβούν σε όλες τις κυτταρικές σειρές.

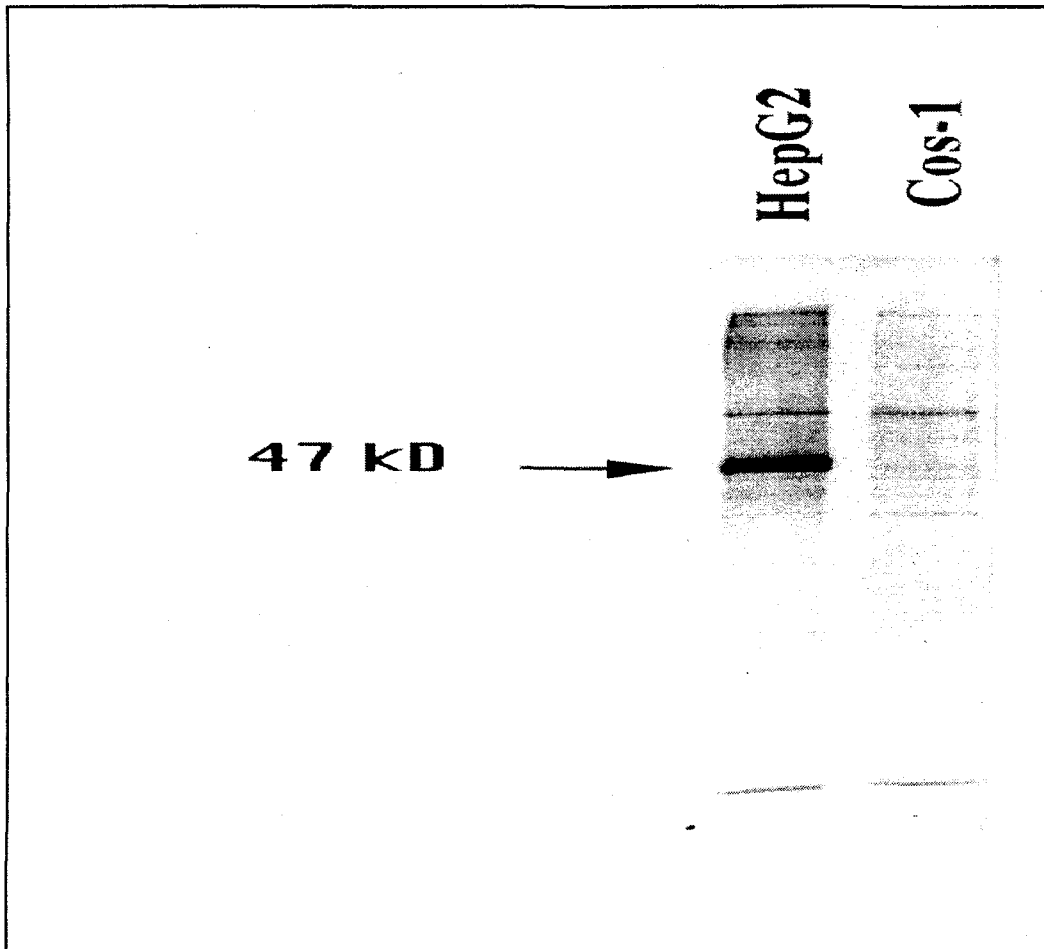
Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας δίνουν μια νέα διάσταση στη βιολογική σημασία των COUP-TFs. Μέχρι τώρα ήταν γνωστό ότι ασκούν αρνητική δράση στην έκφραση των γονιδίων-στόχων τους με την ανεξέλεγκτη πρόσδεσή τους σε στοιχεία DR1 και DR5, με συγγένεια ανάλογη με αυτή του ομοδιμερούς του HNF-4, αποκλείοντας εν μέρη τον τελευταίο από τις θέσεις πρόσδεσής του, επιδεικνύοντας όμως ταυτόχρονα σημαντικά μικρότερη μεταγραφική ενεργότητα από αυτόν. Τα πειράματα που αναλύσαμε παραπάνω ρίχνουν φως σε ένα τελείως διαφορετικό πρόσωπο των COUP-TFs. Σε υποκινητές όπου δεν προσδένονται, ενισχύουν εντυπωσιακά τη δράση του HNF-4.

Αναλογιζόμενοι τη στρατηγική θέση που κατέχει ο HNF-4 στη μεταγραφική ιεραρχία που καθορίζει τον ηπατικό φαινότυπο, συνειδητοποιούμε τη βαρύτητα που έχει ο ρόλος των COUP-TFs.

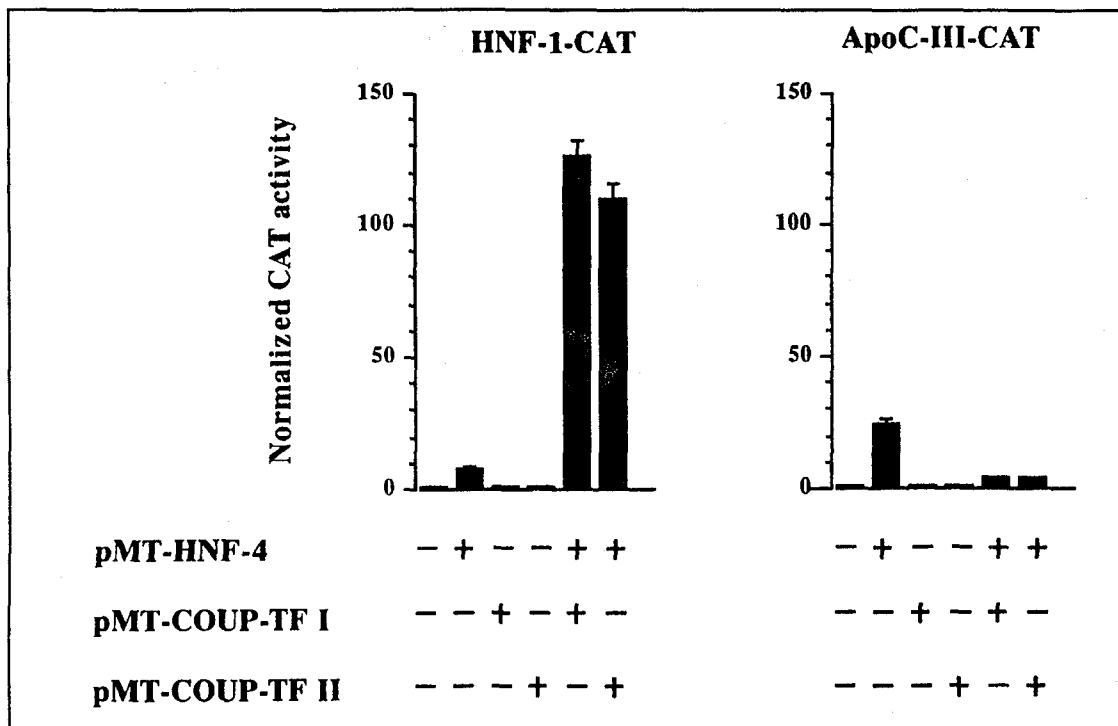
Ο HNF-4 ρυθμίζει την έκφραση μια πλειάδας γονιδίων ενώ παράλληλα είναι ο κύριος μεταγραφικός ρυθμιστής του HNF-1 ο οποίος με τη σειρά του ανοίγει την έκφραση πολλών και ετερόκλητων στόχων. Είναι λοιπόν σημαντικός οποιοσδήποτε παράγοντας ή γεγονός που συντελεί στην αρχική ενεργοποίηση αυτής της αλυσιδωτής ενεργοποίησης γονιδίων όπως το μονοπάτι σηματοδότησης της activin A που φάνηκε να επάγει την ενεργότητα της HNF-4 στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια στο *Xenopus* –πιθανά ελέγχοντας τη φωσφορυλίωσή του (50). Το σημείο στο οποίο υπεισέρχεται η δράση των COUP-TFs είναι πολύ καθοριστικό αφού έχει να κάνει με τη μεταγραφική ρύθμιση του δεύτερου σημαντικότερου παράγοντα για τον καθορισμό του ηπατικού φαινοτύπου.

Οι COUP-TFs και ο HNF-1 εμφανίζονται παράλληλα κατά τα πρώτα στάδια της ενδοδερμικής διαφοροποίησης. Σε έμβρυο ποντικού, οι HNF-1 και COUP-TFs ανιχνεύονται σε χαμηλά επίπεδα στις 8.5 μέρες φτάνοντας στο μέγιστο στις 14-15 μέρες μετά τη σύλληψη (21), πολύ αργότερα δηλαδή από την εμφάνιση του HNF-4 (4.5-5.5 μέρες μετά τη σύλληψη). Πρόσφατα δείχθηκε από άλλες ομάδες ότι οι COUP-TFs ενέχονται και στη θετική ρύθμιση του vHNF-1 που παίζει σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια διαφοροποίησης πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων ενδοδερμικής και μεσοδερμικής προέλευσης όπως αυτά του ήπατος και των νεφρών. Ο τρόπος δράσης τους στον υποκινητή του vHNF-1 είναι έμμεσος, μέσω αλληλεπίδρασης με παράγοντες Oct-1 (115). Εκτός από την ανάμιξή τους στη διαφοροποίηση ιστών μεσοδερμικής προέλευσης, έχει αναφερθεί και η συμμετοχή τους στη διαφοροποίηση

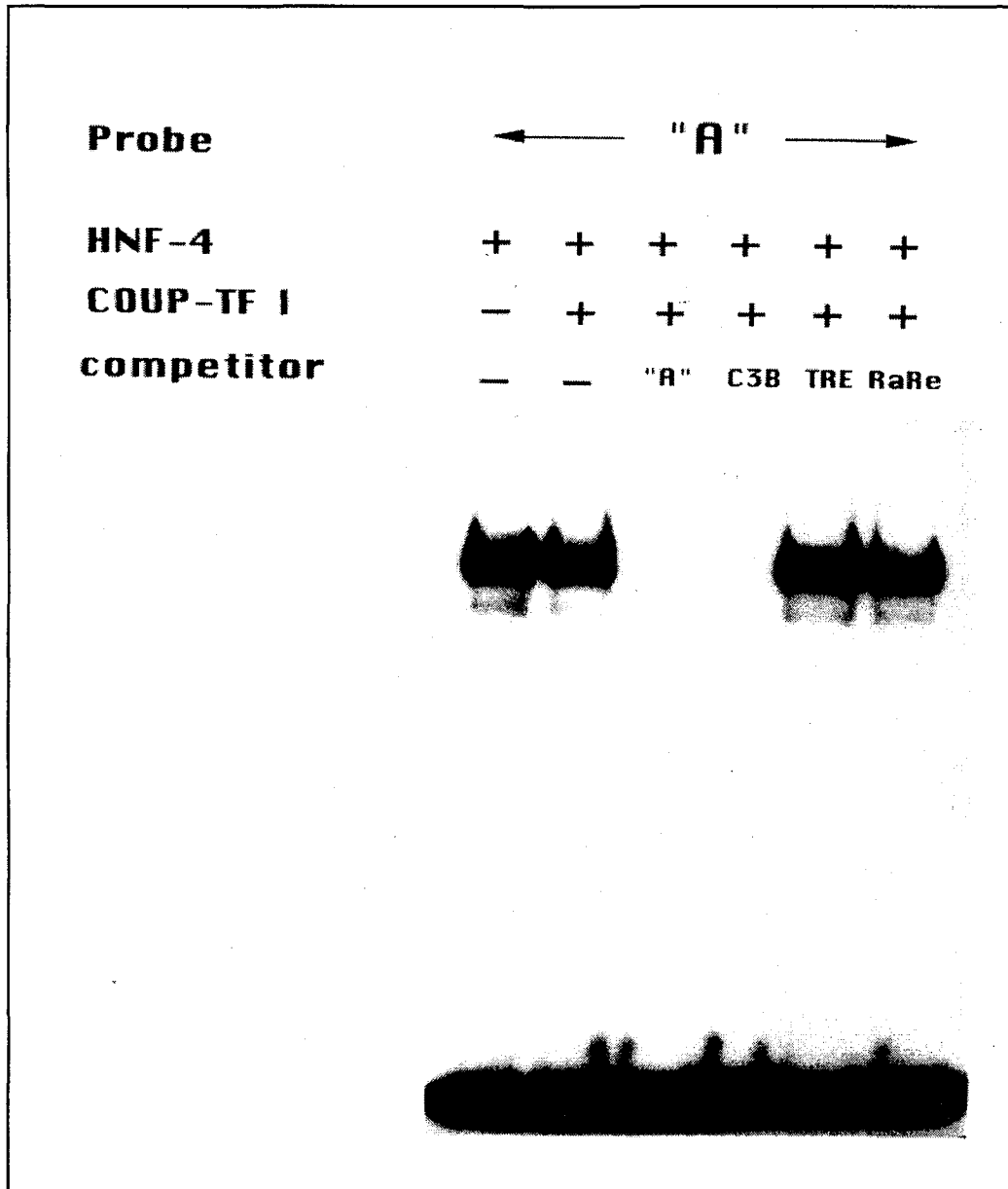
του νευρικού συστήματος και συγκεκριμένα στο μοτίβο κατάτμησης του διεγκέφαλου.



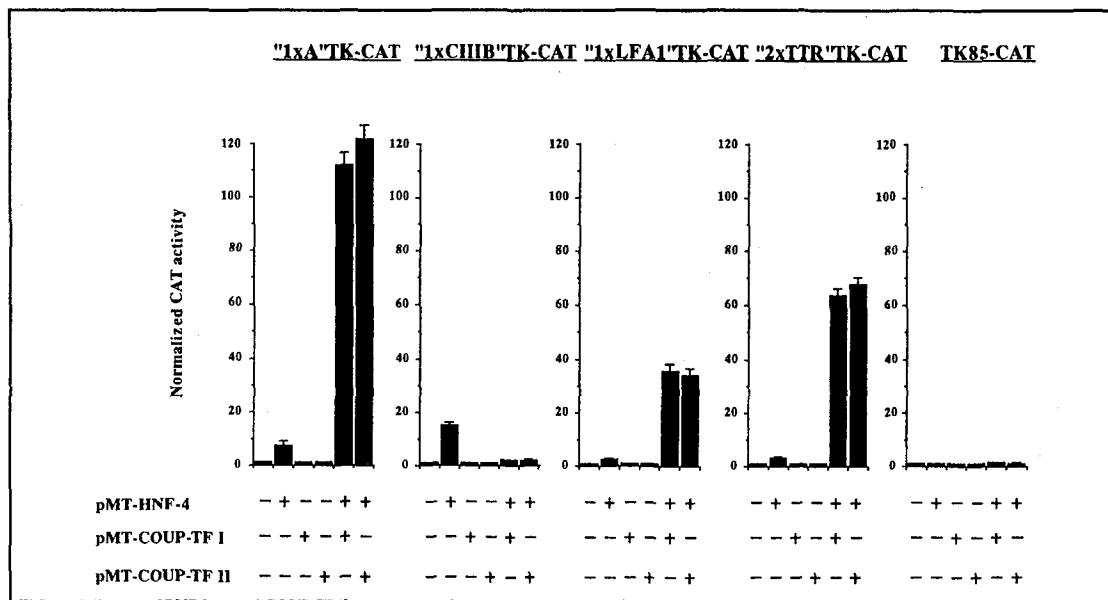
ΕΙΚΟΝΑ Δ1: Οι παράγοντες COUP-TF δεν εκφράζονται στα κύτταρα Cos1. Μετά από επώαση κυττάρων HepG2 και Cos1 με ^{35}S μεθειονίνη, από τα κυτταρικά εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίστηκε με το κατάλληλο αντίσωμα η πρωτεΐνη COUP-TF. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 10 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η ζώνη των 47 kDa που αντιστοιχεί στον παράγοντα COUP-TF, υπάρχει μόνο στα κύτταρα HepG2.



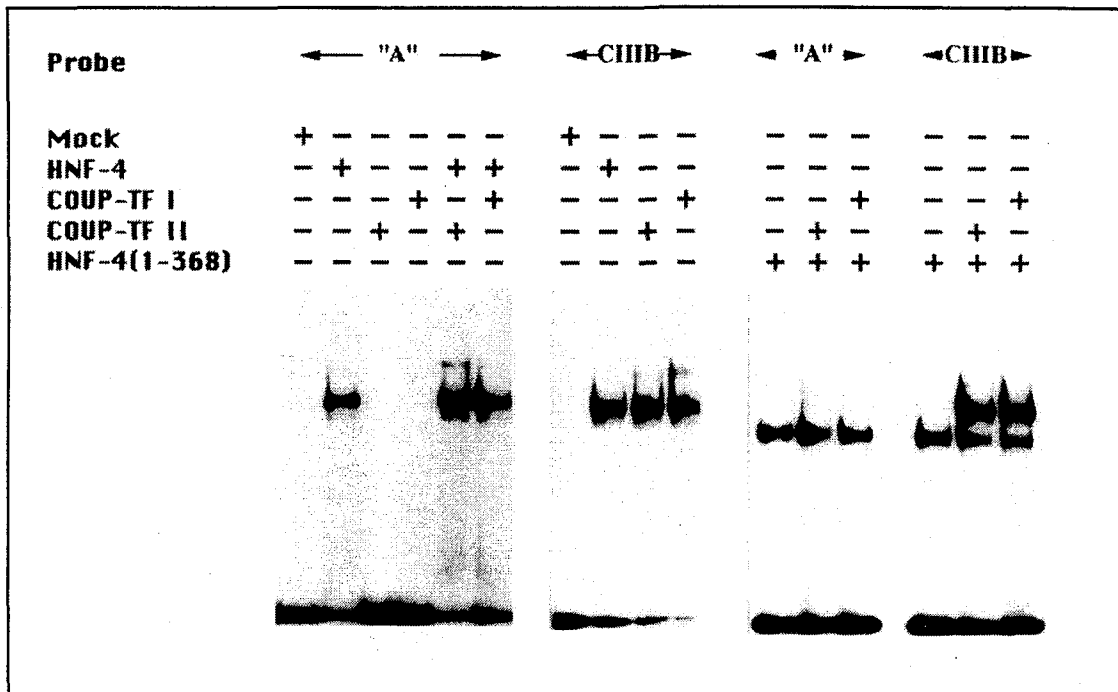
ΕΙΚΟΝΑ Δ2: Ενίσχυση της HNF-4 εξαρτώμενης μεταγραφής του γονιδίου HNF-1 από τους παράγοντες COUP-TFI και COUP-TFII. Κύτταρα Cos-1 διαμολύνθηκαν με 2 μg DNA από τα γονίδια αναφοράς HNF-1-CAT και apoCIII-CAT και 0.5 μg DNA από τους φορείς έκφρασης pMT-COUP-TFI ή pMT-COUP-TFII. Οι στήλες του ιστογράμματος αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές (με τυπική απόκλιση κάτω του 10 %) των κανονικοποιημένων –βάση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης- ενεργότητες του ενζύμου CAT (normalized CAT activity), από έξι ανεξάρτητα πειράματα.



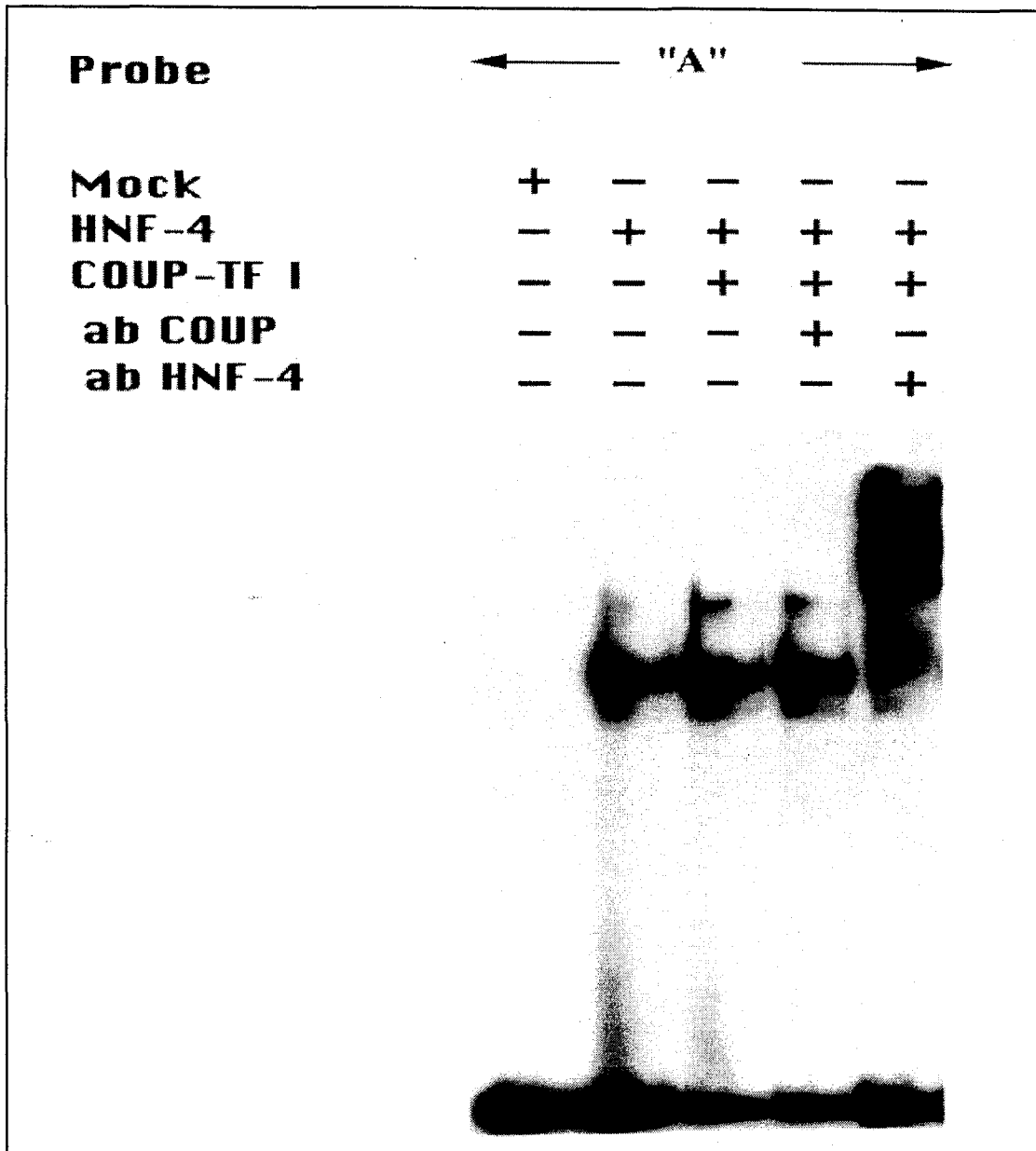
ΕΙΚΟΝΑ Δ3: Ηλεκτροφόρηση υστέρησης κινητικότητας όπου η θέση "A" του υποκινητή HNF-1 χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής (probe) και αφέθηκε να αλληλεπιδράσει με ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα Cos1 που είχαν διαμολυνθεί με τους φορείς έκφρασης pMT-HNF-4 ή pMT-COUP-TFI. Όπου αναγράφεται, οι αντιδράσεις πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν παρουσία 50x μοριακής περίσσειας μη ραδιενεργών δίκλωνων ανταγωνιστικών ολιγονουκλεοτιδίων (competitor) ("A", "CIIB", "TRE", "RARE"). Παρατηρούμε ότι η θέση "A" αναγνωρίζεται μόνο από τον HNF-4, η "CIIB" αναγνωρίζεται τόσο από τον HNF-4 όσο και από τους COUP-TFs, ενώ οι "TRE" και "RARE" στρατολογούν επιλεκτικά μόνο τους COUP-TFs.



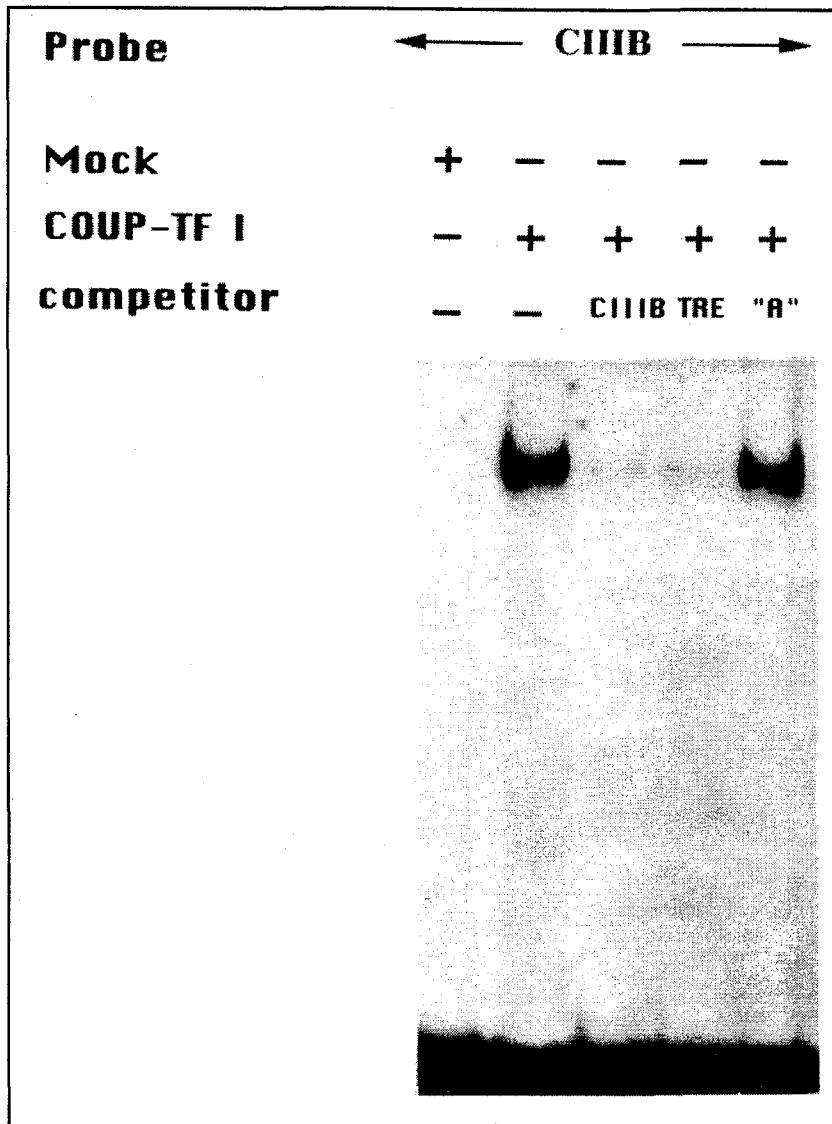
ΕΙΚΟΝΑ Δ4: Η επίδραση της παρουσίας των COUP-TFI και COUP-TFII στην HNF-4 εξαρτώμενη μεταγραφή χιμαιρικών κατασκευών υποκινητών. Κύτταρα Cos1 διαμολύνθηκαν με 2 µg DNA των αναγραφόμενων χιμαιρικών υποκινητών ("1xΑ"TK-CAT, "1xCIIIB"TK-CAT, "1xLFA1"TK-CAT, "2xTTR"TK-CAT) μαζί με 0.5 µg DNA από τους φορείς έκφρασης pMT-COUP-TFI ή pMT-COUP-TFII. Οι στήλες του ιστογράμματος αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές (με τυπική απόκλιση κάτω του 10 %) των κανονικοποιημένων -βάση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης- ενεργότητες του ενζύμου CAT (normalized CAT activity), από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα.



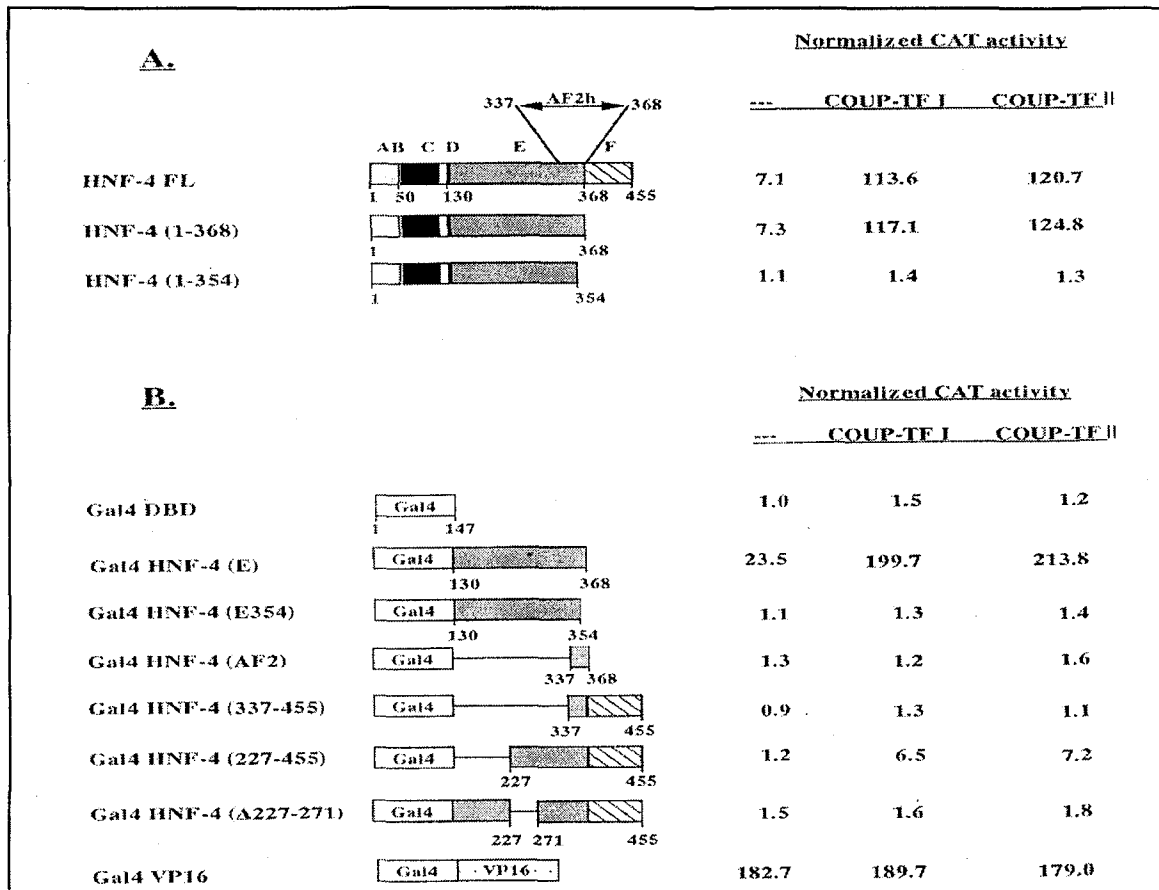
ΕΙΚΟΝΑ Δ5: Οι COUP-TFI και COUP-TFII δεν αναγνωρίζουν ως θέση πρόσδεσης το στοιχείο DR1 του υποκινητή HNF-1 ούτε ως διμερή ούτε ως ετεροδιμερή με τον HNF-4. Τα πειράματα EMSA έγιναν με κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα Cos1 που διαμολύνθηκαν με τους αναγραφόμενους φορείς έκφρασης (για HNF-4, COUP-TFI, COUP-TFII και HNF-4 1-368) και με ανιχνευτή (probe) τη ραδιοσημασμένη θέση "A" από τον υποκινητή HNF-1 και "CIIB" από τον υποκινητή apoCIII. Σε κάθε αντίδραση πρόσδεσης συμπεριλάβαμε 5 µg συνολικής πρωτεΐνης. Η ανάμιξη διαφόρων κυτταρικών εκχυλισμάτων σε κάθε αντίδραση οδήγησε στα ίδια αποτελέσματα.



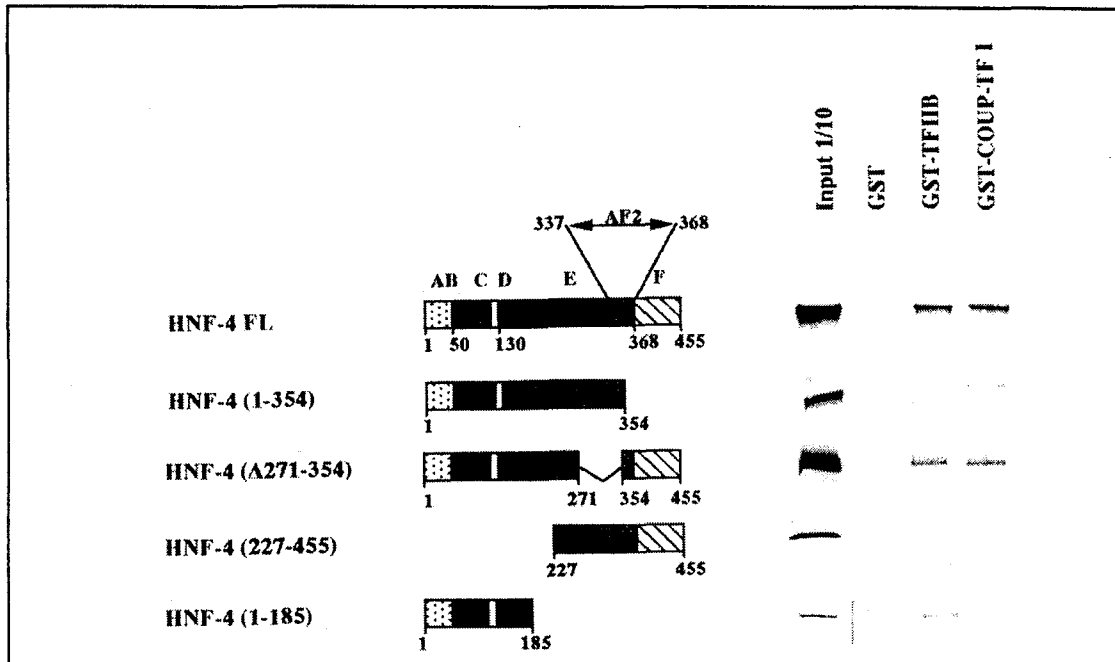
ΕΙΚΟΝΑ Δ6: Ηλεκτροφόρηση υστέρησης κινητικότητας όπου ο ανιχνευτής (probe) είναι η θέση πρόσδεσης του HNF-4, "A", από τον υποκινητή HNF-1 που αφέθηκε να αλληλεπιδράσει με ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα Cos1 που είχαν διαμολυνθεί με τους φορείς που αναγράφονται: pMT (mock), pMT-HNF-4 (HNF-4), pMT-COUP-TFI (COUP-TFI). Οι αντιδράσεις έγιναν παρουσία ή απουσία 1 μl (αραιωμένου στα 1:6) αντισώματος για COUP-TF (διαδρομή 5), ή αντισώματος για HNF-4 (διαδρομή 6). Μείωση της κινητικότητας του συμπλόκου σημειώθηκε μόνο μετά από επίδραση με αντίσωμα για HNF-4.



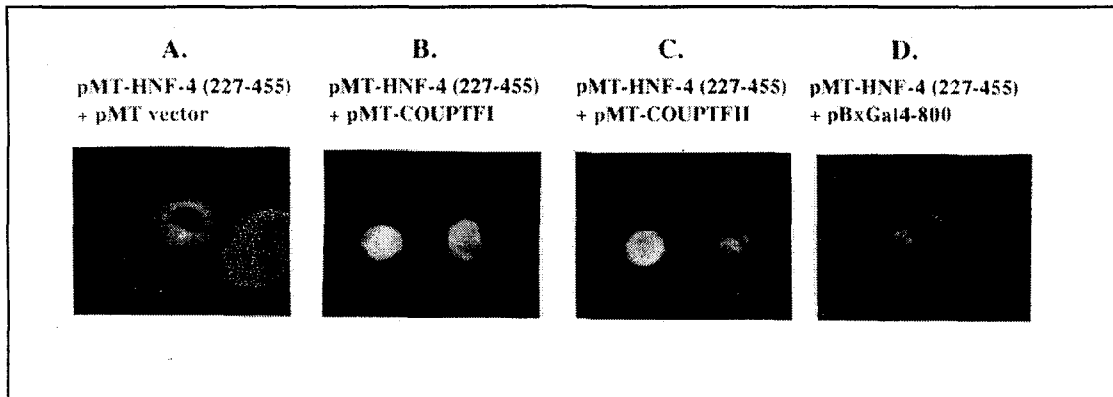
ΕΙΚΟΝΑ Δ7: Ηλεκτροφόρηση υστέρησης κινητικότητας με ανιχνευτή τη θέση CIIIB του υποκινητή αρoCIII που συνεπώαστηκε με ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα Cos1 που είχαν διαμολυνθεί με τους φορείς έκφρασης pMT (mock), pMT-COUP-TFI (COUP-TFI). Οι αντιδράσεις πρόσδεσης έγιναν παρουσία ή απουσία 50x μοριακής περίσσειας μη σημασμένων δίκλωνων ανταγωνιστών (competitor) ("CIIIB", "A", "TRE"). Όπως παρατηρούμε στην εικόνα, η αλληλουχία "TRE" αλλά όχι και η "A" ανταγωνίζονται τον COUP-TFI για πρόσδεση στη θέση "CIIIB".



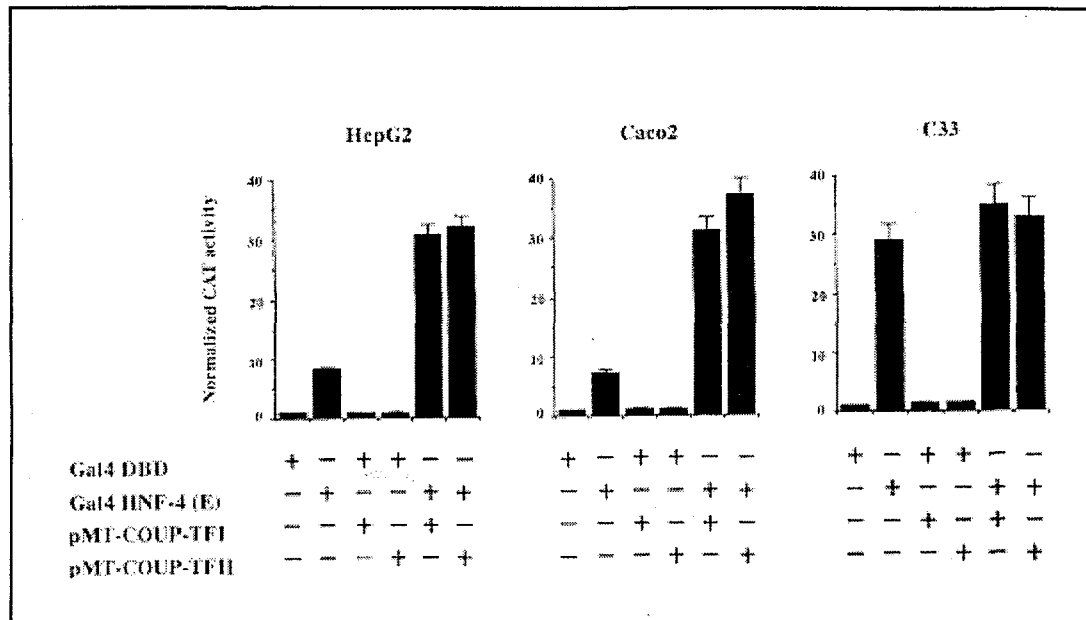
ΕΙΚΟΝΑ Δ8: Η COUP-TF-επαγόμενη ενίσχυση της μεταγραφής απαιτεί ακέραια την περιοχή E του μορίου HNF-4. Στο τμήμα A της εικόνας: κύτταρα Cos1 διαμολύνθηκαν με 2 μg DNA από τον γονίδιο αναφοράς "1xA"TK-CAT και 0.5 μg DNA του φορέα έκφρασης pMT που εκφράζει διάφορα μεταλλάγματα του HNF-4, παρουσία ή απουσία φορέα έκφρασης για τους COUP-TFI ή COUP-TFII. Με διαφορετική γραμμοσκίαση φαίνονται οι περιοχές του μορίου HNF-4: το αμινοτελικό AB τμήμα, η περιοχή πρόσδεσης στο DNA με τη χαρακτηριστική δομή δακτύλων ψευδαργύρου (C), τον αρμό (D), την περιοχή διμερισμού και πρόσδεσης του προσδέτη (E) και το καρβοξυτελικό άκρο (F). Στο τμήμα B της εικόνας: Cos-1 κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με 2 μg DNA του γονιδίου αναφοράς G4-CAT και με 0.5 μg DNA των αναγραφόμενων Gal4-συνδεδεμένων τμημάτων της HNF-4, παρουσία ή απουσία των φορέων έκφρασης pMT2-COUP-TFI και pMT2-COUP-TFII. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των κανονικοποιημένων ενεργοτήτων CAT (με τυπική απόκλιση μικρότερη του 10 %) σε πέντε ανεξάρτητα πειράματα (*normalized CAT activity*). Η τιμή 1.0 αντιστοιχεί στην ενεργότητα CAT που παίρνουμε μετά από συνδιαμόλυνση με τον άδειο φορέα pMT. Η σύντηξη DBD αναφέρεται στην περιοχή του μορίου που προσδένεται στο DNA.



ΕΙΚΟΝΑ Δ9: Αλληλεπίδραση του wtHNF-4 και διαφόρων ελλείψεων με τον COUP-TFI και TFIIIB *in vitro*. Ο HNF-4 και τα μεταλλάγματα του [HNF-4(1-354), HNF-4(Δ271-354), HNF-4(227-455) και HNF-4(1-185)] μεταγράφηκαν και μεταφράστηκαν *in vitro* παρουσία ^{35}S μεθειονίνης. Οι πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με GST παράχθηκαν στο βακτηριακό στέλεχος JM109 και πριν τις αντιδράσεις αλληλεπίδρασης προσδέθηκαν σε glutathione-Sepharose beads. Οι διαδρομές "input" αντιπροσωπεύουν το 10% της συνολικής πρωτεΐνης που παράχθηκε στην αντίδραση μετάφρασης *in vitro*, με εξαίρεση το "input" στην περίπτωση του HNF-4(1-185), όπου αντιπροσωπεύει το 20 % της πρωτεΐνης.

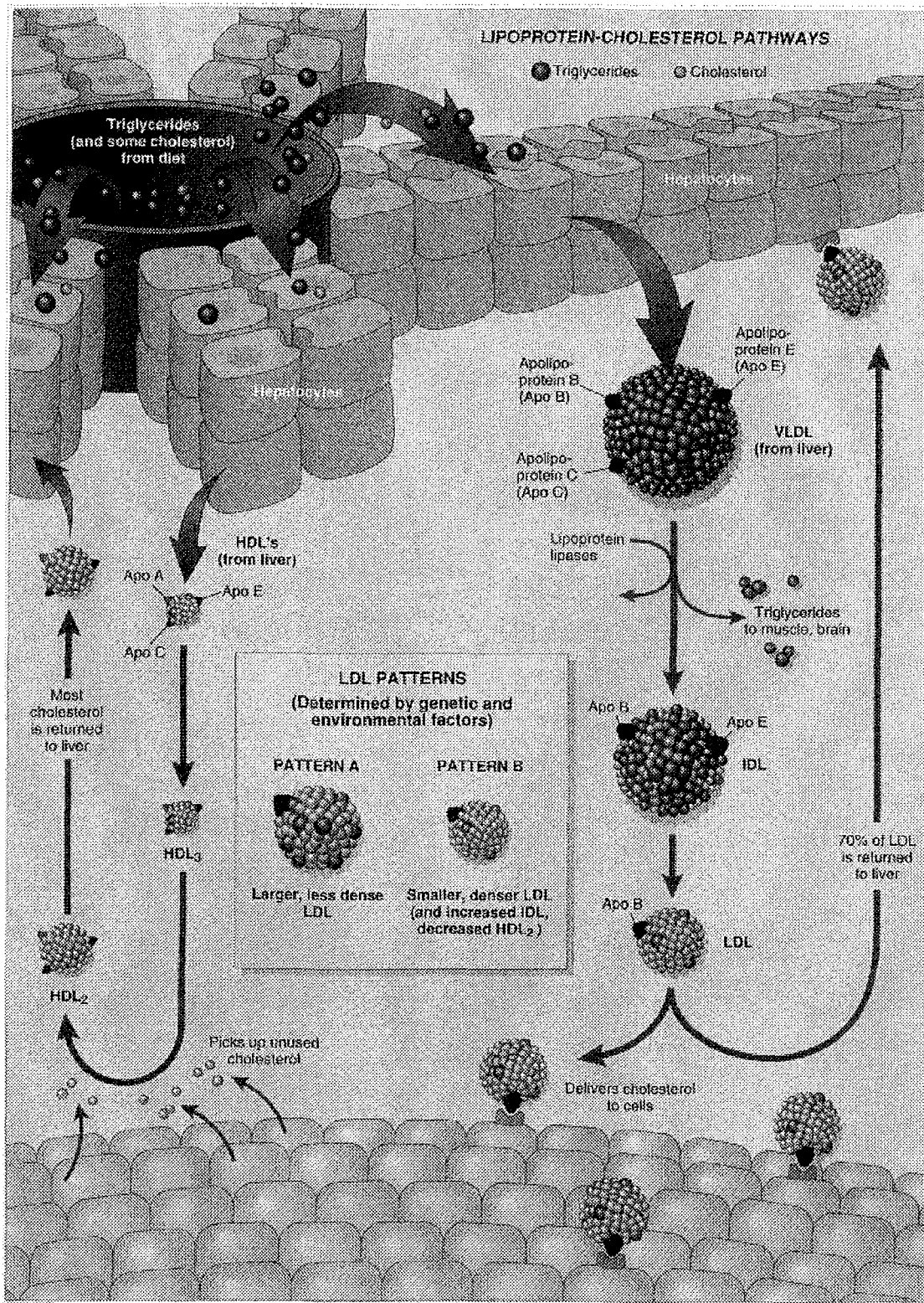


ΕΙΚΟΝΑ Δ10: Απόδειξη της αλληλεπίδρασης του HNF-4 με τους COUP-TFI και COUP-TFII σε κύτταρα (*ex vivo*). Κύτταρα Cos1 διαμολύνθηκαν με 500 ng DNA του φορέα που εκφράζει το μετάλλαγμα HNF-4(271-455) που στερείται την περιοχή στην οποία εντοπίζεται το σήμα μετάβασης στον πυρήνα (A). Παράλληλα τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με 1 μg DNA από το φορέα έκφρασης για τον COUP-TFI (B) ή τον COUP-TFII (C). 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες και βάφτηκαν με πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα επίτοπο 11 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου της HNF-4. Η παρουσία των COUP-TFI & COUP-TFII μέσα στα κύτταρα ήταν ικανή να οδηγήσει στον πυρήνα την -από μόνη της- κυτταροπλασματική μεταλλαγή της HNF-4. Η υπερέκφραση κάποιου άσχετου παράγοντα όπως Gal4-800 δεν έχει καμία επίδραση στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση του HNF-4. Τα κύτταρα φαίνονται σε μεγέθυνση x316.



ΕΙΚΟΝΑ Δ11: Η παρουσία των COUP-TFI και COUP-TFII είναι ικανή να ενισχύσει τη μεταγραφική δράση του HNF-4 στα κύτταρα HepG2 και στα CaCo2 αλλά όχι και στα C33. Τα κύτταρα από τις διάφορες σειρές διαμολύνθηκαν με 2 µg DNA του γονιδίου αναφοράς G4-CAT παρουσία 0.5 µg DNA από τους φορείς έκφρασης pMT-COUP-TFI ή pMT-COUP-TFII. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο της κανονικοποιημένης ενεργότητας CAT (normalized CAT activity) από τουλάχιστον τρία πειράματα. Λόγω της διαφορετικής συμπεριφοράς των κυτταρικών σειρών στη διαδικασία διαμόλυνσης, οι απόλυτες τιμές που παίρνουμε μπορούν να συγκριθούν μόνο με τις διαμολύνσεις που αφορούν στην ίδια σειρά.

**ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ
ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ**



**ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ
ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ**

Απόκριση του ηπατοκυττάρου σε εξωτερικά ερεθίσματα

ΝΕΥΡΟΛΑΒΡΑΖΕΣ
ΑΝΕΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
ΟΡΜΟΝΕΣ

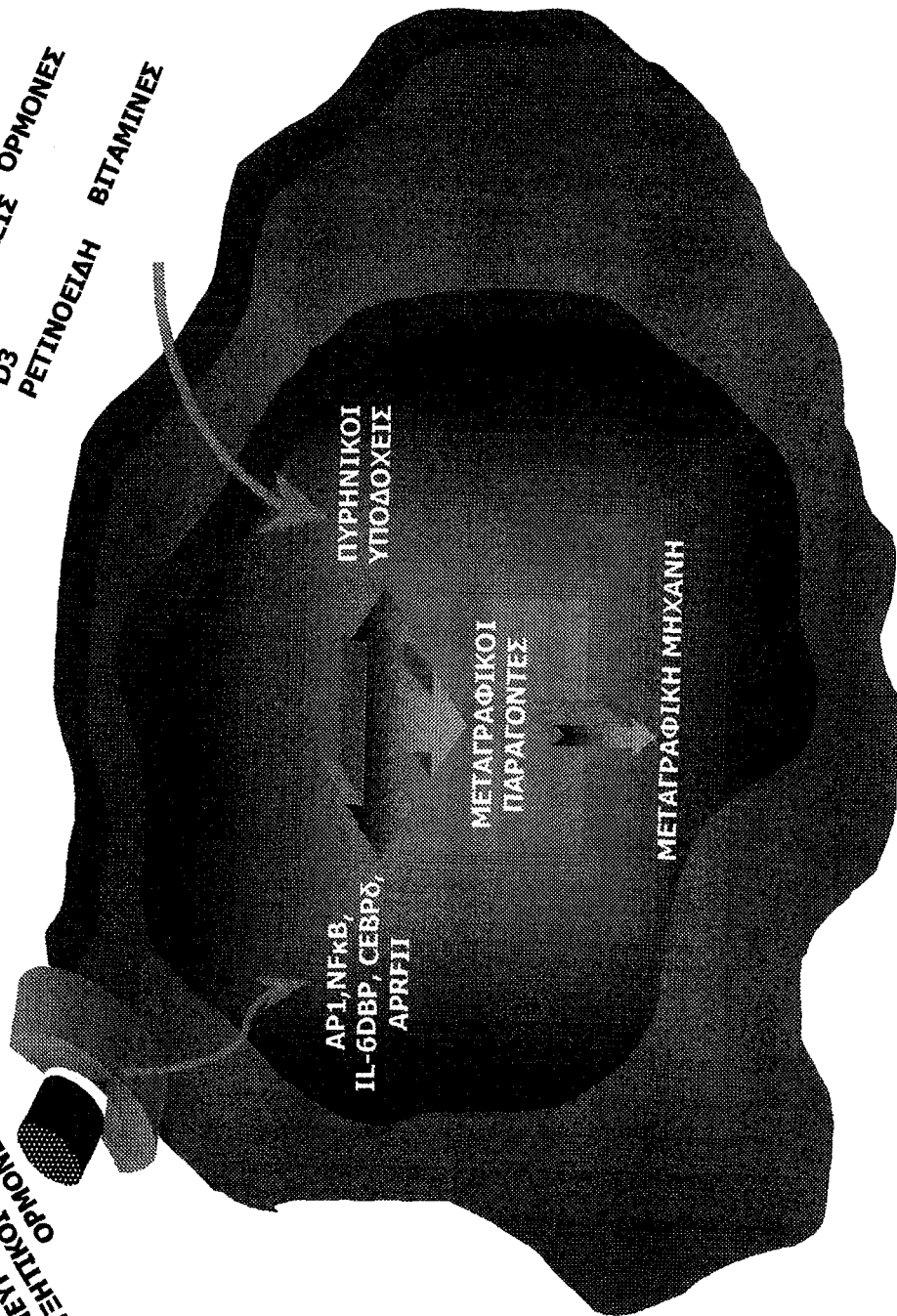
ΘΥΡΟΕΙΔΕΙΣ
ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ
D3
ΡΕΤΙΝΟΙΔΗ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

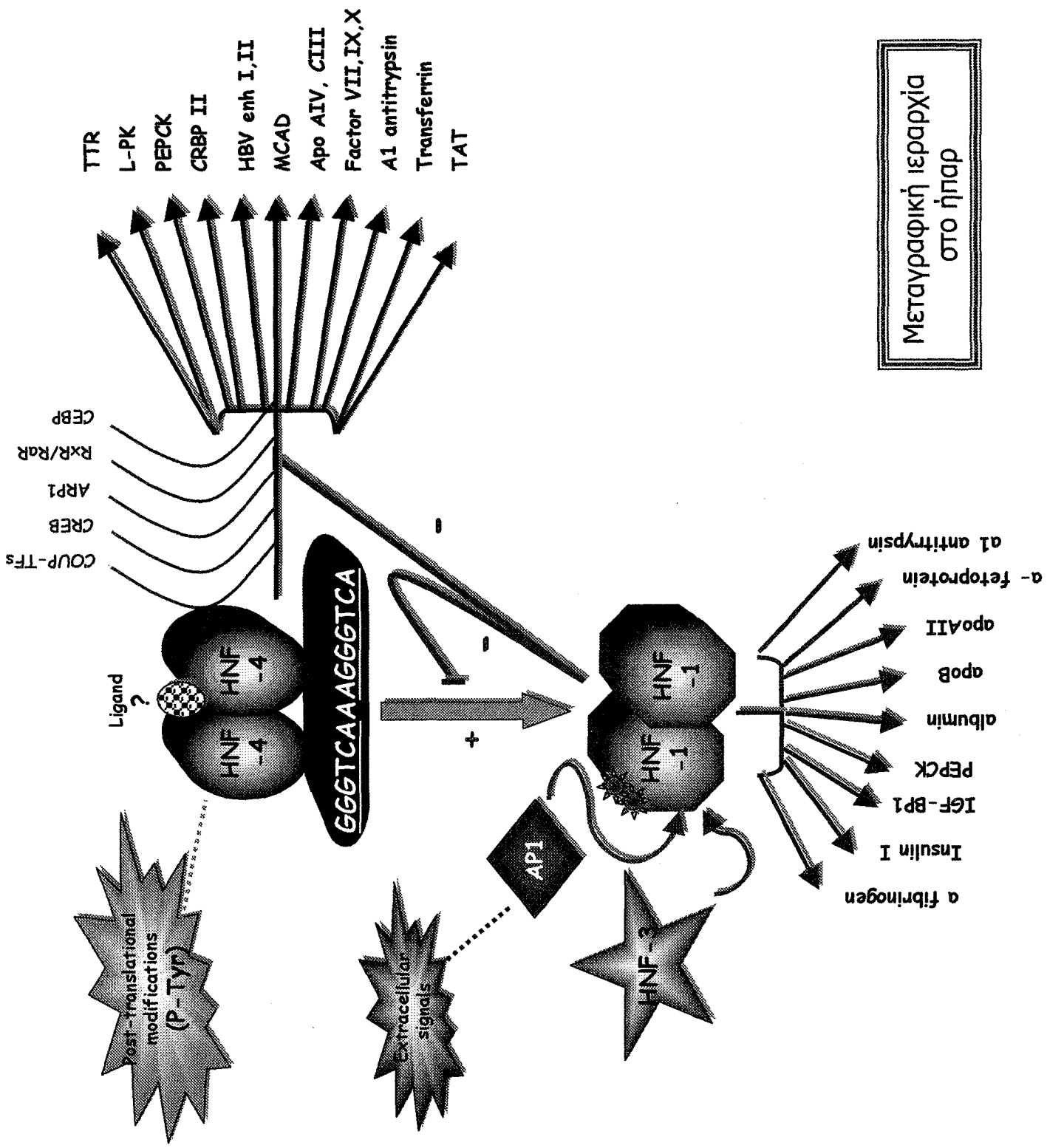
AP1, NFκB,
IL-6DBP, CEBPδ,
APRF1

ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ
ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

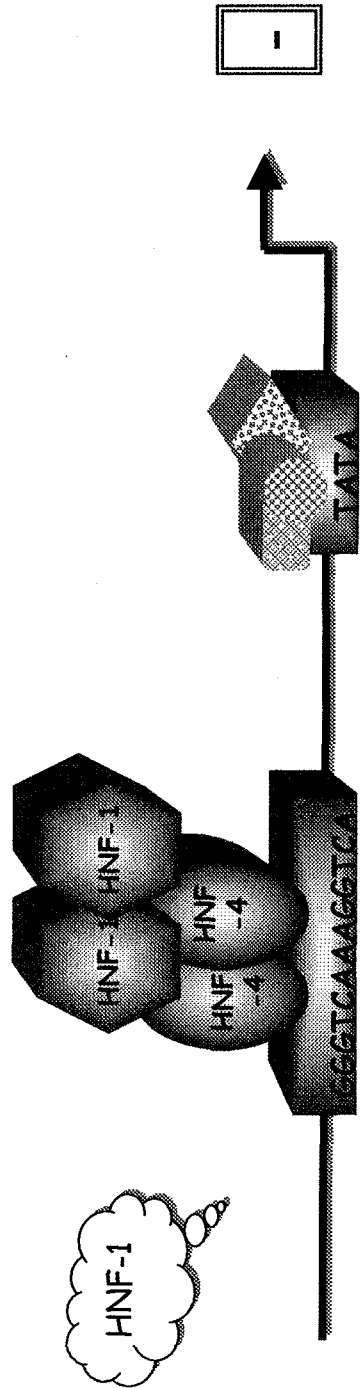
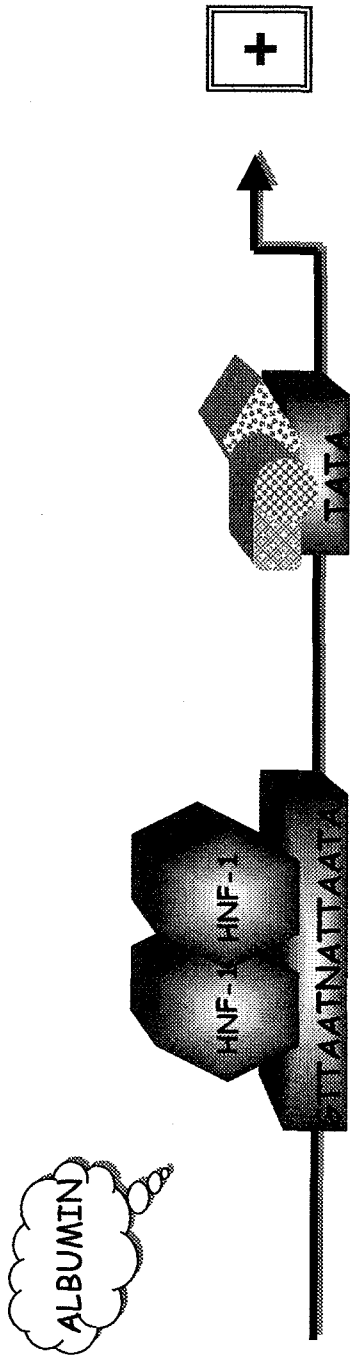
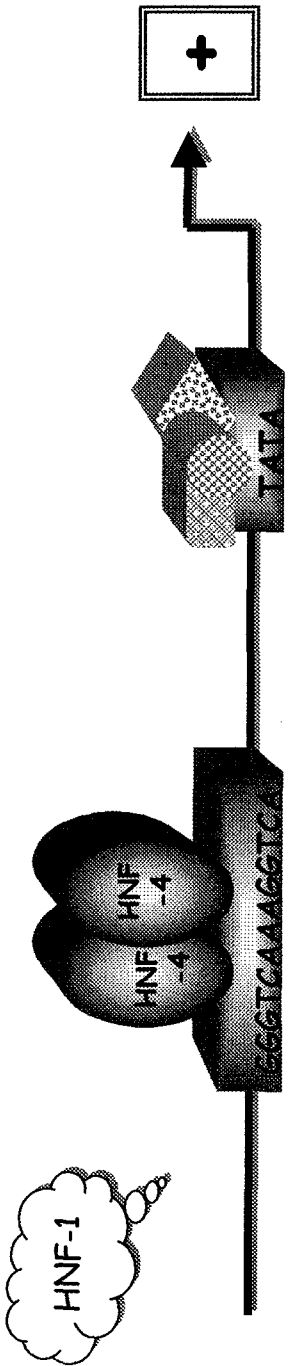
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΜΗΧΑΝΗ



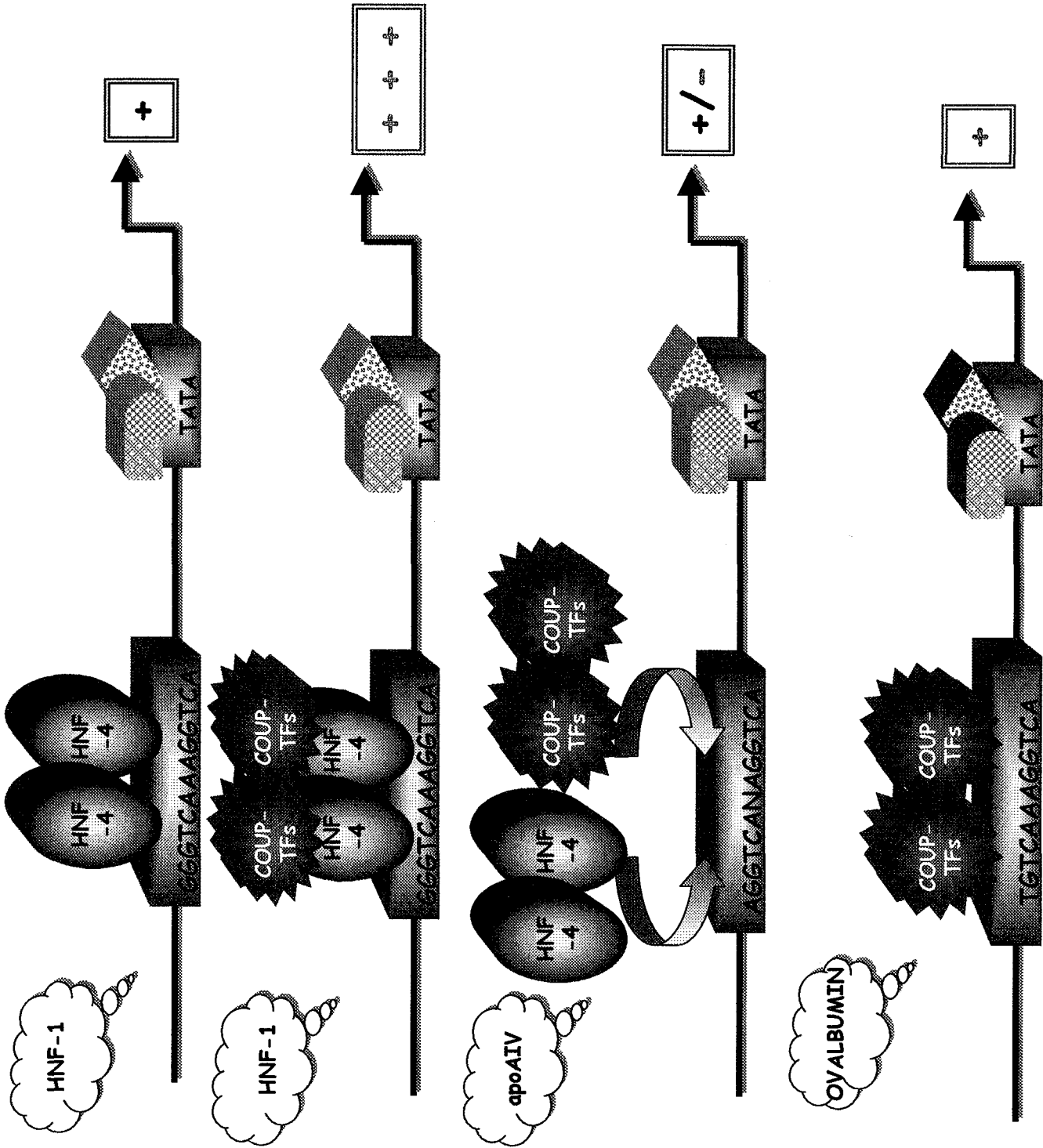


Μεταγραφική ιεραρχία
στο ήπαρ

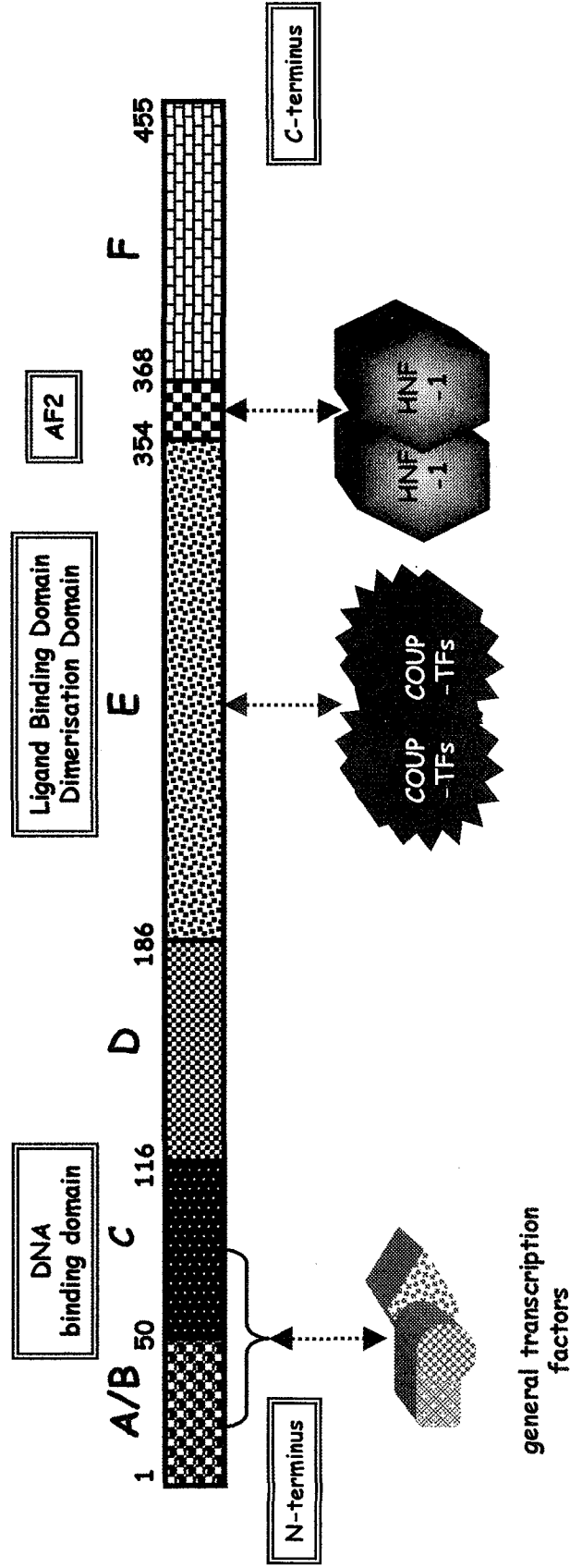
Αλληλεπίδραση του HNF-4 με τον HNF-1



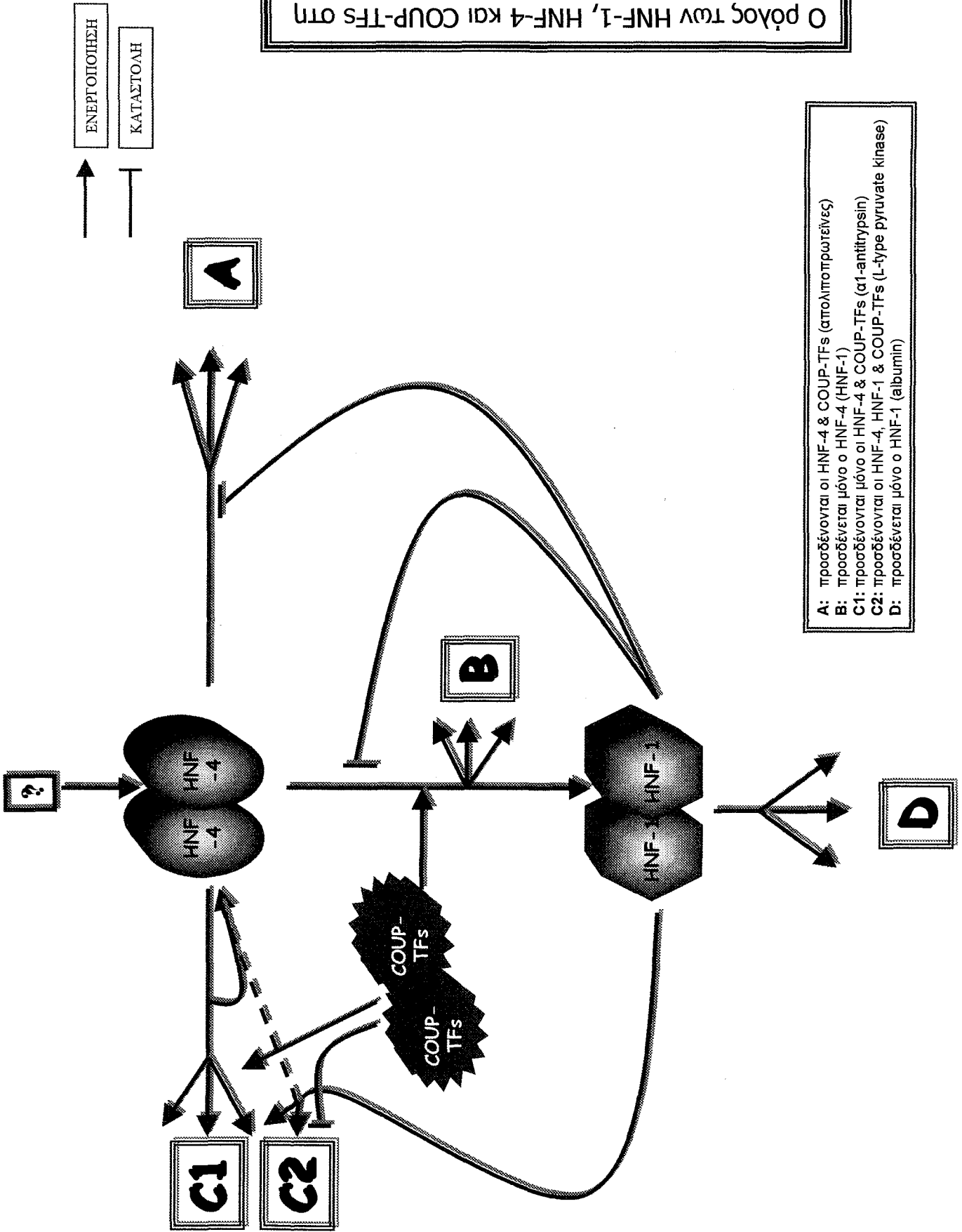
Αλληλεπιδράσεις του HNF-4 με τους COUP-TFs



Ποιοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με το μόριο της HNF-4



Ο ρόλος των HNF-1, HNF-4 και COUP-TFs στη ρύθμιση διαφόρων τύπων ηπατικών γονιδίων



ANTI ΕΠΙΛΟΓΟΥ

Η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων που η έκφρασή τους περιορίζεται στο συκώτι, φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Συνίσταται στη συνδυασμένη δράση ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων, άλλων που εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και τέλος, άλλων που αποκρίνονται σε εξωκυτταρικά σήματα. Ο HNF-4 είναι ένας από τους σημαντικότερους μεταγραφικούς ρυθμιστές των γονιδίων που χαρακτηρίζουν τον ηπατικό φαινότυπο και σχετίζονται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων, λιπιδίων, στεροειδών, αμινοξέων και προσταγλανδινών, με την αποτοξίνωση διαφόρων ουσιών και με την παραγωγή πρωτεϊνών του ορού. Ρυθμίζει άμεσα πλειάδα τέτοιων γονιδίων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και αυτό του HNF-1. Ο τελευταίος αποτελεί ένα άλλο σημαντικό μεταγραφικό ρυθμιστή γονιδίων του ήπατος. Ο δυσδιάστατος ρόλος του HNF-4, του άμεσου και του έμμεσου ρυθμιστή, τον τοποθετεί στην κορυφή της ιεραρχίας μεταγραφικών ρυθμίσεων στο ήπαρ.

Η πρόκληση να διερευνήσουμε το τι ρυθμίζει τους ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης για να διαλευκάνουμε το μηχανισμό τόσο της έκφρασης όσο και της δράσης τους που τους κάνει να ενέχονται σε βασικές διαδικασίες ανάπτυξης και διαφοροποίησης, έστρεψε το ενδιαφέρον μας στην πιθανότητα της φωσφορυλίωσης του HNF-4. Μια και πολλά ερεθίσματα που επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση είναι και σήματα ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών, είναι αναμενόμενο ότι η λειτουργικότητα των μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να ρυθμίζεται με τη φωσφορυλίωση.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η φωσφορυλίωση μπορεί να επιδρά στην ικανότητα ενός μεταγραφικού παράγοντα να προσδένεται στην κατάλληλη ρυθμιστική περιοχή στο DNA, στη μεταγραφική του ενεργότητα, ή στη μετάβασή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Οι παραπάνω περιπτώσεις δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενες, αντίθετα, η φωσφορυλίωση μπορεί να είναι υπεύθυνη για ταυτόχρονη ρύθμιση της γονιδιακής επαγωγής σε πολλά επίπεδα.

Ο HNF-4 είναι η πρώτη πρωτεΐνη που δε συμμετέχει σε μονοπάτι μετάβασης σήματος, αλλά δρα ως ιστοειδικός μεταγραφικός παράγοντας για την ικανότητα πρόσδεσης και μεταγραφική ενεργότητα του οποίου είναι απαραίτητη η φωσφορυλίωση σε τυροσίνη. Η φωσφορυλίωση του HNF-4 σε τυροσίνη, έχουμε ενδείξεις ότι επιδρά σε ένα μέχρι τώρα άγνωστο επίπεδο ρύθμισης της δράσης ενός μεταγραφικού παράγοντα στην ενδοπυρηνική του κατανομή. Τα αποτελέσματα που περιγράφονται στο δεύτερο κεφάλαιο για τον ενδοπυρηνικό εντοπισμό του HNF-4

είναι η πρώτη ένδειξη για τέτοιου τύπου διαμερισματοποίηση μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα.

Στα υπόλοιπα κεφάλαια της εργασίας αυτής, το θέμα που με απασχόλησε ήταν οι αλληλεπιδράσεις του HNF-4 με άλλους ιστοειδικούς και μη μεταγραφικούς παράγοντες που τροποποιούν τη δράση του ή τον κάνουν μέτοχο στη ρύθμιση γονιδίων στους υποκινητές των οποίων δεν προσδένεται.

Στο πρώτο κεφάλαιο, ο υπό έλεγχο υποκινητής είναι αυτός του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης AIV. Αποτελεί ένα από τα γονίδια-στόχους του HNF-4. Δείξαμε ότι ο HNF-4, ανταγωνιζόμενος την πρόσδεση των ασθενότερων ενεργοποιητών COUP-TFI και COUP-TFII, δεσμεύεται στη *cis* θέση AIVC και επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου. Παρόλο όμως που η πρόσδεσή του είναι αναγκαία, δεν είναι και ικανή από μόνη της για να ελέγξει τη μεταγραφή του γονιδίου. Αρκετά μακριά από τα *cis* στοιχεία του γονιδίου, στον υποκινητή του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης CIII που ανήκει στο ίδιο cluster γονιδίων, εντοπίστηκε ο ενισχυτής του γονιδίου της ApoAIV. Ο HNF-4 δηλαδή, μπορεί να επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου μόνο σε συνεργασία με τους παράγοντες που προσδένονται στον ενισχυτή. Γνωρίζουμε ότι μέσα σ' αυτούς συγκαταλέγεται ο Sp1, ένας μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα. Οι υπόλοιποι μεταγραφικοί ρυθμιστές που αναγνωρίζουν την περιοχή αυτή δεν έχουν ταυτοποιηθεί.

Στο τρίτο κεφάλαιο, αντικείμενο μελέτης είναι οι αλληλεπίδραση του HNF-4 με ένα άλλο σημαντικό ηπατοειδικό μεταγραφικό ρυθμιστή, τον HNF-1. Παρόλο που μέχρι τώρα δεν ήταν γνωστό να εμπλέκεται κανένας από τους δύο στη μεταγραφική δράση του άλλου, αλλά είχε δείχτει ότι ο καθένας από αυτούς έχει τα δικά του γονίδια-στόχους, το σενάριο αυτό τροποποιήθηκε περιπλέκοντας κάπως τα μεταγραφικά ρυθμιστικά μονοπάτια που ελέγχουν την ηπατοειδική έκφραση γονιδίων. Έτσι, ο HNF-1, αλληλεπιδρώντας με την αλληλουχία AF2 του HNF-4, παρεμποδίζει τη μεταγραφική δράση του τελευταίου. Αναλογιζόμενοι ότι ένα από τα γονίδια που ρυθμίζονται από τον HNF-4 είναι και αυτό του HNF-1, η παραπάνω αλληλεπίδραση μπορεί να ειπωθεί κάτω από το πρίσμα ενός feedback μηχανισμού για την έκφραση του HNF-1 και επακόλουθα για τη ρύθμιση των γονιδίων-στόχων του.

Τέλος, στο τέταρτο κεφάλαιο, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του HNF-4 με δύο άλλους σημαντικούς ρυθμιστές των ηπατικών γονιδίων, τους παράγοντες COUP-TFI και COUP-TFII. Μέχρι πρόσφατα, οι παράγοντες αυτοί ήταν γνωστοί ως ανταγωνιστές της δράσης του HNF-4 μια και στις περισσότερες περιπτώσεις φάνηκε να αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία DNA με τον HNF-4, να προσδένονται σ' αυτή

με παρόμοια συγγένεια και να επάγουν πολύ ασθενέστερα τη μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων. Στους υποκινητές που μελετήθηκαν σ' αυτή την εργασία, η θέση πρόσδεσης του HNF-4 δεν αναγνωρίζεται από τους COUP-TFs. Σ' αυτή την περίπτωση, οι COUP-TFs, αλληλεπιδρώντας με την περιοχή E του HNF-4, ενισχύουν τη μεταγραφική του δράση. Μπορούμε δηλαδή να διαχωρίσουμε τα γονίδια που ρυθμίζονται από του COUP-TFs σε τρεις κατηγορίες:

- ❖ σ' αυτά που διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για τους COUP-TFs οι οποίες δεν αναγνωρίζονται από τον HNF-4, όπου οι πρώτοι είναι αυτοί που επάγουν τη μεταγραφή τους,
- ❖ σ' αυτά που διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης που αναγνωρίζονται και από τους δύο, οπότε ο HNF-4 ανταγωνίζεται τους COUP-TFs για κοινή θέση πρόσδεσης και δρα ως ισχυρότερος ενεργοποιητής της μεταγραφής από αυτούς και τέλος
- ❖ σ' αυτά που διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης που αναγνωρίζονται μόνο από τον HNF-4 όπου οι COUP-TFs μέσω μοριακών αλληλεπιδράσεων με τον HNF-4 ενισχύουν τη μεταγραφική του ενεργότητα.

Συμπερασματικά, και δικαιολογώντας τον τίτλο αυτής της εργασίας, η ρύθμιση της έκφρασης των ηπατοειδικών γονιδίων αντικατοπτρίζει ένα πλέγμα μονοπατιών όπως φαίνεται στο αντίστοιχο σχεδιάγραμμα κι όχι ασύνδετα, μη διαπλεκόμενα μονοπάτια. Η δράση του HNF-4, στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήσαμε, ήταν αναγκαία, αλλά όχι ικανή από μόνη της για να κατευθύνει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία του ηπατοκυττάρου ως κέντρο μεταβολισμού και αποτοξίνωσης.

summary

Mechanisms which govern development and organogenesis are a major issue in biology. These mechanisms are mainly determined by a cascade of events which include specific spatiotemporal activation of a subset of genes. In such a cascade, transcription factors play a crucial role since they carry specific messages to the DNA which result in the activation of specific set of genes.

The model system that we are studying is the hepatocyte phenotype which has proven to be very attractive for biochemical, cellular and developmental studies. The liver synthesizes proteins that are involved in detoxification, retinol & steroid metabolism, amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, lipid metabolism. It is also the site of synthesis for serum protease inhibitors and transport proteins. Most of the corresponding genes are controlled at the transcriptional level and depend on the availability of a small set of liver enriched transcription factors such as HNF-1, HNF-3, HNF-4, COUP-TFI, COUP-TFII, CEBPs. Therefore, the mechanism by which these factors are regulated, may be a key element in the establishment and maintenance of the liver-specific phenotype.

My thesis work has mainly focused on the elucidation of the mechanisms involved in the HNF-1 and HNF-4 gene regulation and can be summarized as follows:

- Apolipoprotein AIV expression is restricted to intestinal and hepatic cells, suggesting a tissue specific regulation of its gene. To investigate the mechanism controlling apoAIV transcription we have analysed its promoter region by in vitro DNA binding and transient transfection experiments. DNaseI footprinting analysis of the proximal promoter revealed four protected regions, named A, B, C, D. The AIVC element which is necessary for maximal promoter activity, binds HNF-4, Arp-1 and Ear-3 with similar affinities in a mutually exclusive manner. HNF-4 transactivated the chimeric constructs containing an intact AIVC site in the context of either the apoAIV promoter or the heterologous thymidine kinase minimal promoter, while Arp-1 and Ear-3 mediated repression, suggesting that the observed opposite effects resulted from direct competition of these factors for the same recognition site. In transient transfection assays, the apoAIV promoter region (-700 to +10) had a very low activity in cells of hepatic (HepG2) and intestinal (CaCo2) origin. The activity was increased by 13 to 18 fold when upstream elements of the distantly linked apoCIII gene were fused to the proximal promoter. Results obtained with different 5' and 3' deletion constructs indicated that the cis-acting elements F to J between the nucleotides -500 and -

890 of the apoCIII promoter were absolutely necessary to drive maximal enhancement in HepG2 and CaCo2 cells. The apoCIII upstream elements enhanced the activity of the minimal AdML promoter or the apoAIV site C mutant less efficiently than the intact apoAIV or AdML promoter constructs containing single HNF-4 sites. These findings suggest that the enhancer effect is mediated by synergistic interactions between the trans-acting factors which recognised the apoCIII regulatory elements and HNF-4 which binds to the proximal apoAIV promoter.

Ktistaki, E., Lacorte, J-M., Katrakili, N., Zannis, V.I. and Talianidis, I. (1994). "Transcriptional regulation of the apolipoprotein AIV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein CIII gene". *Nucleic Acids Res.* 22:4689-4696.

- HNF-1 negatively regulates its own and other HNF-4 dependent genes by a mechanism that involves direct interaction of HNF-1 with the activation domain of HNF-4. In this way, HNF-1 represses HNF-4 dependent genes, whose promoters lack HNF-1 binding sites. On the other hand, HNF-1 is an important positive regulator of a large number of other liver-specific genes. This promoter dependent dual function of HNF-1, suggests its central role in the coordination of the regulatory network that defines the hepatic phenotype.

Kritis, A., **Ktistaki, E.,** Barda, D., Zannis, V., Talianidis, I. (1993). "An indirect negative autoregulatory mechanism involved in hepatocyte nuclear factor 1 (HNF-1) gene expression." *Nucl. Acid. Res.* 21: 5882-5889.

Ktistaki, E. and Talianidis, I. (1997). "Modulation of Hepatic Gene Expression by Hepatocyte Nuclear Factor 1". *Science.* 277: 109-112.

- Analysis of the mechanism of HNF-1 activation by HNF-4 revealed that the activity of HNF-4 is highly enhanced by the orphan receptors COUP-TFI and COUP-TFII. These two factors were strong repressors of HNF-4 and other hormone receptor mediated transcription. The controversy was resolved by the findings that COUP-TFs enhanced HNF-4 activity only on promoters to which they cannot bind directly (e.g. the HNF-1 promoter), while on promoters which contain common binding sites for HNF-4 and COUP-TFs, the latter antagonize

activation by HNF-4. COUP-TFs enhance HNF-4 activity by a mechanism that involves physical interaction with the HNF-4 E domain. My results suggest that this interaction induces a conformational change on HNF-4, orienting its activation domain into a more active configuration. In addition, they provide the first indication for the involvement of COUP-TFs in the initial activation and subsequent high level expression of hepatic regulators, in addition to the positive and negative modulation of downstream target genes.

Ktistaki, E. and Talianidis, I. (1997). "Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors act as auxiliary cofactors for hepatocyte nuclear factor 4, and enhance hepatic gene expression". *Mol. Cell. Biol.* 17: 2790-2797.

- Recent studies in our laboratory have shown that the apoCIII promoter activity as well as in vivo mRNA levels decreased when HepG2 cells have been treated with IL-1 or IL-6 as a model of the "acute phase reaction" of the liver. We have mapped the corresponding response element in the proximal promoter region of apoCIII and found that it binds NFκB family members (p65, p50, c-rel) as well as C/EBPα, C/EBPβ, and C/EBPγ in a mutually exclusive manner. These factors dramatically activate transcription of different mutant promoter constructs in which the interaction of HNF-4 with upstream enhancer binding factors are disrupted. On the other hand, in the context of the wild type promoter they induce a negative response. We suggest that the overall inhibition of the apoCIII expression during the acute phase reaction is mediated by cytokine induced positive factors through the disruption of a stronger transcriptionally active complex operating under normal physiological conditions.

Lacorte, J-M., **Ktistaki, E.**, Beigneux, A., Zannis, V.I., Chambaz, J., and Talianidis, I. (1997). "Activation of CAAT enhancer binding protein δ (C/EBPδ) by interleukin-1 negatively influences apolipoprotein CIII expression". *J. Biol. Chem.* 272: 23578-23584.

- HNF-4 is a prominent member of liver enriched transcription factors, playing a role in the expression of a large number of liver specific genes. HNF-4 is expressed in a limited number of tissues and can activate transcription in several nonhepatic cell lines, indicating that it is regulated mainly at the transcriptional level and no liver specific modification is required for its function. On the other hand, the difference between the HNF-4 molecular mass predicted from its

primary sequence (50.6 kD) and that determined by gel electrophoresis (54 kD), suggested that post-translational modifications may occur. We have recently found that HNF-4 is a phosphoprotein and that phosphorylation at tyrosine residue(s) is important for its DNA binding activity and consequently its transactivation potential both in vivo and in vitro. Tyrosine phosphorylation did not affect the transport of HNF-4 from the cytoplasm to the nucleus, however it had a dramatic effect in its subnuclear localization. HNF-4 was concentrated in distinct nuclear compartments, as evidenced by in situ immunofluorescence and electron microscopy. This compartmentalization disappeared when tyrosine phosphorylation was inhibited by genistein. The correlation between the intranuclear distribution of HNF-4 and its ability to activate endogenous target genes, demonstrate a novel phosphorylation signal dependent pathway in the regulation of transcription factor activity.

Ktistaki, E., Ktistakis, N.T., Papadogeorgaki, E. and Talianidis, J. (1995). "Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA binding and transactivation potential". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9876-9880.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

**Modulation of Hepatic Gene Expression
by Hepatocyte Nuclear Factor 1**

Eleni Ktistaki and Iannis Talianidis*

Modulation of Hepatic Gene Expression by Hepatocyte Nuclear Factor 1

Eleni Ktistaki and Iannis Talianidis*

Hepatocyte nuclear factors 1 and 4 (HNF-1 and HNF-4) are liver-enriched transcription factors that function in the regulation of several liver-specific genes. HNF-1 activates genes containing promoters with HNF-1 binding sites. However, this factor negatively regulates its own expression and that of other HNF-4-dependent genes that lack HNF-1 binding sites in their promoter region. This repression is exerted by a direct interaction of HNF-1 with AF2, the main activation domain of HNF-4. The dual functions of gene activation and repression suggest that HNF-1 is a global regulator of the transcriptional network involved in the maintenance of hepatocyte-specific phenotype.

Liver-specific gene expression is governed by the combinatorial action of a small set of liver-enriched transcription factors, including HNF-1, C/EBP, HNF-3, and HNF-4 (1). The expression patterns of HNF-1 and HNF-4 closely correlate with the differentiation state of hepatic cells. HNF-4 is an activator of the HNF-1 gene, defining a transcriptional hierarchy involved in both the determination and maintenance of hepatic phenotype (2). In transient transfection experiments, HNF-1 negatively regu-

lates its own and other HNF-4-dependent promoters that are not directly recognized by HNF-1 (3). These findings suggested the functioning of an indirect negative autoregulatory mechanism that is triggered by increased intracellular concentrations of HNF-1. HNF-1 did not affect several other promoters, and fusion proteins containing different NH₂- and COOH-terminal parts of the HNF-1 molecule failed to inhibit HNF-4-mediated transcription (3, 4). These findings argue against a squelching effect.

To investigate the potential role of HNF-1 on the transcription of its own gene in the *in vivo* chromosomal context, we generated stable HepG2 cell lines (H1A

Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas, Post Office Box 1527, 711 10 Heraklion, Crete, Greece.

*To whom correspondence should be addressed.

and H1B) expression and detection analysis of HNF-1 protein. The expression of endogenous HNF-1 and various target genes was analyzed by Northern (RNA) blot analysis. A glyceral aldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) probe that produced constant amounts of mRNA was used as a control. Hybridization with a probe encompassing the coding region of the rat HNF-1 DNA (rHNF-1CR) produced signals of 3.6 and 3.0 kb that corresponded to endogenous and transgene-derived HNF-1, respectively (Fig. 1). The amount of endogenous HNF-1 transcript was reduced in both H1A and H1B cell lines. This decrease was also observed by hybridization with the use of a 5' untranslated (3' UTR) fragment of the human HNF-1 as a probe that detected only endogenous HNF-1 mRNA (Fig. 1). Expression of apolipoprotein C-III (apoC-III) dependent on HNF-4 (5). The amount of apoC-III mRNA was decreased in the HNF-1-overproducing cell lines. However,

transcription level for mRNA transcribed from the HNF-1-dependent albumin gene (6) was increased. The amount of HNF-4 transcript remained constant, which implied a lack of positive reciprocal activation of HNF-1 and HNF-4 in the chromosomal context. Consistent with this notion is the observation that some HNF-4 promoter constructs that contain the putative HNF-1 binding site do not drive liver-specific expression in transgenic mice (7). Moreover, wild-type and null mutant mice that are devoid of HNF-1 express HNF-4 in similar amounts (8).

In the HNF-1-overproducing cell lines, the activities of the albumin, apoC-III, and HNF-1 promoters were affected in the same way as the amount of their steady-state mRNA, indicating that the observed changes were the result of altered transcription rates (Fig. 2). In addition, the activity of the chimeric promoter construct 4xA TK-CAT, which contains four copies of the HNF-4 binding site of the HNF-1 promoter, was also reduced. On the other hand, the activity of the control promoter (RSV-CAT) was not changed (Fig. 2). This suggests that HNF-1 exerts its negative effect by counteracting HNF-4 activation on the corresponding regulatory regions.

To understand the molecular mechanism responsible for the above observations, we performed electrophoretic mobility shift assays to compare the amounts of active DNA binding protein in the stable cell lines. As a control, Sp1 binding activity was monitored and found to be similar in all extracts (Fig. 3A). Alb-PE (3, 6) and site A (3) were used as probes for HNF-1 and HNF-4, respectively. In the H1A and H1B cell lines, DNA binding to the Alb-PE probe was 11 and 4 times that of the wild type, respectively (Fig. 3A). This is much lower than the observed increase in total amounts of HNF-1 mRNA. The difference might result from additional translational control mechanisms or limiting intracellular concentrations of DCoH (dimerization cofactor for HNF-1), which is required for HNF-1 dimerization and stability (9). No difference in DNA binding activity on the HNF-4 probe was observed with the different HepG2 cell lines (Fig. 3B). An antibody raised against HNF-4 almost quantitatively supershifted the DNA-protein complex formed on the site A probe, whereas an HNF-1 antibody failed to supershift the complex (Fig. 3B). Moreover, no difference in HNF-4 binding affinity to site A was detected with the use of extracts from the

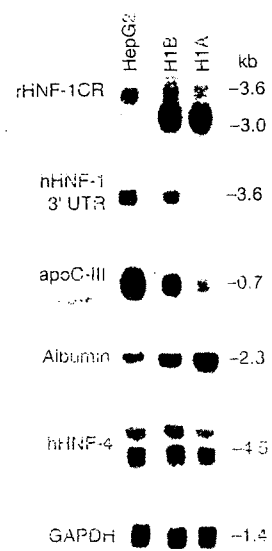


Fig. 1. Ectopic expression of HNF-1 represses endogenous HNF-1 and apoC-III transcription. HepG2 cells were transfected with pCB-HNF-1 expression vector (3), and stably expressing cell lines were selected and expanded in a medium containing G418 (150 μ g/ml; Geneticin, BRL). Polyadenylate RNAs from cell lines expressing different amounts of HNF-1 (H1A and H1B) were prepared and compared with wild-type HepG2 mRNA by Northern blot hybridization using the following probes: rHNF-1CR (containing the entire coding region of rat HNF-1 cDNA), hHNF-1 3' UTR (containing nucleotides 2305 to 2783 of the 5' untranslated region of human HNF-1 cDNA), and cDNAs coding for human apoC-III, mouse albumin, human HNF-4 (hHNF-4), and GAPDH as control. Hybridization and washing conditions are as described in (7,9). Positions of radioactive signals are shown at the right. With HNF-4 a second signal above the 4.5-kb band can also be seen, which corresponds to cross-hybridization with contaminating 28S ribosomal RNA.

Fig. 2. Negative regulation of HNF-4-dependent promoters by HNF-1. Wild-type (WT) and HNF-1-overexpressing HepG2 cell lines (B and A) were transfected by the calcium phosphate precipitation method (13) with 2 μ g of the indicated reporters containing the mouse albumin (Alb-CAT) (3), human apolipoprotein C-III (ApoC-III-CAT) (5, 13), rat HNF-1 (HNF-1-CAT) (3), or Rous sarcoma virus (RSV-CAT) (3) promoters, or a chimeric reporter construct containing four copies of the HNF-4 binding site of the HNF-1 promoter fused to the minimal promoter region (nucleotides -85 to +51) of the herpes simplex virus thymidine kinase gene (4xA TK-CAT) (3). The bars represent means \pm SE of normalized CAT (chloramphenicol acetyltransferase) activities from at least four independent experiments, and these values are expressed as relative activation (Alb-CAT) or as a percentage of the activity measured in wild-type cells.

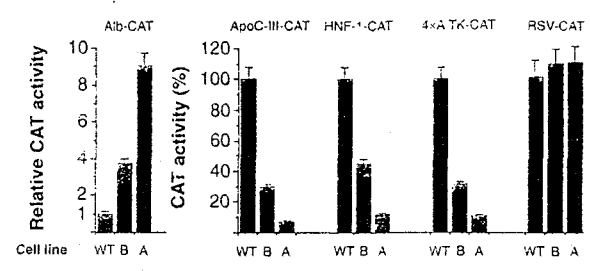
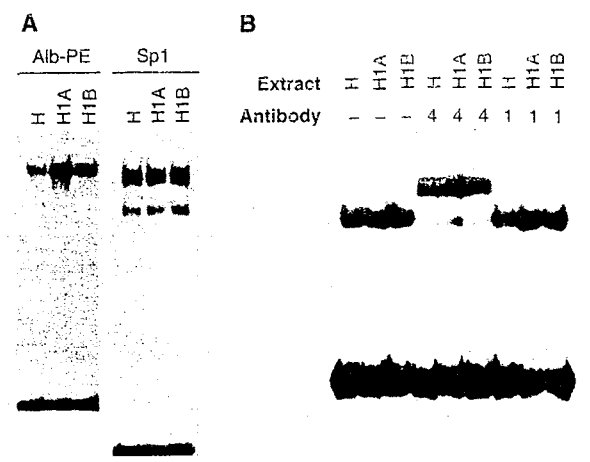


Fig. 3. Site A of the HNF-1 promoter binds HNF-4 but not HNF-1. Nuclear extracts from wild-type HepG2 (H) and the HNF-1-overexpressing (H1A and H1B) cell lines were prepared and analyzed in electrophoretic mobility shift assays using (A) Alb-PE and Sp1 or (B) site A oligonucleotide probes, as described (13). In some assays, 1 μ l of antibody to HNF-4 (4) or HNF-1 (1) at 1:6 dilution were also included. The identity of HNF-1 that bound to the Alb-PE probe was verified by supershifts with HNF-1 antibody (10).



HepG2, H1A, and H1B cell lines or extracts from HNF-4⁻ and HNF-1-transfected COS-1 cells (10). Thus, neither HNF-1 nor another factor that may have been induced by HNF-1 interacts directly with site A, and HNF-1 does not affect the DNA binding activity of HNF-4.

Although mobility shift experiments did not reveal interactions between HNF-1 and HNF-4, weak protein-protein interactions may exist that are unable to survive electrophoretic conditions but could explain the down-regulation of HNF-4-dependent

genes by HNF-1. To test this idea, we mapped the HNF-4 protein domains necessary for HNF-1-mediated down-regulation. Fusion proteins containing the Gal4 DBD (the DNA binding domain of yeast Gal4 protein) and parts of HNF-4 bind to the Gal4 response element as dimers through the Gal4 DBD (11), and their expression is not affected by HNF-1 (10). The Gal4 HNF-4(E) construct that contains the complete ligand binding-dimerization domain (12) of HNF-4 was a potent activator of the Gal4-responsive reporter in both HepG2

and COS-1 cells (Fig. 4). This activation was strongly inhibited by increased intracellular amounts of HNF-1 derived from ectopic expression in the stably transfected HepG2 cell lines (H1B and H1A) or from cotransfected expression vector (COS cells). Similar results were obtained with cotransfected HNF-1(440), which lacks the COOH-terminal activation domain whereas HNF-1(280), which contains the dimerization and DNA binding domain failed to exhibit repressor activity (Fig. 4). Partial deletion of the main activation domain of HNF-4 [Gal4 HNF-4(E354) which is located between amino acids 3 and 368, resulted in loss of activity. A significant change was observed in experiments with Gal4 VP16, which was used as an unrelated control (Fig. 4).

These results indicated that HNF-1 may repress gene expression through physical interaction with HNF-4. In vitro evidence of such protein-protein interaction was provided by pull-down assays with glutathione S-transferase (GST)-HNF-4 fusion proteins and in vitro synthesized ³⁵S-labeled HNF-1. HNF-1 associated with TFIIB (Fig. 5A); this interaction may be important for HNF-1-facilitated formation of preinitiation complexes. Comparable amounts of bound HNF-1 protein were recovered with GST-HNF-4(130-368), containing the entire E domain, and by GST-HNF-4(AF) containing the main activation region (amino acids 337 to 368) of HNF-4. In contrast, no interaction was observed with an HNF-4 derivative lacking the AF2 domain [GST-HNF-4(ΔAF2)] or with a GST-Gal4 fusion protein that was used as an unrelated control (Fig. 5A).

Interaction between HNF-4 and HNF-1 in intact cells was determined by nuclear cotranslocation assays with the use of a mutant form of HNF-4 [HNF-4(227-455) which lacks specific nuclear localization signals but contains the domain required for in vitro interaction with HNF-1. This mutant was detected exclusively in the cytoplasm of transfected COS-1 cells (Fig. 5B). Coexpression of HNF-4(227-455) with either full-length HNF-1 (FL) or HNF-1(440), but not with HNF-1(280) or Gal4 protein, resulted in its translocation to the nucleus (Fig. 5B). Thus, HNF-1-HNF-4 interaction required the HNF-1 domain located between amino acids 280 and 440, but not the COOH-terminal activation domains of HNF-1.

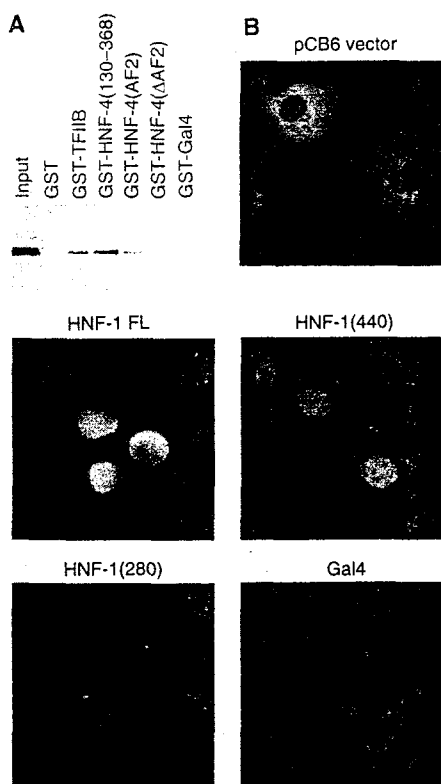
Taken together, our results indicate that the AF-2 domain of HNF-4 is sufficient and necessary for physical interaction with HNF-1 and for repression. This association may block the HNF-4 activation domain in a way that prevents either its interaction with coactivators that transduce AF2 ac-

Fig. 4. HNF-1 represses HNF-4 activity through interaction with the HNF-4 E domain in vivo. COS-1 and HepG2 cell lines (WT, H1B, H1A) were transfected with 2 μg of Gal4-CAT reporter containing four copies of the 17-nucleotide oligomer

	HepG2 cell lines			COS-1 cells			
	WT	H1B	H1A	-HNF-1	FL	M280	M440
Gal4 DBD	1.0	0.9	1.1	1.0	1.1	1.1	0.9
Gal4 HNF-4(E)	18.2	9.8	5.1	23.5	2.8	22.6	3.5
Gal4 HNF-4(E354)	1.2	1.1	1.3	1.1	1.0	0.9	1.2
Gal4 VP16	159.0	143.5	150.8	182.7	178.5	185.2	175.6

Gal4 binding site, together with 0.5 μg of the indicated Gal4 expression plasmids. In COS-1 cells, 0.5 μg of pCB-HNF-1 (FL), pCB-HNF-1(280) (M280), or pCB-HNF-1(440) (M440) was also included where indicated. The numbers represent mean values of β-galactosidase-normalized CAT activities from at least six independent experiments with SEs of <8% and are expressed as activation relative to the activity obtained with the Gal4 DBD. Maximal activity in both HepG2 and COS-1 cells was obtained with a fusion construct containing the entire E domain [Gal4 HNF-4(E)]. No activity was observed when other combinations of HNF-4 domains (such as amino acids 337 to 368, 337 to 455, 368 to 455, and 227 to 455) were tested, suggesting that the HNF-4 AF2 domain is active only in the context of an intact E domain (14).

Fig. 5. HNF-1 interacts with the AF2 domain of HNF-4 in vitro and in vivo. (A) In vitro synthesized [³⁵S]methionine-labeled HNF-1 was incubated with the indicated GST fusion proteins, and the bound proteins were analyzed by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Growth and expression of GST fusion proteins in *Escherichia coli* strain JM109 were performed as described (15). ³⁵S-labeled full-length recombinant HNF-1 was synthesized in vitro from the corresponding constructs in Bluescript KS (Stratagene) using the TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega). Glutathione-Sepharose beads containing 2 μg of each fusion protein were incubated with ³⁵S-labeled proteins in interaction buffer [100 mM KCl, 20 mM Hepes (pH 7.9), 0.1% NP-40, 5 mM MgCl₂, 0.2% bovine serum albumin (BSA), 10% glycerol, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride, and aprotinin (10 μg/ml)] for 1.5 hours at 4°C with constant agitation. After extensive washing with the same buffer minus BSA and glycerol, the beads were resuspended in 20 μl of SDS-loading buffer and analyzed by SDS-PAGE; 8% of the input ³⁵S-labeled HNF-1 is shown in the first lane. (B) COS-1 cells were transfected with 500 ng of nuclear localization-deficient mutant pMT-HNF-4(227-455) alone (pCB6 vector) or with 1 μg of pCB-HNF-1 FL, pCB-HNF-1(440), pCB-HNF-1(280), or pBx-Gal4 expression vectors, transferred to cover slips, and stained with polyclonal peptide antibody raised against the COOH-terminal 11-amino acid epitope of HNF-4, as described (14). The number of cells examined showing [nuclear]:[nuclear plus cytoplasmic]:[cytoplasmic] staining was 0:0:54 in HNF-4(227-455)-transfected cells. In cotransfected cells this ratio was 56:2:1 (HNF-1 FL), 51:1:2 [HNF-1(440)], 0:0:42 [HNF-1(280)], and 0:0:51 (Gal4). Typical examples of the immunofluorescent images are shown (magnifications, ×284).



ity to the transcription machinery or its direct interaction with general transcription factors. As a consequence, increased amounts of HNF-1 induce a regulatory mechanism that leads to the general down-regulation of HNF-4-dependent liver-specific genes, including the HNF-1 gene itself. This promoter-dependent dual function of HNF-1 suggests its central role in the coordination of the regulatory network that defines the hepatic phenotype.

REFERENCES AND NOTES

1. M. Frain *et al.*, *Cell* **59**, 145 (1989); S. Baumhueter *et al.*, *Genes Dev.* **4**, 372 (1990); V. De Simone *et al.*, *EMBO J.* **10**, 1435 (1991); W. H. Landschulz, P. F. Johnson, E. Y. Adashi, B. J. Graves, S. L. McKnight, *Genes Dev.* **2**, 786 (1988); E. Lai *et al.*, *ibid.* **4**, 1427 (1990); F. M. Sladek, W. Zhong, E. Lai, J. E. Darnell Jr., *ibid.*, p. 2353.
2. C. J. Kuo *et al.*, *Nature* **355**, 457 (1992); H.-M. Tian and U. Schibler, *Genes Dev.* **5**, 2225 (1991).
3. A. A. Kritis, E. Ktistaki, D. Barda, V. I. Zannis, I. Talianidis, *Nucleic Acids Res.* **21**, 5882 (1993).
4. G. Piaggio *et al.*, *ibid.* **22**, 4284 (1994).
5. M. Mietus-Snyder *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1708 (1992); J. A. A. Ladas *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**, 15849 (1992); I. Talianidis, A. Tambakaki, J. Tourounova, V. I. Zannis, *Biochemistry* **34**, 10298 (1995).
6. F. Tronche *et al.*, in *Liver Gene Expression*, F. Tronche and M. Yaniv, Eds. (Landes, Austin, TX, 1994), chap. 9.
7. W. Zhong, J. Mirkovitch, J. E. Darnell Jr., *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7276 (1994).
8. M. Pontoglio *et al.*, *Cell* **84**, 575 (1996).
9. D. B. Mendel *et al.*, *Science* **254**, 1762 (1991).
10. E. Ktistaki and I. Talianidis, unpublished data.
11. M. F. Carey, H. Kakidani, J. Leatherwood, F. Mostashari, M. Ptashne, *J. Mol. Biol.* **209**, 423 (1989).
12. F. M. Sladek, in (6), chap. 11.
13. E. Ktistaki, J. M. Lacorte, N. Katrakili, V. I. Zannis, I. Talianidis, *Nucleic Acids Res.* **22**, 4689 (1994); E. Ktistaki, N. T. Ktistakis, E. Papadogeorgaki, I. Talianidis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9876 (1995); A. A. Kritis *et al.*, *Gene* **173**, 275 (1996).
14. E. Ktistaki and I. Talianidis, *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2790 (1997).
15. D. B. Smith and K. S. Johnson, *Gene* **67**, 31 (1988).
16. We thank A. Economou for critical reading of the manuscript. Supported by Greek General Secretary for Science and Technology grant PENED2018.

7 February 1997; accepted 13 May 1997

Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factors Act as Auxiliary Cofactors for Hepatocyte Nuclear Factor 4 and Enhance Hepatic Gene Expression

ELENI KTISTAKI AND IANNIS TALIANIDIS*

Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, Herakleion 711 10, Crete, Greece

Received 14 November 1996/Returned for modification 22 December 1996/Accepted 14 February 1997

Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors (COUP-TFs) strongly inhibit transcriptional activation mediated by nuclear hormone receptors, including hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). COUP-TFs repress HNF-4-dependent gene expression by competition with HNF-4 for common binding sites found in several regulatory regions. Here we show that promoters, such as the HNF-1 promoter, which are recognized by HNF-4 but not by COUP-TFs are activated by COUP-TFI and COUP-TFII in conjunction with HNF-4 more than 100-fold above basal levels, as opposed to about 8-fold activation by HNF-4 alone. This enhancement was strictly dependent on an intact HNF-4 E domain. In vitro and in vivo evidence suggests that COUP-TFs enhance HNF-4 activity by a mechanism that involves their physical interaction with the amino acid 227 to 271 region of HNF-4. Our results indicate that in certain promoters, COUP-TFs act as auxiliary cofactors for HNF-4, orienting the HNF-4 activation domain in a more efficient configuration to achieve enhanced transcriptional activity. These findings provide new insights into the regulatory functions of COUP-TFs, suggesting their involvement in the initial activation and subsequent high-level expression of hepatic regulators, as well as in the positive and negative modulation of downstream target genes.

The nuclear hormone receptor superfamily encodes a diverse set of transcription factors, including receptors for steroids, retinoids, and thyroid hormones. Ligand-dependent activation of the different members of this superfamily modulates the transcription of a large number of target genes whose coordinate expression plays important roles in the control of vertebrate differentiation, development, and cellular homeostasis (20, 33, 34). Besides the classical receptors, the nuclear receptor superfamily comprises many orphan receptors which are structurally and functionally related but whose ligands have not been identified (10). The orphan receptors possess highly homologous DNA binding and ligand binding domains, and the DNA sequences with which they interact are common to the response elements of other hormone receptors. These characteristics give the orphan receptors the potential to participate in the different hormone signaling pathways through promoter element occupancy or heterodimerization with other ligand-dependent receptors. Two of the most studied orphan receptor families are COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4).

COUP-TFI (also called ear3) (52) and COUP-TFII (also called Arp-1) (26) are closely related transcription factors which have been implicated in the regulation of several important biological processes, such as early embryonic development (39) and neuronal cell fate determination (38). Although COUP-TFI was identified as an activator of the ovalbumin (42) and the rat insulin II (18) promoters, recent studies have shown that COUP-TFs are potent repressors of retinoic acid receptor-, thyroid receptor-, vitamin D₃ receptor-, peroxisome proliferator-activated receptor-, estrogen receptor-, and steroid-

ogenic factor 1-mediated transcription (3, 10, 11, 29, 30, 39, 49).

HNF-4 is a liver-enriched transcription factor which plays a pivotal role in the regulation of a very large number of liver-specific genes whose expression pattern is characteristic of terminally differentiated hepatocytes (43, 44). HNF-4 is an important activator of the HNF-1 gene (21, 24, 48), establishing a hierarchical pathway of transcriptional activation in the liver. HNF-4 is an important developmental regulator, as evidenced by its temporal and spatial expression pattern during drosophila (54) and early mouse development (13, 47) and by gene disruption studies demonstrating the importance of HNF-4 expression in the visceral endoderm for embryonic ectoderm survival and normal gastrulation (9). Most of the promoter elements that interact with HNF-4 can also recognize COUP-TFs (23, 25, 35, 43). COUP-TFs strongly repress HNF-4-mediated transcription from these promoters by a mechanism that involves competition with HNF-4 for the common binding site (25, 35). This antagonistic effect has led to the prevailing view that the expression of HNF-4-dependent liver-specific genes is fine tuned by the actual intracellular balance of these positive and negative regulators.

In this report, we present evidence that COUP-TFI and COUP-TFII act as auxiliary cofactors for HNF-4 on promoters that can be directly recognized by HNF-4 but not by COUP-TFs. We demonstrate that COUP-TFs, through protein-protein interaction with HNF-4, dramatically increase HNF-4 promoter activity, suggesting that they may play an important role in the activation of a wide range of liver-specific genes.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructions. pMT2 vectors expressing full-length HNF-4, COUP-TFI, and COUP-TFII, as well as the promoter constructs HNF-1-CAT and apoCIII-CAT, have been described previously (21, 23, 46). Chimeric reporter constructs were generated by ligating double-stranded kinased oligonucleotides encompassing the nucleotide (nt) -70 to -41 region of the rat HNF-1 promoter ("1XATK-CAT"), the nt -96 to -61 region of the human apoC-III promoter

* Corresponding author. Mailing address: Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, P.O. Box 1527, Herakleion 711 10, Crete, Greece. Phone: 30-81-391173. Fax: 30-81-391101.

($1 \times$ CIIB⁺TK-CAT), the nt -128 to -99 region of the human $\alpha 1$ antitrypsin promoter ($1 \times$ LFAT⁺TK-CAT), and the nt -151 to -130 region of the human transthyretin promoter ($2 \times$ TTR⁺TK-CAT) into the *Sall* site of previously described plasmid TK85-CAT (21). A G4-CAT reporter containing four copies of the 17-mer Gal4 binding site in front of the β -globin minimal promoter was a generous gift from I. Papamatheakis. pMT-HNF-4 (1-368) was constructed by PCR by using pMT-HNF-4 FL as the template and *EcoRI* adapter oligonucleotide primers corresponding to the nt 1 to 20 (sense) and 345 to 368 (antisense) regions of the rat HNF-4 cDNA. The PCR products were cleaved by *EcoRI* and ligated to the same site of a pMT2 vector. To obtain pMT-HNF-4 (1-354), the HNF-4 cDNA was cut with *EcoRI* and *MscI*, filled in with the Klenow enzyme, and ligated to the blunt-ended *EcoRI* site of pMT2. Gal4 HNF-4 (E), Gal4 HNF-4 (AF2h), and Gal4 HNF-4 (337-455) were generated by subcloning of the PCR-amplified fragment corresponding to the nt 391 to 1102, 1009 to 1102, or 1009 to 1356 region of HNF-4 into the *EcoRI* site of a pBxG1 vector. This vector is derived from pSG424 (41) expressing the amino acid (aa) 1 to 147 region of the yeast Gal4 cDNA (Gal4 DBD) with an altered polylinker region (provided by I. Papamatheakis). Gal4 HNF-4 (E354) was obtained by deleting the *MscI*/*BamHI* fragment from Gal4 HNF4 (E). Gal4 HNF-4 (227-455) was generated by deletion of the N-terminal aa 1 to 227 region of pMT-HNF-4 by *NcoI* digestion, followed by religation, and the *EcoRI* fragment of the resulting plasmid was subcloned into a pBxG1 vector. The C-terminal activation domain of VP16 (40) was excised from a pSJT 1193 CRF1 vector (kindly provided by D. Tzamaras) by digestion with *BglII* and *BamHI* and ligated into the *BamHI* site of a pBxG1 vector to obtain Gal4 VP16. pGex-COUP-TFI was constructed by subcloning the *EcoRI* fragment of pMT-COUP-TFI, containing the complete open reading frame of COUP-TFI, into the *EcoRI* site of a pGex-1 vector (Pharmacia). Plasmid pGex-TFIIIB was kindly provided by D. Thanos. All constructs were verified by nucleotide sequencing with T7 polymerase (Sequenase).

Transfections and CAT assays. Cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (for Cos-1 and HepG2), 20% (for Caco2), or 7% (for C33) heat-inactivated fetal calf serum. At 24 h before transfection, the cells were seeded at 50 to 60% confluence. A mixture of 2 μ g of a reporter construct, 0.5 μ g of an expression vector, and 2 μ g of pSV β gal (pCH110; Pharmacia) was introduced to the cells by the calcium phosphate DNA precipitation method as previously described (21-23). At 48 h later, the cells were harvested and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activities were measured by using constant amounts of protein extracts as previously described (21). The protein concentrations and incubation times were carefully selected by titration and kinetic experiments to ensure linear conversion of chloramphenicol to the acetylated form. β -Galactosidase activity in the cell extracts was measured as previously described (15), and the values were used to normalize variations in transfection efficiency.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA). Whole cell extracts from transfected Cos-1 cells were prepared by three freeze-thaw cycles in a buffer containing 20 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES; pH 7.9), 0.1 M KCl, 2 mM dithiothreitol, 0.5% Nonidet P-40 (NP40), 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ g of aprotinin per ml, and 1 μ g each of pepstatin and leupeptin per ml. DNA binding assays were performed essentially as described previously (21, 22).

The oligonucleotides used in this study were CIIB (TCGAGGTCAGCAGG TGACCTTTGCCACGG-67) and HNF-1 "A" (TCGAGGCTGAAGTCCAA AGTTCAGTCCCTTCGG-41).

In vitro protein-protein interaction assays. Growth and expression of glutathione *S*-transferase (GST) fusion proteins in bacterial strain JM109 were performed as previously described (45). ³⁵S-labeled recombinant HNF-4 derivatives were synthesized in vitro from the corresponding constructs in Bluescript KS (Stratagene) by using the TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega) in accordance with the manufacturers instructions. A 2- μ g sample of each fusion protein was loaded into a glutathione-Sepharose column (Pharmacia) pre-equilibrated with 0.5% bovine serum albumin (BSA) containing phosphate-buffered saline (PBS). After binding, the columns were washed three times with PBS and then three times with a wash buffer containing 100 mM KCl, 20 mM HEPES (pH 7.9), 0.1% NP40, 5 mM MgCl₂, 0.1 M PMSF, and 10 μ g of aprotinin per ml. The beads were washed once with interaction buffer (100 mM KCl, 20 mM HEPES [pH 7.9], 0.1% NP40, 5 mM MgCl₂, 0.2% BSA, 10% glycerol, 0.1 M PMSF, 10 μ g of aprotinin per ml) and incubated with ³⁵S-labeled proteins for 1.5 h at 4°C with constant agitation. After extensive washing with excess amounts of wash buffer, the beads were resuspended in 20 μ l of sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Indirect immunofluorescence assays. Transfected Cos-1 cells on coverslips were washed twice with PBS and fixed for 10 min at -20°C with methanol. After fixation, the coverslips were washed once with PBS and incubated with PBS containing 1% BSA (BSA-PBS) for 30 min at room temperature. HNF-4 anti-serum diluted 1:200 in BSA-PBS was applied to the cells, which were then incubated for 45 min. After washing with BSA-PBS, the cells were incubated with diluted (1:100) fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit secondary antibodies to immunoglobulin G (Jackson Laboratories) for 30 min at room temperature. The coverslips were washed with BSA-PBS, rinsed in water, mounted on glass slides with Mowiol (Polyscience), and observed in a Leitz Dialux 20 EB microscope equipped with epifluorescence optics.

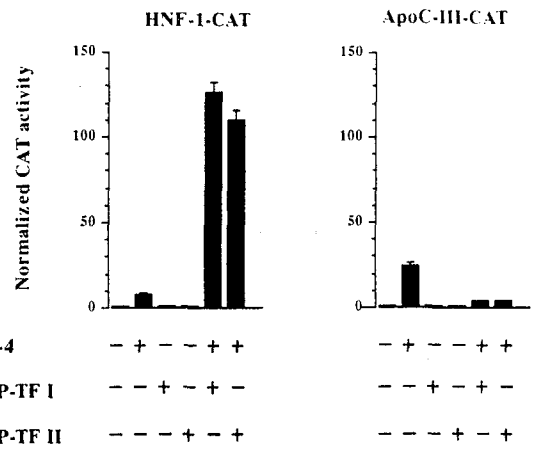


FIG. 1. Enhancement by COUP-TFI and COUP-TFII of HNF-4-dependent activation of the HNF-1 promoter. Cos-1 cells were cotransfected with 2 μ g of the HNF-1-CAT and apoC-III-CAT reporter plasmids, together with 0.5 μ g of the indicated expression vectors. The columns and error bars represent mean values and standard errors of β -galactosidase-normalized CAT activity from at least six independent experiments.

RESULTS

COUP-TFI and COUP-TF-II enhance HNF-4-mediated activation of the HNF-1 promoter. The A element of the HNF-1 promoter contains a DR-1 (direct repeat) motif that has been previously shown to interact with and be transactivated by HNF-4 in either a homologous or heterologous promoter context (21, 24, 48). Since DR-1 sequences are potential binding sites for other members of the hormone receptor family, including COUP-TFs, we investigated their possible involvement in HNF-1 gene expression. Cos-1 cells devoid of endogenous HNF-4 or COUP-TFs were transfected with HNF-1 promoter-CAT reporter and expression vectors for HNF-4, COUP-TFI, or COUP-TFII. As shown in Fig. 1, the HNF-1 promoter was transactivated eightfold above the basal levels by HNF-4, while COUP-TFI or COUP-TFII alone did not affect it. Surprisingly, when cotransfections were performed with COUP-TFI and COUP-TFII together with HNF-4, we observed 15- and 13-fold enhancement of HNF-4-mediated transactivation. As a control, we performed the same experiments with the apoC-III-CAT reporter, which is known to be repressed by COUP-TFs (25; 35, 46). As expected, overexpression of HNF-4 increased apoC-III promoter activity about 25-fold, and this activation was repressed by both COUP-TFI and COUP-TFII, excluding the possibility of certain experimental artifacts. Additional control experiments showed that COUP-TFs did not influence the amounts of HNF-4 protein produced by the expression vectors used or the activities of unrelated promoters that lack HNF-4 binding sites (data not shown). Cotransfection experiments with a " $1 \times$ A"TK-CAT reporter, which contains one copy of the DR1 motif of the HNF-1 promoter in front of the nt -85 to +51 region of the herpes simplex virus thymidine kinase gene linked to CAT cDNA, produced results very similar to those obtained in the homologous promoter context. HNF-4 transactivated this promoter construct 7-fold, and COUP-TFI and COUP-TFII further enhanced this activation 16- and 17-fold, respectively (Fig. 2). No change was observed when COUP-TFs were transfected alone. As a control, we tested the TK85-CAT reporter, which was unaffected by any combinations of the above factors. In addition, the " $1 \times$ CIIB⁺TK-CAT construct, containing one copy of the apoC-III hormone response element, was transactivated by HNF-4 and

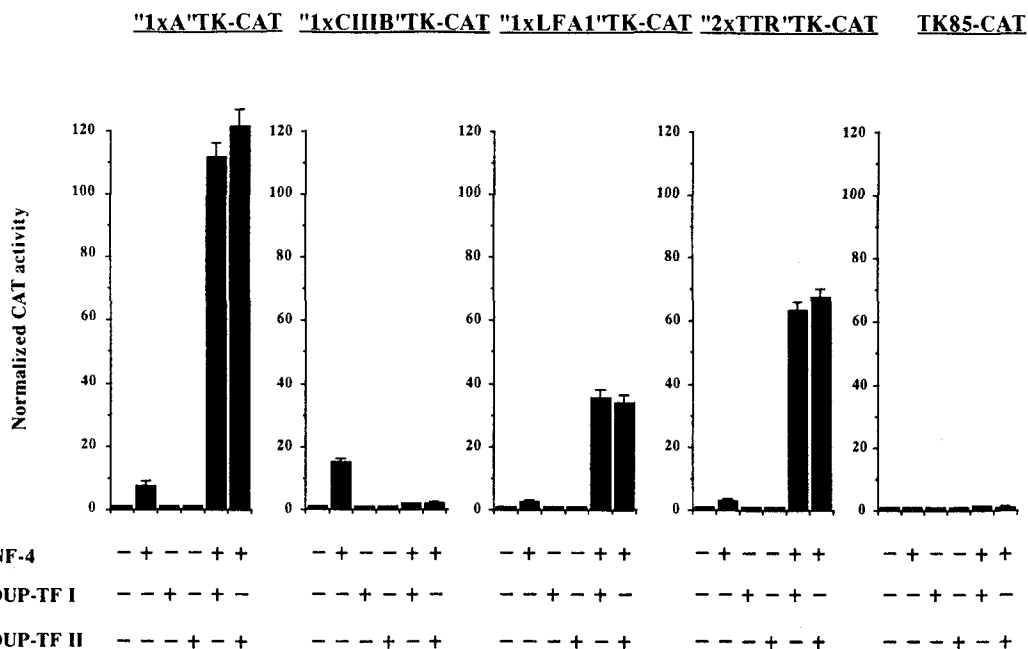


FIG. 2. Effects of COUP-TFI and COUP-TFII on HNF-4-activated transcription of chimeric promoter constructs. Cos-1 cells were cotransfected with 2 μ g of the indicated chimeric reporter constructs, together with 0.5 μ g of the indicated expression vectors. The columns and error bars represent mean values and standard errors of β -galactosidase-normalized CAT activity from at least four independent experiments.

repressed by COUP-TFs as expected (Fig. 2). Two other heterologous reporter constructs, containing HNF-4 binding sites from the α 1-antitrypsin ("1xLFA1"TK-CAT) and transthyretin ("2xTTR"TK-CAT) genes, were affected by HNF-4 and COUP-TFs in the same direction as "1xA"TK-CAT. HNF-4 transactivated both constructs 2.7- and 3.2-fold respectively. COUP-TFs alone had no effect on the promoter activities, while coexpression of COUP-TFI or COUP-TFII with HNF-4 resulted in activation 13- and 12-fold ("1xLFA1"TK-CAT) or 19- and 21-fold ("2xTTR"TK-CAT) above HNF-4-activated transcription (Fig. 2). Taking into consideration the different natures of these *cis*-acting elements with respect to hormone receptor binding abilities (e.g., the CIIB site is known to bind both HNF-4 and COUP-TFs with similar affinities [25, 35], while the LFA1 and TTR sites are known to bind HNF-4 but not COUP-TFs [25, 26]), the above data indicate that enhancement of HNF-4-induced transcription by COUP-TFs may be achieved through protein-protein interaction.

COUP-TFI and COUP-TFII do not bind directly to site A of the HNF-1 promoter. To assess the possible direct or indirect interactions of COUP-TFs with the site A element of the HNF-1 promoter, EMSA experiments were carried out by using extracts from Cos-1 cells transfected with HNF-4, COUP-TFI, COUP-TFII, or combinations of them. As shown in Fig. 3, DNA-protein complex formation could be detected with HNF-4 but not with COUP-TFI or COUP-TFII, confirming previous observations that COUP-TFs do not directly recognize the HNF-1 promoter (21; data not shown). When extracts from cells cotransfected with HNF-4 and COUP-TFI or COUP-TFII were used in the assay, only one major band corresponding to HNF-4 was observed. A faint supershifted band that may correspond to an HNF-4-COUP-TF protein-protein complex was also observable; however, this band was not reproducibly seen at all times when the same experiment was repeated and could not be eliminated by either COUP-TF antibodies or COUP-TF-specific competitor oligonucleotides

(data not shown). The same extracts were also tested by EMSA using the CIIB binding site (Fig. 3). As expected, all three factors formed a complex with this probe, excluding the possibility of artifacts generated during transfection or extract preparation. The possibility of heterodimer formation between HNF-4 and COUP-TFs, which may have escaped detection in the previous experiment due to their similar running positions, was tested by using a 3' truncated derivative of HNF-4 [HNF-4 (1-368)]. No heterodimer formation was observed when either site A or CIIB was used as the probe (Fig. 3), confirming

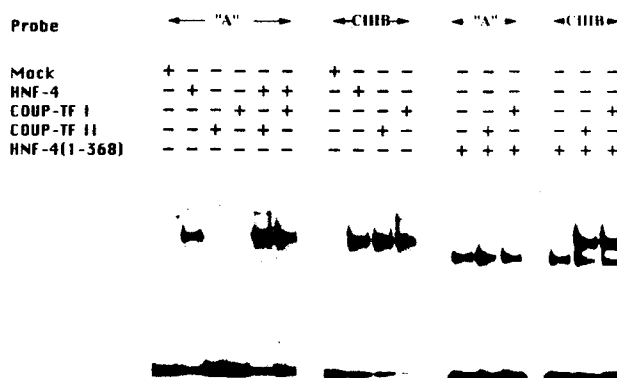


FIG. 3. Failure of COUP-TFI and COUP-TFII to interact with the DR-1 element of the HNF-1 promoter as homodimers or by heterodimerization with HNF-4. EMSA experiments were performed with cellular extracts from Cos-1 cells transfected with the indicated expression vectors and radiolabeled double-stranded oligonucleotides corresponding to site A of the rat HNF-1 promoter ("A") and the proximal hormone response element of the human apoC-III promoter (CIIB). Each binding reaction was performed with an extract containing 5 μ g of total protein. The same results were obtained when individual extracts were mixed in the binding reaction.

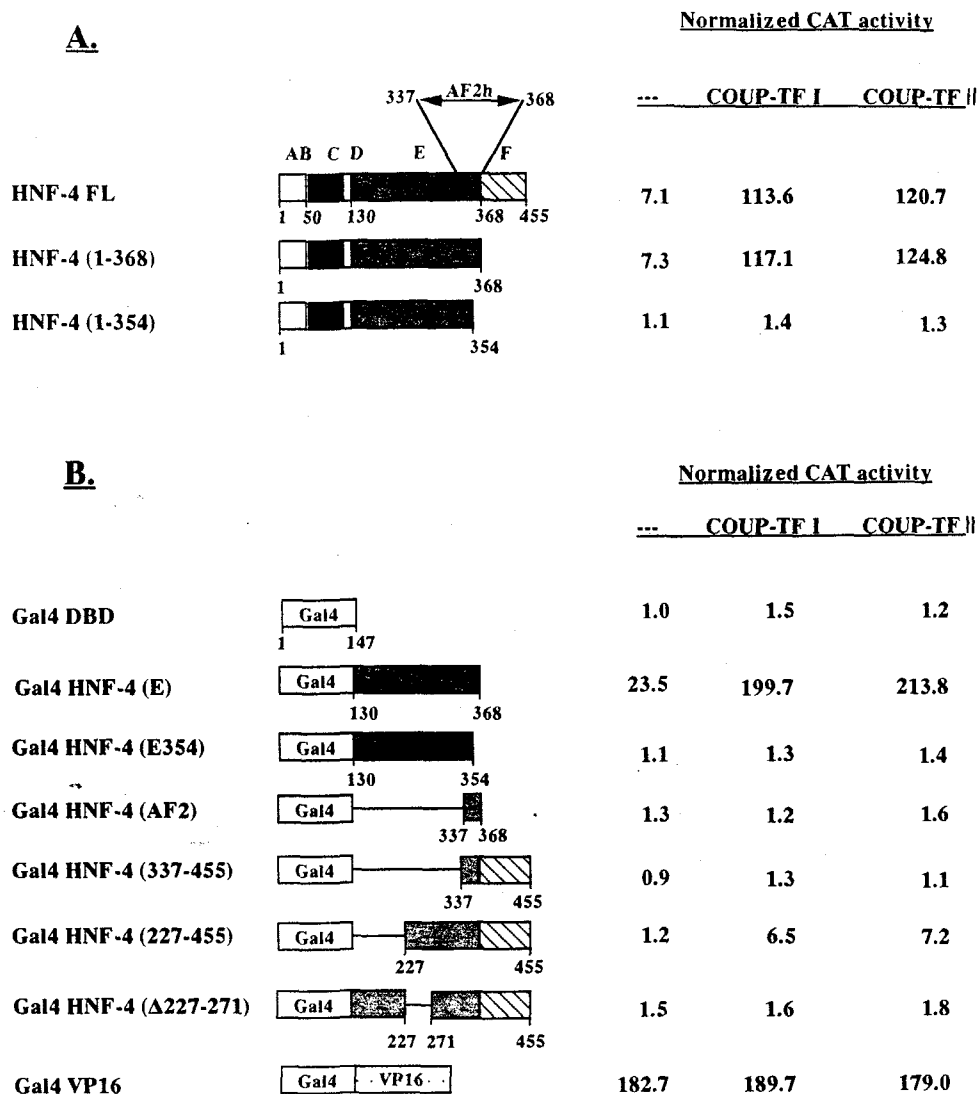


FIG. 4. Requirement of the intact E region of HNF-4 for COUP-TF-mediated enhancement. (A) Cos-1 cells were cotransfected with 2 μ g of a "1 \times A"TK-CAT reporter together with 0.5 μ g of a pMT vector expressing the indicated HNF-4 deletion mutant and COUP-TFI or COUP-TFII. The N-terminal AB region, the Zn finger DNA binding domain (C), the hinge region (D), the ligand-binding-dimerization domain (E), and the carboxy-terminal region (F) of the HNF-4 protein are depicted by different shadings. (B) Cos-1 cells were cotransfected with 2 μ g of a G4-CAT reporter together with 0.5 μ g of the indicated Gal4 fusion construct and pMT-COUP-TFI or pMT-COUP-TFII. The values are mean normalized CAT activities, with standard deviations of less than 10%, from at least five independent experiments. A value of 1.0 corresponds to the activity obtained by cotransfection of an empty pMT2 vector. DBD, DNA binding domain.

previous studies defining HNF-4 as a factor that forms exclusively homodimers (19).

In vivo and in vitro interactions of COUP-TFs with HNF-4. Although we could not detect in vitro heterodimerization or protein-protein interaction between HNF-4 and COUP-TFs by EMSAs, potential weak interactions that do not survive the electrophoretic conditions used cannot be ruled out as an explanation for the observation that COUP-TFI and COUP-TFII enhanced HNF-4-mediated activation of the promoters containing *cis*-acting elements exclusively binding HNF-4. To test this possibility, we attempted to map the HNF-4 protein domains necessary for COUP-TF-mediated enhancement by using truncated mutant forms of HNF-4. COUP-TFs enhanced activation mediated by HNF-4 (1-368), a mutant construct lacking the C-terminal F region, to the same levels as wild-type HNF-4. This construct includes a 30-aa sequence (between aa 337 and 368) highly homologous to the AF2 (activation func-

tion 2) region of other hormone receptors (1, 14) and named AF2h (AF2 homolog). Deletion of part of the AF2h domain [HNF-4 (1-354)] resulted in loss of activity and COUP-TF enhancement (Fig. 4A). Further deletions resulted in loss of dimerization and, consequently, DNA binding and were unaffected by COUP-TFs (data not shown). These results indicate that enhancement of HNF-4 activity by COUP-TFs requires an intact AF2h-region-containing HNF-4 protein. Next, we investigated the effects of COUP-TFs on chimeric protein constructs containing dissected parts of HNF-4 fused to the DNA binding domain of the yeast Gal4 protein. These chimeras bind to the Gal4 response element as dimers through the Gal4 DNA binding domain (4), and their expression levels are not affected by COUP-TFs (data not shown), eliminating complications arising from altered dimerization and DNA binding activity. As shown in Fig. 4B, Gal4 HNF-4 (E), containing the complete E domain of HNF-4, is a potent activator of the

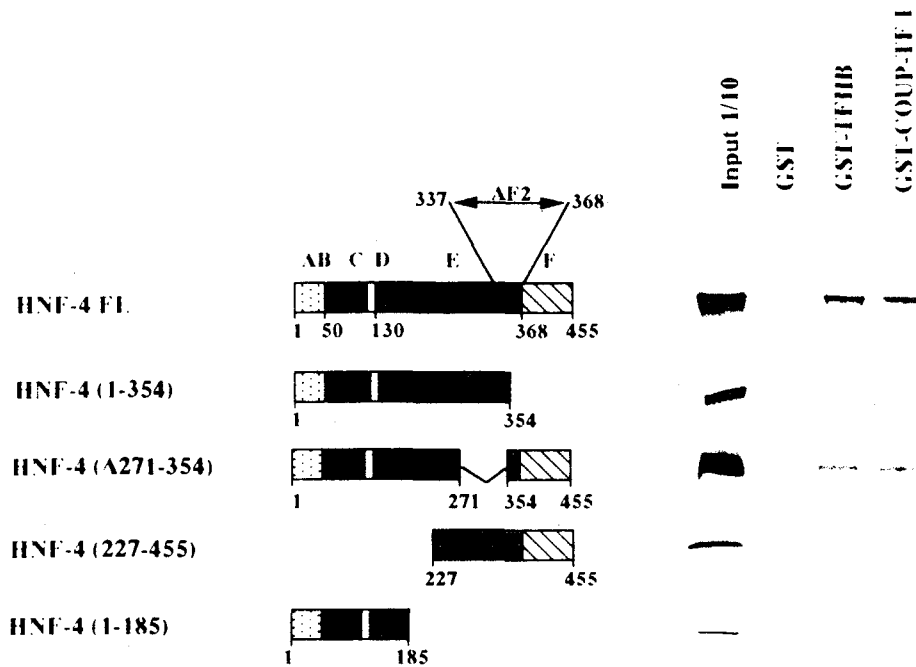


FIG. 5. In vitro interaction of wild-type HNF-4 and mutant HNF-4 derivatives with COUP-TFI and TFIIB. The ^{35}S -labeled HNF-4 proteins on the left were produced by in vitro translation and incubated with bacterially expressed GST fusion proteins bound to glutathione-Sepharose beads. The beads were washed extensively, and specific interactions were assessed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The input lanes represent 10% of the total in vitro-translated proteins used in the binding reaction, except in case of HNF-4 (1-185), where 20% of the input is shown.

Gal4-responsive reporter (G4-CAT), and this activation was enhanced by COUP-TFI and COUP-TFII 8.5- and 9-fold respectively. Deletion of either the distal [Gal4 HNF-4 (E354)] or the proximal [Gal4 HNF-4 (AF2h), Gal4 HNF-4 (337-455), Gal4 HNF-4 (227-455), or Gal4 HNF-4 (Δ 221-271)] part of the E domain abolished transcriptional activity. Superactivation by COUP-TFs was observed only when all or the aa 227 to 368 part of the E domain was present in the chimeras, but not with other mutants or Gal4 VP16, which was used as an unrelated control (Fig. 4B). These data indicate that the AF2h domain of HNF-4 can function only in the context of the intact E domain and that COUP-TF-mediated superactivation may involve protein-protein interactions between COUP-TFs and the aa 227 to 271 region of HNF-4. In vitro evidence of such interactions was provided by pull-down experiments employing a GST-COUP-TFI fusion protein and ^{35}S -labeled HNF-4 derivatives. As shown in Fig. 5, appreciable binding of full-length HNF-4 to GST-COUP-TFI could be detected. The amount of bound protein recovered in this assay was comparable to the amount recovered by GST-TFIIB, which was used as a control. Interestingly, HNF-4 (1-354) and HNF-4 (Δ 271-354), which lack different parts of the AF2 domain, could interact with both COUP-TFI and TFIIB while some of the N-terminally truncated HNF-4 (227-455) could be recovered by the GST-COUP-TFI, but not by the GST-TFIIB, column. On the other hand, interaction with TFIIB, but not with COUP-TFI, was observed when HNF-4 (1-185) containing the N-terminal part of the protein was tested (Fig. 5). Direct interactions between HNF-4 and COUP-TFs in intact cells were determined by nuclear cotranslocation assays with a mutant form of HNF-4 [HNF-4 (227-455)] that lacks specific nuclear localization signals but contains the domain required for in vitro interaction with COUP-TFs. This mutant was detected by in situ immunofluorescence exclusively in the cytoplasm of transfected Cos-1 cells (Fig. 6A). Coexpression of either COUP-TFI or

COUP-TFII, but not the full-length Gal4-800 protein, resulted in translocation of the cytoplasmic mutant form of HNF-4 to the nucleus, demonstrating HNF-4-COUP-TF interaction in vivo (Fig. 6). Taken together, the above results indicate that COUP-TFs interact with the HNF-4 protein outside the AF2h domain, somewhere between aa 227 and 271 of the E domain. For superactivation, the intact AF2h domain of HNF-4 is also required.

COUP-TFs enhance HNF-4-mediated transcription in HepG2 and Caco2 cells but not in C33 cells. The biological importance of the above observations prompted us to reexamine the effects of COUP-TFs in cell lines of hepatic (HepG2) and intestinal (Caco2) origin which express both HNF-4 and COUP-TFs. As shown in Fig. 7, COUP-TFI and COUP-TFII enhanced the activation obtained by the Gal4 HNF-4 (E) fusion protein in both cell types. The extent of activation was 3.7- to 3.9-fold in HepG2 cells and 4.3- to 5.1-fold in subconfluent Caco2 cells, significantly lower than that observed in Cos-1 cells. This difference should be due to the high concentrations of endogenous COUP-TFs in these cell lines (35), suggesting that the values obtained with Gal4 HNF-4 (E) alone represent an already superactivated state. Surprisingly, COUP-TFI and COUP-TFII did not enhance Gal4 HNF4 (E)-mediated activation of the Gal4 reporter (G4-CAT) in the human epithelial carcinoma-derived C33 cell line, although they were able to inhibit HNF-4-activated apoC-III activity (Fig. 7 and data not shown). This finding suggests that for cofactor function, either an additional factor(s) or an intracellular ligand(s) that is missing from C33 cells may be required.

DISCUSSION

Early studies describing promoter context-dependent activities and transcriptional cross-interference effects for the AFs of different hormone receptors raised the concept that these

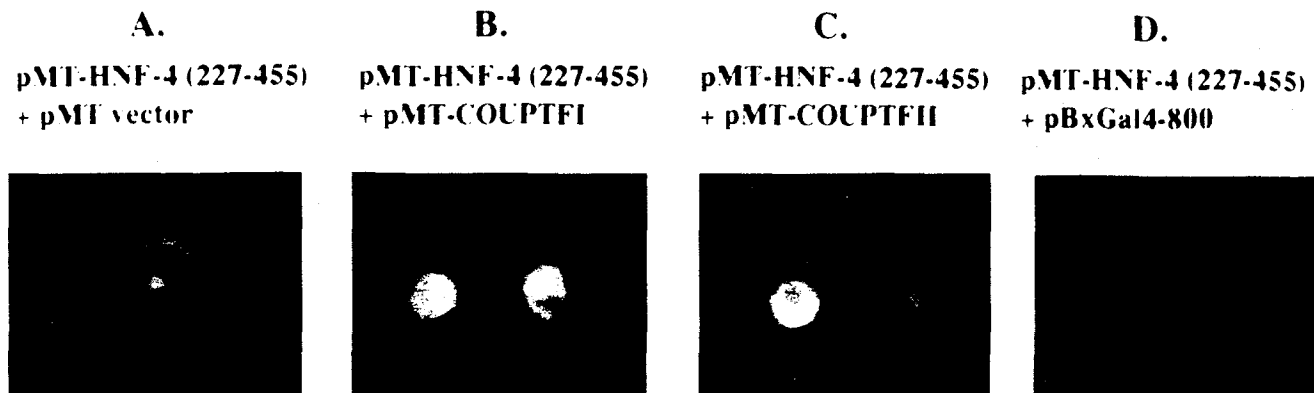


FIG. 6. Interaction of HNF-4 with COUP-TFI and COUP-TFII in intact cells. Cos-1 cells were transfected with 500 ng of nuclear localization signal-deficient mutant HNF-4 (271-455) alone (A) or together with 1 μ g of a COUP-TFI (B) or COUP-TFII (C) expression vector, transferred to coverslips, and stained with a polyclonal peptide antibody raised against the C-terminal 11-aa epitope of HNF-4. Cotransfection with Gal4-800 was used as an unrelated control (D). Immunofluorescence images are shown at a magnification of about $\times 316$.

proteins may interact with transcriptional intermediary factors (TIFs) distinct from the basal transcription factors (1, 5, 14). Several such mediators have since been identified, including RIP140 (6), TIF1 (28), TIF2 (51), SRC-1 (36), TRUP (2), N-CoR (17), and SMRT (8), which positively or negatively modulate the activities of specific hormone receptors via protein-protein interactions. Here we show that two known orphan receptors, COUP-TFI and COUP-TFII, function as transcriptional intermediary cofactors for HNF-4, another orphan member of the hormone receptor superfamily. Our results suggest that COUP-TFs do not form heterodimers with HNF-4 on DNA. On the other hand, we provide *in vitro* and *in vivo* evidence that COUP-TFI and COUP-TFII interact with HNF-4 homodimers in either a homologous or a heterologous context. This interaction occurs in promoters that are recognized by HNF-4 but not by COUP-TFs (such as the HNF-1 promoter) and results in dramatic enhancement of HNF-4-mediated activation. We have mapped the COUP-TF interaction domain of HNF-4 to the E region of the molecule, between aa 227 and 271, outside the main activation domain of HNF-4 situated between aa 337 and 368, which contains a sequence motif highly homologous to the AF2 region of other hormone receptors (1, 14). Unlike the AF2 domains of RXR, RaR, and TR, the corresponding region of HNF-4 (named AF2h) does not exhibit an autonomous activation function when fused to the DNA binding domain of Gal4, although it

can adopt a similar amphipathic α -helical conformation. This finding implies that, functionally, the HNF-4 AF2h region may represent a new subclass of activation domains defined by the requirement of an intact E region for activity. This is rather interesting, because the E regions of the classical hormone receptors have been found to confer ligand dependency on the AF2 domain, while HNF-4 does not require a ligand to function (31). Mutations disrupting the AF2h region abrogated both HNF-4 activity and COUP-TF-mediated enhancement, showing that even the enhanced transcription rate was absolutely dependent on AF2h. This finding argues against a mechanism presuming a classical coactivator function of COUP-TFs, which by definition should exhibit transcriptional activation when the coactivator itself is tethered to the promoter via interaction with another protein. COUP-TFs are unable to activate transcription not only when recruited to the promoter through interaction with mutant HNF-4 proteins disrupted in the AF2 region but also when they are brought in by fusion to the Gal4 DNA binding domain or allosteric interaction with RXR or TR (5, 29). In fact, in both of the latter cases, COUP-TFs exhibit a transcriptional repression effect. The possibility of increased DNA binding of HNF-4 when complexed with COUP-TFs as a potential mechanism can also be ruled out, since COUP-TFs efficiently enhanced transcription driven by the Gal-4 HNF-4 (E) fusion protein. In addition, we have not observed increased binding or any change in the *in vitro* association and dissociation kinetics or the affinity of HNF-4 to site A when extracts from Cos-1 cells coexpressing HNF-4 and COUP-TFs were analyzed or by mixing individual factor-containing extracts in the binding assays (data not shown). A more intriguing possibility is that COUP-TFs might function as "bridging factors" between the E region of HNF-4 and another component(s) of the core transcription machinery, facilitating or stabilizing the formation of the preinitiation complex. A good candidate for the downstream partner is TFIIB, since both HNF-4 and COUP-TFs can physically interact with this factor (31, 32). Although we were unable to detect increased *in vitro* interaction of HNF-4 with TFIIB in the presence of COUP-TFI (data not shown), we cannot exclude the possibility that, *in vivo*, this type of stabilization may occur. A further complication of this idea arises when one considers the results obtained with Gal4 HNF-4 (E) and Gal4 HNF4 (227-455). Both of these constructs lack the TFIIB binding domain of HNF4; nevertheless, their activity was enhanced by COUP-TFs. The possibility that, in the HNF-4 context,

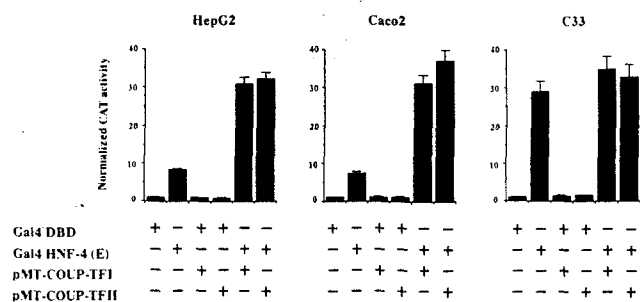


FIG. 7. Enhancement of HNF-4 activation by COUP-TFs in HepG2 and Caco2, but not in C33, cells. HepG2, Caco2, and C33 cells were transfected with 2 μ g of a Gal4-CAT reporter together with 0.5 μ g of the indicated expression vectors. The columns and error bars represent mean values and standard deviations of β -galactosidase-normalized CAT activity from at least three independent experiments. Due to the different transfection efficiencies, the absolute activity values can be compared only within one cell line.

COUP-TFs may acquire a configuration that induces a productive conformation state of TFIIB also seems unlikely, since the enhancing effect was strictly dependent on the AF2h domain. Furthermore, direct interactions of COUP-TFs with TFIIB, and the subsequent freezing of the preinitiation complex in an inactive state, have been speculated to be a potential mechanism for their repressor function (29). The above considerations led us to propose a model for COUP-TF-mediated enhancement of HNF-4 activity that involves a conformational change of the HNF-4 protein induced by COUP-TF binding to its E region. According to this model, HNF-4 adopts a suboptimal configuration of its activation surface when bound to DNA. Associations with COUP-TFs lead to a more efficient orientation of the HNF-4 AF2h domain to facilitate the entry of other components of the preinitiation complex. These components may be either coactivators that transduce the AF2 activity to the transcription machinery (e.g., TIF2) or general transcription factors which enter the preinitiation complex downstream of TFIIB, since TFIIB and COUP-TFs can interact with HNF-4 independently on domains distinct from AF2h. In this respect, it is interesting that COUP-TFs did not enhance HNF-4-mediated activation in all cell types. Our failure to detect the enhancing effect in C33 cells may reflect the requirement of an additional cofactor(s) that interacts either with COUP-TFs or the HNF-4 AF2h domain and is missing from this cell line. An alternative but not mutually exclusive possibility is that for the activation function, COUP-TFs require an unidentified, cell type-specific intracellular ligand or a posttranslational modification such as phosphorylation.

Although COUP-TFs have been shown to possess an intrinsic transcriptional activation potential and have been implicated as activators of some genes (18, 32, 42), the findings presented in this work are rather unexpected, since COUP-TFs are known to repress the activities of other hormone receptors, including RXR, RAR, T3R, PPAR, and ER (10, 11). More importantly, COUP-TFs were shown to be strong repressors of all of the HNF-4-dependent promoters studied so far (43). The main mechanism by which COUP-TFs repress transcription involves competition of COUP-TF homodimers with HNF-4 and other hormone receptors for a common binding site (35). However, recent studies indicated that in RXR and TR, other mechanisms, such as transrepression, may also be involved (29). The diverse effects of COUP-TFs on different genes suggest that they represent a multifunctional transcription factor family with highly important biological roles. They inhibit transcription driven by a wide range of hormone receptor (including HNF-4)-dependent promoters through promiscuous binding to their DR1 to DR5 elements, while they activate another set of HNF-4-dependent promoters which they do not recognize directly. Our finding that HNF-1, another important liver-enriched transcription factor which regulates a different set of genes (50), belongs to this second class adds a new dimension to the complexity of the network involved in liver-specific gene expression. HNF-4 has been postulated to be at the top of the hierarchy of transcriptional factors involved in the specification of the hepatic phenotype (16, 24). However, other events or factors may also play important roles in the initial activation of this cascade, such as the activin A signaling pathway, which was shown to induce HNF-4 activity during early *Xenopus* development (53), possibly by triggering phosphorylation of HNF-4, which is important for its transcriptional activity (22). Our results suggest that COUP-TFs may also participate in the initial activation of the transcriptional cascade responsible for hepatic differentiation by the enhancement of HNF-1 expression. Consistent with this idea is the parallel appearance of COUP-TFs and HNF-1 during early endodermal differentia-

tion (7). In mouse embryos, both HNF-1 and COUP-TFs can first be detected at 8.5 days and reach maximum levels at 14 to 15 days postconception (7), much later than the initial appearance of HNF-4 (4.5 to 5.5 days postconception) (13). In addition, it was recently shown that COUP-TFs positively regulate the expression of variant HNF-1 (also called LFB3) (37), a factor thought to be involved in the early differentiation stages of polarized epithelial cells of endodermal and mesodermal origin, such as those of the liver, kidneys, and digestive tract (12, 27, 50). COUP-TFs activate variant HNF-1 promoter activity by an indirect mechanism via octamer factor binding sites (37), suggesting that besides their DNA binding properties, their ability to interact with other proteins is also highly promiscuous. Taking these findings into consideration, together with the potential role of COUP-TFs during neural development (38), it is tempting to speculate that COUP-TFs may function as global regulators in the early differentiation processes of all three germ layers.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to S. Cereghini for providing the C33 cell line, D. Thanos for pGex-TFIIB, and I. Papamatheakis and D. Tzamaris for plasmids and helpful discussions during the course of this study.

This work was supported by a Greek General Secretary for Science and Technology grant (PENED 2018) and internal IMBB funds.

REFERENCES

1. Baretino, D., M. V. Ruiz, and H. Stunnenberg. 1994. Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of the thyroid hormone receptor. *EMBO J.* **13**:3039-3049.
2. Burris, T., Z. Nawaz, M.-J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1995. A nuclear hormone receptor-associated protein that inhibits transactivation by the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9525-9529.
3. Butler, A. J., and M. G. Parker. 1995. COUP-TF II homodimers are formed in preference to heterodimers with RXR α or TR β in intact cells. *Nucleic Acids Res.* **23**:4143-4150.
4. Carey, M. F., H. Kakidani, J. Leatherwood, F. Mostashari, and M. Ptashne. 1989. An amino-terminal fragment of Gal-4 binds DNA as a dimer. *J. Mol. Biol.* **209**:423-432.
5. Casanova, J., E. Helmer, S. Selmi-Ruby, J.-S. Qi, M. Au-Fliegner, V. Desai-Yajnik, N. Koudinova, F. Yarm, B. M. Raaka, and H. H. Samuels. 1994. Functional evidence for ligand dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor. *Mol. Cell. Biol.* **14**:5756-5765.
6. Cavailles, V., S. Dauvois, F. L'Horsset, G. Lopez, S. Hoare, P. J. Kushner, and M. G. Parker. 1995. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* **14**:3741-3751.
7. Cereghini, S., M.-O. Ott, S. Power, and M. Maury. 1992. Expression patterns of vHNF-1 and HNF-1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development* **116**:783-797.
8. Chen, J. D., and R. M. Evans. 1995. A transcriptional corepressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**:454-457.
9. Chen, W. S., K. Manova, D. C. Weinstein, S. A. Duncan, A. S. Plump, V. R. Prezioso, R. F. Bacharova, and J. E. Darnell, Jr. 1994. Disruption of the HNF-4 gene expressed in visceral endoderm leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* **8**:2466-2477.
10. Conneely, J. D., and B. W. O'Malley. 1994. Orphan receptors: structure and function relationships, p. 111-133. *In* M.-L. Tsai and B. O'Malley (ed.), *Mechanisms of steroid hormone regulation of gene transcription*. R. G. Landes Co., Austin, Tex.
11. Cooney, A. J., S. Y. Tsai, B. W. O'Malley, and M.-J. Tsai. 1992. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4153-4163.
12. De Simone, V., L. De Magistris, D. Lazzaro, J. Gerstner, P. Monaci, A. Nicosia, and R. Cortese. 1991. LFB3, a heterodimer forming homeoprotein of LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J.* **10**:1435-1443.
13. Duncan, S. A., K. Manova, W. S. Chen, P. Hoodless, D. C. Weinstein, R. F. Bacharova, and J. E. Darnell, Jr. 1994. Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the

- implanting blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:7598-7602.
14. Durand, B., M. Saunders, C. Gaudon, B. Roy, R. Losson, and P. Chambon. 1994. Activation function 2 (AF2) of retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF2 activity. *EMBO J.* **13**:5370-5382.
 15. Edlund, T., M. D. Walker, P. J. Barr, and W. J. Rutter. 1985. Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for the role of two distinct 5' flanking elements. *Science* **230**:912-916.
 16. Holewa, B., E. P. Strandmann, D. Zapp, P. Lorenz, and G. U. Ryffel. 1995. Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF4, a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 α (LFB1). *Mech. Dev.* **54**:45-57.
 17. Horlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzel, J. Torchial, B. Gloss, R. Kurokava, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**:397-404.
 18. Hwang, Y.-P., D. T. Crowe, L.-H. Wang, S. Y. Tsai, and M.-J. Tsai. 1988. The COUP transcription factor binds to an upstream promoter element of the rat insulin II gene. *Mol. Cell. Biol.* **8**:2070-2077.
 19. Jiang, G., L. Nepomuceno, K. Hopkins, and F. M. Sladek. 1995. Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**:5131-5143.
 20. Kastner, P., M. Mark, and P. Chambon. 1995. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**:859-869.
 21. Kritis, A. A., E. Ktistaki, D. Barda, V. I. Zannis, and I. Talianidis. 1993. An indirect negative autoregulatory mechanism involved in hepatocyte nuclear factor-1 gene expression. *Nucleic Acids Res.* **21**:5882-5889.
 22. Ktistaki, E., N. T. Ktistakis, E. Papadogeorgaki, and I. Talianidis. 1995. Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:9876-9880.
 23. Ktistaki, E., J.-M. Lacorte, N. Katrakili, V. I. Zannis, and I. Talianidis. 1994. Transcriptional regulation of the apolipoprotein AIV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein C-III gene. *Nucleic Acids Res.* **22**:4689-4696.
 24. Kuo, C. J., P. B. Conley, L. Chen, F. M. Sladek, J. E. Darnell, Jr., and G. R. Crabtree. 1992. A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* **355**:457-461.
 25. Ladias, J. A. A., M. Cladaras-Hadzopoulou, D. Kardassis, P. Cardot, J. Cheng, V. I. Zannis, and C. Cladaras. 1992. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J. Biol. Chem.* **267**:15849-15860.
 26. Ladias, J. A. A., and S. K. Karathanasis. 1991. Regulation of apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science* **251**:561-565.
 27. Lazzaro, D., V. DeSimone, L. DeMagistris, E. Lehtonen, and R. Cortese. 1992. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. *Development* **114**:469-479.
 28. LeDouarin, B., C. Zechel, J.-M. Garnier, Y. Lutz, L. Tora, B. Pierrat, D. Heery, H. Gronemeyer, P. Chambon, and R. Losson. 1995. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* **14**:2020-2033.
 29. Leng, X., A. J. Cooney, S. Y. Tsai, and M.-J. Tsai. 1996. Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transcription and active repression. *Mol. Cell. Biol.* **16**:2332-2340.
 30. Liu, Y., N. Yang, and C. T. Teng. 1993. COUP-TF acts as a competitive repressor for estrogen receptor-mediated activation of the mouse lactoferrin gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**:1836-1846.
 31. Malik, S., and S. K. Karathanasis. 1996. TFIIIB-directed transcriptional activation by the orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol. Cell. Biol.* **16**:1824-1831.
 32. Malik, S., and S. K. Karathanasis. 1995. Transcriptional activation by the orphan nuclear receptor ARP-1. *Nucleic Acids Res.* **23**:1536-1543.
 33. Mangelsdorf, D. J., and R. M. Evans. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**:841-850.
 34. Mangelsdorf, D. J., C. Thymmel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umehono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R. M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**:835-839.
 35. Mietus-Snyder, M., F. M. Sladek, G. S. Ginsburg, C. K. Kuo, J. A. A. Ladias, J. E. Darnell, Jr., and S. K. Karathanasis. 1992. Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**:1708-1718.
 36. Onate, S. A., S. Y. Tsai, M.-J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**:1354-1357.
 37. Power, S. C., and S. Cereghini. 1996. Positive regulation of the vHNF1 promoter by the orphan receptors COUP-TFI/Ear3 and COUP-TFII/Arp1. *Mol. Cell. Biol.* **16**:778-791.
 38. Qiu, Y., A. J. Cooney, S. Kuratani, F. J. DeMayo, S. Y. Tsai, and M.-J. Tsai. 1994. Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4451-4455.
 39. Qiu, Y., S. Y. Tsai, and M.-J. Tsai. 1994. COUP-TF: an orphan member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily. *Trends Endocrinol. Metab.* **5**:234-239.
 40. Sadowski, I. L., J. Ma, S. Triezenberg, and M. Ptashne. 1988. Gal4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**:563-564.
 41. Sadowski, I. L., and M. Ptashne. 1989. A vector for expressing Gal-(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **17**:7539.
 42. Sagami, I., S. Y. Tsai, H. Wang, M.-J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1986. Identification of two factors required for transcription of the ovalbumin gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**:4259-4267.
 43. Sladek, F. M. 1994. Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4), p. 127-142. *In* F. Tronche and M. Yaniv (ed.), *Transcriptional regulation of liver specific genes*. R. G. Landes Co., Austin, Tex.
 44. Sladek, F. M., W. Zhong, E. Lai, and J. E. Darnell, Jr. 1990. Liver enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* **4**:2353-2365.
 45. Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988. Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**:31-40.
 46. Talianidis, I., A. Tambakaki, I. Toursounova, and V. I. Zannis. 1995. Complex interactions between SP1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human apoCIII gene. *Biochemistry* **34**:10298-10309.
 47. Taraviras, S., P. Monaghan, G. Schutz, and G. Kelsey. 1994. Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* **48**:67-79.
 48. Tian, H.-M., and U. Schibler. 1991. Tissue specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev.* **5**:2225-2234.
 49. Tran, P., X.-K. Zhang, G. Salbert, T. Hermann, M. J. Lehmann, and M. Pfahl. 1992. COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4666-4676.
 50. Tronche, F., I. Bach, T. Chuard, B. David-Wattine, M. Pontoglio, F. Ringeisen, D. Surdive, D. Thepot, and M. Yaniv. 1994. Hepatocyte nuclear factor 1 (HNF1) and liver gene expression, p. 99-113. *In* F. Tronche and M. Yaniv (ed.), *Transcriptional regulation of liver specific genes*. R. G. Landes Co., Austin, Tex.
 51. Voegel, J. J., M. J. S. Heine, C. Zechel, P. Chambon, and H. Gronemeyer. 1996. TIF2, a 160kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* **15**:3667-3675.
 52. Wang, L. H., S. Y. Tsai, R. G. Cook, W. G. Beattie, M.-J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1989. COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature* **340**:163-166.
 53. Weber, H., B. Holewa, E. A. Jones, and G. U. Ryffel. 1996. Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: identification of the HNF4 binding site as an activin A responsive element in the *Xenopus* HNF1 α promoter. *Development* **122**:1975-1984.
 54. Zhong, W., F. M. Sladek, and J. E. Darnell, Jr. 1993. The expression pattern of drosophila homologue to the mouse transcription factor HNF4 suggests a determinative role in gut formation. *EMBO J.* **12**:537-544.

Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential

LENI KTISTAKI*, NICHOLAS T. KTISTAKIS†‡, EVA PAPADOGEORGAKI†, AND IANNIS TALIANIDIS*§

*Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology, P.O. Box 1527, 711 10 Herakleion Crete, Greece; †Department of Biology, University of Crete, Herakleion Crete, Greece; and ‡Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, 23 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75235-9038

Communicated by Fotis C. Kafatos, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany, July 3, 1995 (received for review May 2, 1995)

ABSTRACT Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) is a prominent member of the family of liver-enriched transcription factors, playing a role in the expression of a large number of liver-specific genes. We report here that HNF-4 is a phosphoprotein and that phosphorylation at tyrosine residue(s) is important for its DNA-binding activity and, consequently, for its transactivation potential both in cell-free systems and in cultured cells. Tyrosine phosphorylation did not affect the transport of HNF-4 from the cytoplasm to the nucleus but had a dramatic effect on its subnuclear localization. HNF-4 was concentrated in distinct nuclear compartments, as evidenced by *in situ* immunofluorescence and electron microscopy. This compartmentalization disappeared when tyrosine phosphorylation was inhibited by genistein. The correlation between the intranuclear distribution of HNF-4 and its ability to activate endogenous target genes demonstrates a phosphorylation signal-dependent pathway in the regulation of transcription factor activity.

Control of gene expression at the level of transcription is a predominant mechanism for the activation of tissue-specific transcription factors. Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) is one such transcription factor with limited tissue distribution which was thought to be regulated mainly at the transcriptional level (1, 2). HNF-4 can activate transcription in several non-patent cell lines, indicating that no liver-specific modification is required for its function (3). On the other hand, the apparent contradiction between the molecular mass of HNF-4 predicted from the primary sequence (50.6 kDa) (3) and that determined by gel electrophoresis (54 kDa) suggests that this difference may be due to posttranslational modification(s). Of the many types of posttranslational modifications that might regulate gene expression, most attention has been focused on phosphorylation, which can influence transcription factor activity in many ways (4). Three main levels of regulation have been described: phosphorylation can affect the DNA-binding activity (5–7), the transcriptional activation potential (8, 9), or the translocation of a transcription factor from the cytoplasm into the nucleus (10–13). These possibilities are by no means mutually exclusive, and in principle phosphorylation can be responsible for simultaneous regulation at several distinct levels. With the exception of certain signal transduction proteins (14), all examples of this type of regulation have involved phosphorylation at serine or threonine residues. Here we demonstrate that the activity of HNF-4 is post-translationally regulated by tyrosine phosphorylation, providing an example of a non-signal-transduction factor modulated by this modification. The HNF-4 polypeptide contains 12 tyrosine residues scattered throughout the DNA-binding, dimerization, and putative ligand-binding domains (3) which

could be potential phosphorylation sites. We did not attempt to determine the exact location of the phosphorylated tyrosine residue(s), but we present evidence that tyrosine phosphorylation of HNF-4 is required for its DNA-binding activity. We show that the transcriptionally active form of HNF-4 is localized in specific subnuclear domains. This intranuclear distribution depends directly or indirectly on tyrosine phosphorylation, suggesting the existence of an additional control mechanism at the level of subnuclear targeting playing a role in transcription regulation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Transfection. Monolayer cultures of HepG2 and COS-1 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Twenty-four hours before transfection the cells were seeded at 50–60% confluency. For chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays the cells were transfected by the calcium phosphate coprecipitation method and assayed as described (15–17). For all other experiments COS-1 cells at 50–60% confluency were incubated with 10 μ g (60-mm dishes) or 2.5 μ g (coverslips) of DNA in DMEM/10 mM Hepes, pH 7.2/0.025% DEAE-dextran for 1.5 hr at 37°C. The DNA was removed, and the cells were treated with 0.1 mM chloroquine in DMEM/10% fetal bovine serum for 5 hr. The cells were washed with DMEM/10 mM Hepes, pH 7.2, and grown in DMEM/10% fetal bovine serum for 48 hr before harvest.

Metabolic Labeling and Protein Analysis. Monolayer cultures of HepG2 and transfected COS-1 cells were incubated with [³²P]orthophosphate (1 mCi/ml; 1 mCi = 37 MBq) or [³⁵S]methionine (0.5 mCi/ml) for 2 hr in phosphate-free or methionine-free DMEM with or without genistein (Upstate Biotechnology) at 15 μ g/ml. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in 50 mM Tris, pH 7.5/150 mM NaCl/1 mM EDTA/0.5% Nonidet P-40/10% glycerol/1 mM Na₃VO₄/1 mM NaF/0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride with aprotinin at 10 μ g/ml. After a preclearing step with protein A-Sepharose (Pharmacia), HNF-4 was immunoprecipitated with anti-HNF-4 (0.5 μ l per sample), separated by SDS/10% PAGE, and visualized by autoradiography. In parallel, cell lysates from unlabeled cultures were processed as above, and after SDS/PAGE, proteins were electroblotted to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell) and probed with 0.5 μ g/ml horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine (PY20; ICN). Antibody was detected by enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham). Nuclear extracts were prepared and electrophoretic mobility-shift assays were performed as described (15, 16).

‡Publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Abbreviations: CAT, chloramphenicol acetyltransferase; HNF, hepatocyte nuclear factor.

§To whom reprint requests should be addressed.

Immunolocalization Assays. For indirect immunofluorescence assays, cells on coverslips were washed twice with PBS and fixed for 10 min at -20°C with methanol. After fixation the coverslips were washed once with PBS and incubated with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA/PBS) for 30 min at room temperature. Antibodies were diluted 1:200 in BSA/PBS and applied to the cells for 45 min. After washing with BSA/PBS for 15 min the cells were incubated with diluted (1:100) fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies to IgG (Pierce) for 30 min at room temperature. The coverslips were washed with BSA/PBS for 15 min, rinsed in water, mounted on glass slides with Mowiol (Polyscience), and observed in a Leitz Dialux 20 EB microscope equipped with epifluorescence optics.

For electron microscopy, pellets from 5×10^7 untreated and genistein-treated HepG2 cells were fixed in 4% formaldehyde/0.5% glutaraldehyde for 1 hr and embedded in LR White resin (Polyscience) for 24 hr at 50°C without accelerator. Thin sections (≈ 50 nm) were deposited on copper grids and incubated overnight at 4°C with anti-HNF-4 diluted at 1:1000 in BSA/PBS. After extensive washing, the samples were stained with diluted (1:10) gold-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (particle size: 10 nm or 20 nm) at room temperature for 1 hr. After washing, the samples were stained with 1% uranyl acetate for 10 min and observed in a JEOL 100C electron microscope operated at 100 kV.

RESULTS AND DISCUSSION

To examine whether HNF-4 is phosphorylated, lysates from [^{32}P]orthophosphate-labeled HepG2 and HNF-4-transfected COS-1 cells were immunoprecipitated with HNF-4-specific antiserum (3). A 54-kDa labeled protein band was readily detected by this antibody, indicating that both endogenous HNF-4 (HepG2) and transiently expressed HNF-4 (COS-1) were phosphorylated (Fig. 1 *A* and *B*). When the cells were treated with genistein, a specific protein-tyrosine kinase inhibitor (18), a ^{32}P -labeled protein band with decreased intensity and slightly faster mobility was observed, suggesting that at least in part HNF-4 may be phosphorylated at tyrosine residue(s) (Fig. 1 *A* and *B*). To test this hypothesis, HNF-4 was immunoprecipitated from extracts of HepG2 and transfected COS-1 cells that had been treated with genistein or left untreated, and Western blots of the immunoprecipitates were probed with a monoclonal antibody to phosphotyrosine. A 54-kDa tyrosine-phosphorylated protein band corresponding to HNF-4 was observed in the extracts from the untreated cells but not in the extracts from the genistein-treated cells (Fig. 1*C*). Metabolic labeling with [^{35}S]methionine showed that genistein did not influence the expression and/or intracellular stability of HNF-4 (Fig. 1 *A* and *B*), suggesting that the decrease in ^{32}P and phosphotyrosine signal was solely due to selective inhibition of tyrosine phosphorylation.

To evaluate the role of tyrosine phosphorylation in the modulation of HNF-4 activity, we first examined whether its DNA-binding potential was affected. Nuclear extracts from HepG2 and HNF-4-transfected COS-1 cells were prepared and analyzed in electrophoretic mobility-shift experiments using a specific HNF-4 binding site as a probe (site A; refs. 15 and 16). Nuclear extracts from genistein-treated cells had a very low binding activity when compared with extracts from untreated cells (Fig. 2*A*), suggesting that tyrosine phosphorylation is required for DNA binding. This result was not due to a toxic effect(s) of the drug, since removal of genistein from the culture restored HNF-4 binding activity within 24 hr (Fig. 2*A*). *In vitro* evidence for the direct involvement of tyrosine phosphorylation in DNA binding was obtained by treatment of nuclear extracts with purified protein-tyrosine-phosphatase 1B. This treatment reduced the DNA-binding activity of HNF-4, and the effect was largely reversed by inclusion of the specific protein-tyrosine-phosphatase inhibitor Na_3VO_4 in the binding reaction mixture (Fig. 2*B*). The presence of phosphotyrosine in the DNA-binding form of HNF-4 was further confirmed when incubation with anti-phosphotyrosine antibodies specifically interfered with the formation of the HNF-4/DNA complex (Fig. 2*C*). Since DNA binding is a prerequisite step for transcription activation by HNF-4, we examined how tyrosine phosphorylation affects its activity in living cells. HepG2 and COS-1 cells were transiently transfected with a construct containing four copies of HNF-4 binding site A fused to the -85 -nt thymidine kinase minimal promoter (16). Treatment of the cells with genistein decreased transcription activation by the endogenous (HepG2) and the expression vector-derived (COS-1) HNF-4 to 20% and 7% of control (Fig. 3 *A* and *B*). This inhibition was reversed upon removal of the drug, arguing against toxicity as an explanation. In addition, genistein treatment did not significantly influence transcription driven by the Rous sarcoma virus promoter, demonstrating that the cellular transcription apparatus was fully active under our experimental conditions (Fig. 3 *A* and *B*). We also examined the activation of the endogenous HNF-1 gene, whose transcription absolutely depends on HNF-4 (19, 20). COS-1 cells, which normally do not express either HNF-1 or HNF-4, were transfected with pCB-HNF-4 and the activation of the endogenous HNF-1 gene was analyzed in mobility-shift experiments using the high-affinity HNF-1 binding site AlbPE (15, 21) as a probe. HNF-4 induced the formation of a specific DNA/protein complex, which was partially inhibited and partially supershifted by the inclusion of an HNF-1-specific antibody in the binding reaction mixture (Fig. 2*D*). Treatment of the cells with genistein inhibited the activation of this DNA-binding factor. Similar inhibition was observed in HepG2 cells which was reversible upon removal of the drug (Fig. 2*E*). Since the DNA-binding potential of expression vector-derived HNF-1 was not affected by this treatment (Fig. 2*E*), we ascribe this inhibition to the reduced rate of endog-

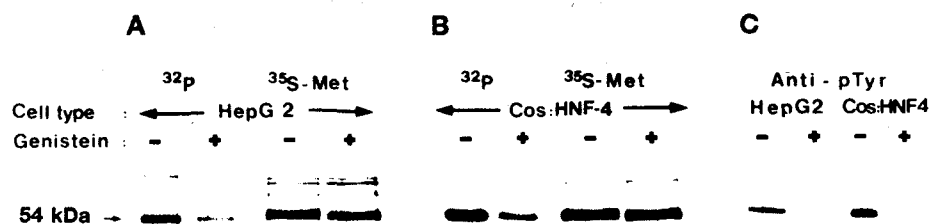


FIG. 1. (*A* and *B*) Tyrosine phosphorylation of HNF-4. HepG2 (*A*) or pCB-HNF-4-transfected COS-1 (*B*) cells were incubated for 2 hr with [^{32}P]orthophosphate or [^{35}S]methionine in the presence (+) or absence (-) of genistein (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Genistein was added to the culture medium 1 hr before the ^{32}P labeling and 48 hr before the ^{35}S labeling. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-HNF-4 polyclonal antibodies. The immunoprecipitates were separated by SDS/PAGE and visualized by autoradiography. (*C*) Lysates from genistein-treated (+) or untreated (-) HepG2 and pCB-HNF-4-transfected COS-1 cells were immunoprecipitated with anti-HNF-4. After SDS/PAGE, proteins were electroblotted and probed with horseradish peroxidase conjugated anti-phosphotyrosine monoclonal antibody PY20 (anti-pTyr).

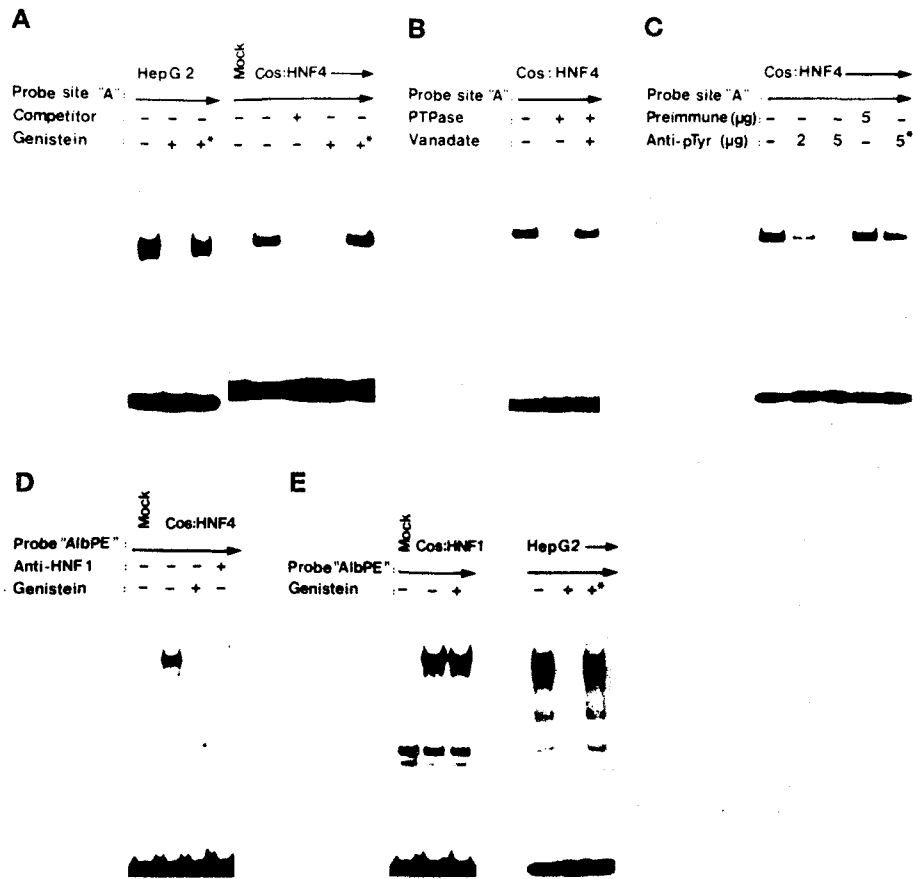


FIG. 2. (A–C) DNA-binding activity of HNF-4 is modulated by tyrosine phosphorylation. (A) Nuclear extracts from HepG2 and pCB-HNF-4-transfected COS-1 cells were analyzed in mobility-shift experiments using the high-affinity HNF-4 binding site (site A) probe (15, 16). Cells were treated with genistein (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hr (+), washed repeatedly with complete medium, and incubated for an additional 24 hr (+*) before extract preparation. (B) Nuclear extracts from pCB-HNF-4-transfected COS-1 cells were incubated with 10 units of purified protein-tyrosine-phosphatase B (PTPase; Upstate Biotechnology) for 10 min at 30°C in the presence or absence of 1 mM Na_3VO_4 (sodium vanadate) before initiation of the binding reaction. (C) Nuclear extracts from pCB-HNF-4-transfected COS-1 cells were preincubated in ice with 2 or 5 μg of polyclonal antibodies to phosphotyrosine (4G10; Upstate Biotechnology) or 5 μg of preimmune antiserum for 3 hr before the binding reaction. In the lane marked with an asterisk the phosphotyrosine antibodies were incubated with 10 mM phosphotyrosine-agarose for 1 hr before incubation with the nuclear extract. (D and E) Activation of the endogenous HNF-1 in COS-1 cells. COS-1 cells were transfected with pCB-HNF-4 (D) or pCB-HNF-1 (E) and incubated in the presence (+) or absence (–) of genistein (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Nuclear extracts were prepared 48 hr after transfection and analyzed in mobility-shift experiments using the high-affinity HNF-1 binding site AlbPE as a probe. In the rightmost lane of D, 1 μl of diluted (1:6) HNF-1-specific antiserum was included in the binding reaction. Mobility-shift assays using the AlbPE probe were also performed with extracts from HepG2 cells treated as described in A.

nous HNF-1 expression caused by the inactivation of HNF-4. The ability of HNF-4 to activate the endogenous HNF-1 gene was further confirmed by transient transfection experiments using the 3xAlbPE-AdML-CAT (15) reporter. Transfection of COS-1 cells with HNF-4 could activate this chimeric promoter, whose activity is dependent on transcriptionally active HNF-1. As expected, treatment of the cells with genistein resulted in reversible loss of activation (Fig. 3C). Taken together, the above results demonstrate that tyrosine phosphorylation of HNF-4 is required for DNA binding and consequently for reactivation.

Recent studies on the interferon signal transduction pathways led to the discovery of a family of latent transcription factors (STAT family) activated by tyrosine phosphorylation (14). Upon cytokine- or growth factor-dependent induction, STAT proteins become rapidly phosphorylated in the cytoplasm and subsequently translocate to the nucleus (13). Although phosphorylation of HNF-4 is not dependent on several of the known extracellular signaling proteins (E.K., unpublished observations), it was of interest to determine whether tyrosine phosphorylation affects the transport of HNF-4 from the cytoplasm into the nucleus. To this end we compared the intracellular distribution of HNF-4 in untreated and genistein-

treated HepG2 and transfected COS-1 cells by indirect immunofluorescence analysis using polyclonal antiserum specific for HNF-4. Predominantly nuclear staining was observed in both cases, indicating that tyrosine phosphorylation does not play a role in the nuclear translocation of HNF-4 (Fig. 4A, a–d). However, examination of the nuclear signal at high magnification revealed a striking difference in the subnuclear topology of HNF-4 between the untreated and genistein-treated cells. The HNF-4 signal accumulated in distinct nuclear compartments in both HepG2 and transfected COS-1 cells (Fig. 4A, e and h). Five to 15 such loci containing the majority of immunoreactive HNF-4 were observed in the nuclei of both cell types, suggesting that their number does not depend on the different intracellular levels of HNF-4. In contrast, when the cells were treated with genistein this pattern disappeared and a diffuse nuclear distribution was observed (Fig. 4A, f and i). The subnuclear distribution of HNF-4 was further characterized by immunoelectron microscopy. Thin sections of untreated and genistein-treated HepG2 cells were immunolabeled by anti-HNF-4 followed by colloidal gold-conjugated secondary antibodies. One to three immunopositive regions, containing assembled groups of 20–40 immunogold particles, were observed in most sections of untreated cells, while no

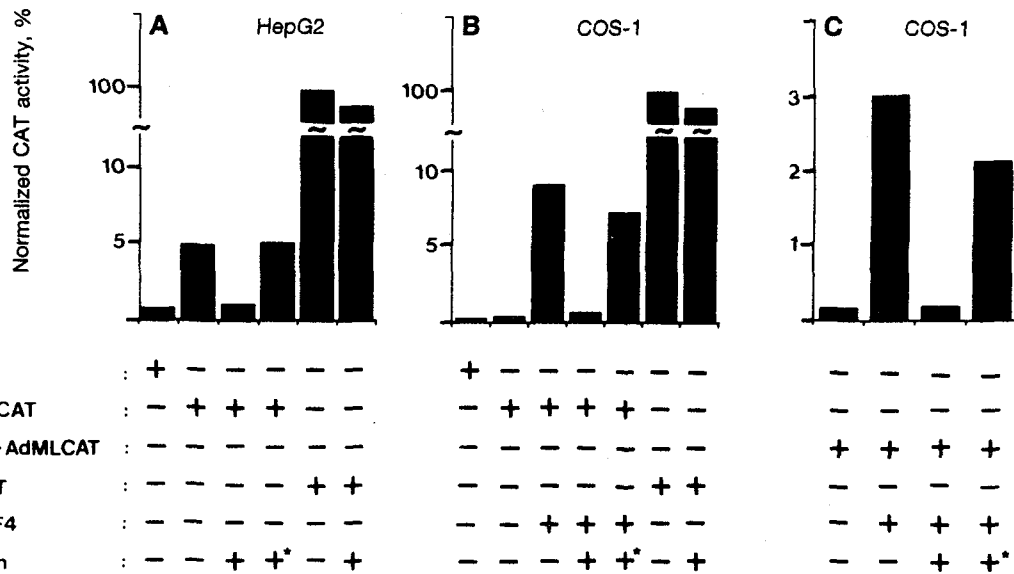


FIG. 3. Analysis of HNF-4-dependent transcriptional activation. HepG2 and COS-1 cells were transfected (calcium phosphate method) with 2 μ g of CAT reporter constructs in which transcription is controlled by the minimal thymidine kinase promoter (TK-CAT), four copies of the specific HNF-4 binding site A fused to the TK promoter (4xA-TK-CAT; ref. 16), three copies of the high-affinity HNF-1 site AlbPE fused to the adenovirus major late promoter (3xAlbPE-AdML-CAT; ref. 15) or the Rous sarcoma virus promoter (RSV-CAT; ref. 15). Where indicated, COS-1 cells also received 2 μ g of pCB-HNF-4 expression vector. After glycerol shock the cells were cultured in the presence (+) or absence (-) of genistein (15 μ g/ml) for 40 hr. In some cultures the medium was replaced at this time and the cells were cultured for an additional 24 hr (+*). Bars represent mean values of normalized CAT activities from at least four independent experiments, expressed as a percentage of RSV-CAT activity (not shown in C).

such accumulations were evident in cells treated with genistein (Fig. 5). The cytoplasm and nucleoli did not show any immu-

noreactivity. These findings suggest that the distinct immunoreactive regions observed in the *in situ* fluorescence experiments correspond to specific assembly of HNF-4 molecules into discrete nuclear subdomains.

Three independent observations argue against the possibility that the diffuse nuclear distribution of HNF-4 in the genistein-treated cells may be attributed to some sort of changes in the nuclear architecture caused by the drug. First, the punctate pattern of HNF-4 distribution was regenerated within 24 hr upon removal of the drug from the culture medium (Fig. 4A, g and j). Second, the characteristic speckled nuclear pattern obtained with the Y12 antibody, which recog-

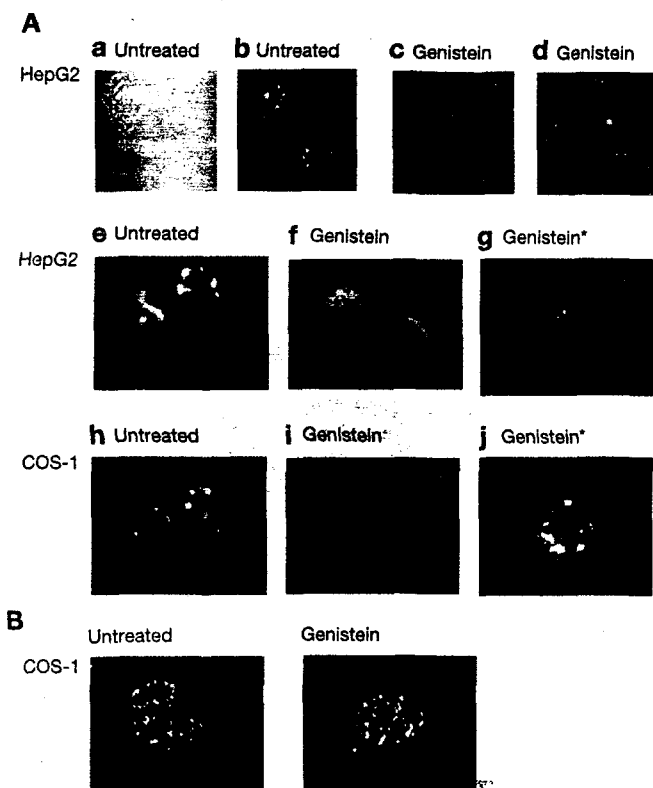


FIG. 4. Immunolocalization of HNF-4 in HepG2 and COS-1 cells. COS-1 cells were plated on coverslips, transfected with pCB-HNF-4, and then left untreated or treated with genistein (15 μ g/ml) for 48 hr. Then some cells were extensively washed with complete medium and incubated for an additional 24 hr (genistein*). Coverslips containing HepG2 cells were treated similarly. Immunostaining of the cells was performed with anti-HNF-4 (A) or anti-Sm monoclonal antibody Y12 (B). In A, a and c show corresponding phase-contrast images of b and d, respectively. (A a-d, $\times 60$; A e-j and B, $\times 650$.)

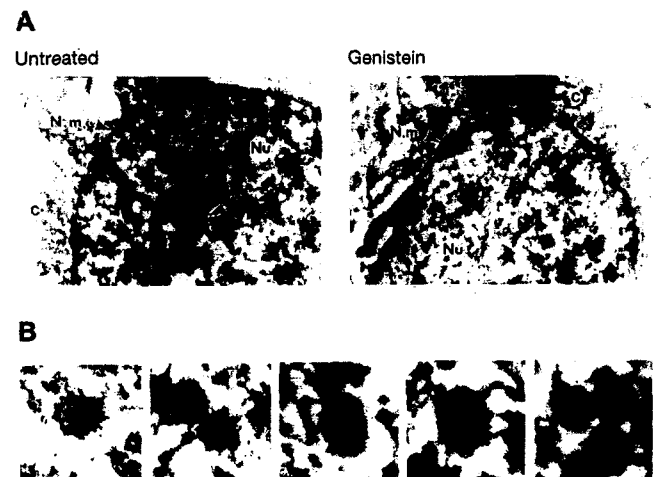


FIG. 5. Ultrastructural localization of HNF-4 in HepG2 cells. Thin sections of untreated and genistein-treated HepG2 cells were immunostained with anti-HNF-4 and examined by electron microscopy. (A) Low magnification of untreated and genistein-treated HepG2 cells. Unlabeled arrowhead in A indicates clustered HNF-4 nuclear distribution seen only in untreated cells. C, cytoplasm; N.m., nuclear membrane; Nu, nucleus. ($\times 6300$.) (B) Higher magnification of five examples of HNF-4-containing nuclear clusters seen in untreated HepG2 cells. ($\times 28,000$.)

izes small nuclear ribonucleoproteins involved in pre-mRNA splicing (22), was not changed by genistein treatment (Fig. 4B). In addition, electron microscopy showed no obvious morphological alterations in the nuclear structure in the genistein-treated cells. Therefore the effect of genistein on HNF-4 localization is due to the inhibition of tyrosine phosphorylation of either HNF-4 itself or a nuclear matrix protein responsible for directing HNF-4 to the specific subnuclear sites. On the basis of the available data, neither explanation can be excluded. Whichever mechanism applies, our results strongly suggest that tyrosine phosphorylation either directly or indirectly plays a regulatory role in the subnuclear distribution of HNF-4.

Several nuclear activities, such as DNA and RNA synthesis and RNA splicing, have been localized in discrete subnuclear domains rather than diffusely distributed throughout the nucleoplasm (23–26). The best studied factors are the components of the splicing machinery, which have been shown to be associated with at least three distinct nuclear structures: chromatin fibrils, which correspond to the *in situ* forms of nascent heterogeneous nuclear RNA transcripts; interchromatin granules; and coiled bodies (27, 28). PML, a nuclear protein involved in the t(15;17) chromosomal translocation in acute promyelocytic leukemia, is also compartmentalized in the nucleus of acute promyelocytic leukemia cells expressing a PML-retinoic acid receptor α fusion protein, in multiple small nuclear clusters (29–31). Upon administration of retinoic acid, PML relocates into nuclear structures of unidentified function termed nuclear bodies (31). Although the HNF-4-immunoreactive regions observed by electron microscopy resemble the pattern obtained with PML in nuclear bodies, at present we are unable to relate them unequivocally to these structures. However, we speculate that they may correspond to sites where HNF-4 is actively engaged in the transcriptional activation of target genes. This speculation seems to be valid in light of the positive correlation between the ability of HNF-4 to activate the endogenous HNF-1 gene (Figs. 2 and 3) and the subnuclear localization of its functionally active and inactive forms (Figs. 4 and 5).

Gene activation in general requires the simultaneous presence of several transcription factors which interact with a given array of cis-acting elements on promoter regions. Since most of these factors are present in extremely low amounts in the cells, their random distribution in the nucleoplasm would result in insufficient local concentrations around the regulatory regions for the formation of transcriptionally active complexes. The recruitment of a transcription factor into discrete nuclear locations described in this paper may serve as a mechanism to achieve local concentrations above the threshold level required for gene activation. At least for HNF-4, achieving these specific assembly sites depends on tyrosine phosphorylation of either HNF-4 itself or a carrier nuclear matrix protein.

We are indebted to Drs. F. Sladek, S. Cereghini, and R. Padgett for anti-HNF-4, anti-HNF-1, and Y12 antibodies. We are grateful to Drs. N. Panopoulos, J. Papamatheakis, and G. Thireos for critical reading of the manuscript. N.T.K. thanks M. Roth for continued

support. This work was supported by the Greek General Secretariat for Science and Technology and the European Economic Community (BIO2-CT93-0473).

- Xanthopoulos, K. G., Prezioso, V. R., Chen, W. S., Sladek, F. M., Cortese, R. & Darnell, J. E., Jr. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3807–3811.
- Zhong, W., Mirkovitch, J. & Darnell, J. E., Jr. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14**, 7276–7284.
- Sladek, F. M., Zhong, W., Lai, E. & Darnell, J. E., Jr. (1990) *Genes Dev.* **4**, 2353–2365.
- Hunter, T. & Karin, M. (1992) *Cell* **70**, 375–387.
- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H. K., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M. & Hunter, T. (1991) *Cell* **64**, 573–584.
- Segil, N., Roberts, S. B. & Heintz, N. (1991) *Science* **254**, 1814–1816.
- Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H. T., Qureshi, S. A., Cowburn, D. & Darnell, J. E., Jr. (1994) *Cell* **76**, 821–828.
- Yamamoto, K. K., Gonzales, G. A., Biggs, W. H. & Montminy, M. R. (1988) *Nature (London)* **334**, 494–498.
- Trautwein, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M. & Chojkier, M. (1993) *Nature (London)* **364**, 544–547.
- Metz, R. & Ziff, E. (1991) *Genes Dev.* **5**, 1754–1766.
- Kerr, L. D., Inoue, J., Davis, N., Link, E., Baeuerle, P., Bose, H. R. & Verma, I. M. (1991) *Genes Dev.* **5**, 1464–1476.
- Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V. R. & Darnell, J. E., Jr. (1992) *Science* **257**, 809–813.
- Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V. R. & Darnell, J. E., Jr. (1992) *Science* **258**, 1808–1812.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. & Stark, G. R. (1994) *Science* **264**, 1415–1421.
- Ktistaki, E., Lacorte, J. M., Katrakili, N., Zannis, V. I. & Talianidis, I. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4689–4696.
- Kritis, A. A., Ktistaki, E., Barda, D., Zannis, V. I. & Talianidis, I. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 5882–5889.
- Graham, F. L. & Van der Eb, A. J. (1973) *Virology* **52**, 456–467.
- Akiyama, T. & Ogawara, H. (1991) *Methods Enzymol.* **201**, 362–370.
- Kuo, C. J., Conley, P. B., Chen, L., Sladek, F. M., Darnell, J. E., Jr., & Crabtree, G. R. (1992) *Nature (London)* **355**, 457–461.
- Tian, H.-M. & Schibler, U. (1991) *Genes Dev.* **5**, 2225–2234.
- Pascal, M., Wuarin, J. & Schibler, U. (1989) *Science* **244**, 343–346.
- Lerner, E. A., Lerner, M. R., Janeway, L. A. & Steitz, J. A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2737–2741.
- Nakayasu, H. & Berezney, R. (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 1–11.
- Carter, K. C., Taneja, K. L. & Lawrence, J. B. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 1191–1202.
- Xing, Y., Jonhson, C. V., Dobner, P. R. & Lawrence, J. B. (1993) *Science* **259**, 1326–1330.
- Jimenez-Garcia, I. F. & Spector, D. L. (1993) *Cell* **73**, 47–59.
- Spector, D. L., Fu, X.-D., & Maniatis, T. (1991) *EMBO J.* **10**, 3467–3481.
- Spector, D. L. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 442–448.
- Dyck, J. A., Maul, G. G., Miller, W. H., Chen, J. D., Kakizuka, A. & Evans, R. M. (1994) *Cell* **76**, 333–343.
- Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo-Fornesca, M., Lamond, A. & Dejean, A. (1994) *Cell* **76**, 345–356.
- Koken, M. H. M., Puvion-Dutilleul, F., Guillemin, M. C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., deJong, L., Szosteck, C., Calvo, F., Chomienne, C., Puvion, E. & deThe, H. (1994) *EMBO J.* **13**, 1073–1083.

Transcriptional regulation of the apolipoprotein A-IV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein C-III gene

Eleni Ktistaki, Jean-Marc Lacorte, Nitsa Katrakili, Vassilis I.Zannis and Iannis Talianidis*
Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology and
University of Crete Medical School, PO Box 1527, Herakleion 711 10, Crete, Greece

Received July 6, 1994; Revised and Accepted August 23, 1994

ABSTRACT

Apolipoprotein A-IV expression is limited to intestinal and hepatic cells, suggesting a tissue specific transcriptional regulation of its gene. To investigate the mechanism controlling apo A-IV transcription we have analysed its promoter region by *in vitro* DNA binding and transient transfection experiments. DNase I footprinting analysis of the proximal promoter with rat liver nuclear extracts revealed four protected regions: AIVA (-32 to -22), AIVB (-84 to -42), AIVC (-148 to -92) and AIVD (-274 to -250). Element AIVC which is necessary for maximal promoter activity, binds HNF-4, Arp-1 and Ear-3 with similar affinity in a mutually exclusive manner. HNF-4 transactivated chimeric constructs containing intact AIVC site in the context of either the apo A-IV promoter or the heterologous thymidine kinase minimal promoter, while Arp-1 and Ear-3 repressed this activation. Increasing amounts of HNF-4 alleviated Arp-1 or Ear-3 mediated repression, suggesting that the observed opposing effects is a result of direct competition of these factors for the same recognition site. In transient transfection assays the apo A-IV promoter region (-700 to +10) had a very low activity in cells of hepatic (HepG2) and intestinal (CaCo2) origin. This activity was increased 13 to 18-fold when the upstream elements of the distantly linked apo C-III gene were fused to the proximal promoter. Results obtained with different 5' and 3' deletion constructs indicated that the *cis*-acting elements F to J between the nucleotides -500 and -890 of the apo C-III promoter were absolutely necessary to drive maximal enhancement in HepG2 and CaCo2 cells. The apo C-III upstream elements enhanced the activity of the minimal AdML promoter or the apo A-IV site C mutant less efficiently than the intact apo A-IV or AdML promoter constructs containing single HNF-4 sites. The findings suggest that the enhancer effect is mediated by synergistic interactions between the *trans*-acting

factors which recognize the apo C-III regulatory elements and HNF-4 which binds to the proximal apo A-IV promoter.

INTRODUCTION

Apolipoprotein A-IV (apo A-IV) is a component of high density lipoproteins (HDL) in several mammalian species but in humans is found mainly in the lipoprotein free ($d > 1.21$ g/ml) plasma fraction (1,2). Although the precise function of this protein is not known, it has been shown that it promotes cholesterol efflux from adipose cells (3), and activates lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) using DMPC as a substrate (4). These observations suggest that apo A-IV, similar to apo A-I may play a significant role in the reverse transport of cholesterol. Recently it has been reported that apo A-IV potentiates the activation of lipoprotein lipase by apo C-II (5). In humans, apo A-IV is synthesized primarily in the intestine, and to a lesser degree in the liver (6), where its mRNA levels are affected by hormones (6,7), and dietary fat (8), suggesting that apo A-IV is regulated at least in part at the transcriptional level. An earlier study aimed at the identification of sequences responsible for the tissue specific expression of apo A-IV, indicated that apo A-IV promoter constructs extending either to -893 or -300 nucleotide had approximately 10-fold higher activities in HepG2 and CaCo2 cells, as compared to nonhepatic and nonintestinal cells (9). Other studies however suggested that the proximal promoter region (up to -300 nucleotide position) was insufficient to drive transcription in HepG2 or CaCo2 cell lines (10), and in transgenic mice (11). When large DNA segments extending to -7700 (11) or -6711 and -3500 (10) nucleotide position from the apo A-IV transcriptional start site were examined, substantial activity could be detected in both experimental systems. In transient transfection experiments the active constructs were transactivated by hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) (10), suggesting that similarly to other apolipoproteins (12), apo A-IV may also be subject to hormone receptor mediated transcriptional regulation.

*To whom correspondence should be addressed

Since the gene coding for apo A-IV is located 6.5 kb downstream of the apo C-III gene on the long arm of chromosome 11 (13), these observations raised the possibility that sequences located in the 5' flanking region of the apo C-III gene may be involved in the control of its transcription.

In this paper we describe the fine mapping of the regulatory regions involved in the hepatic and intestinal transcription of the apo A-IV gene. We report the identification and characterization of a *cis*-acting element in the proximal region of the apo A-IV promoter which is absolutely necessary for its activity. We show that HNF-4 binds to this region and activates transcription, while the recently identified hormone receptor Arp-1 (14), and its homologue Ear-3 (15), act as repressors, by competition with HNF-4 for the same binding site. We also show that transcriptional activation of apo A-IV promoter by HNF-4 requires the presence of enhancer elements which have been mapped in the distantly located apo C-III upstream promoter region. Finally, we present evidence for synergism between HNF-4 and the *trans* acting factors bound to the enhancer.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructions

Plasmid AIV-CAT, which contains the 5' flanking region of the human apo A-IV gene from -700 to +10 nucleotides fused to the chloramphenicol acetyltransferase cDNA, was obtained by inserting the *KpnI/HindIII* fragment of pBS-AIV700, to the same sites of pUC-CAT (16). Different part of the apo C-III promoter were isolated by *Bst*X1, or *Bsu*36I, or partial *Stu*I digestions of the apo C-III CAT plasmid (16), filled in with the Klenow fragment of DNA polymerase I, followed by *Xba*I digestion. These fragments were ligated to the *Xba*I/*Asp*718-blunt sites of AIV-CAT, to obtain [CIIIJ-B]AIV-CAT, [CIIIJ-C]AIV-CAT, [CIIIJ-F]AIV-CAT and [CIIIJ-H]AI-CAT, respectively. [CIII I]AIV-CAT and [CIII G]AIV-CAT were obtained by ligation of double stranded oligonucleotides encompassing the -766 to -726 (CIII I) and -669 to -648 (CIII G) region of the apo C-III promoter, into the *Sal*I site of AIV-CAT. The inserts of [CIIIH-G]AIV-CAT, [CIIIG-F]AIV-CAT and [CIIIH-F]AIV-CAT were synthesized by the polymerase chain reaction using the appropriate primers, and ligated to the blunt ended *Asp*718 site of AIV-CAT. [CIIIF-J]AIV-CAT was constructed by excising the *Xba*I/*Xho*I fragment of [CIIIJ-F]AIV-CAT, followed by filling in with the Klenow fragment of DNA polymerase I and ligation back to the parent plasmid. The same fragment was also inserted into the blunt ended *Hind*III site of pML44-CAT (17), to create the [CIIIJ-F]ML44-CAT. Double stranded oligonucleotides AIVC and CIIIB were phosphorylated by polynucleotide kinase and ligated to the *Sal*I site of either pML44-CAT or [CIIIJ-F]ML44-CAT. The resulting constructs were designated as [AIVC]ML44-CAT, [CIIIB]ML44-CAT, [CIIIJ-F][AIVC]ML44-CAT and [CIIIJ-F][CIIIB]ML44-CAT, respectively. The [AIVC]₃TK-CAT plasmid was constructed as follows: First the *Eco*RI/*Bgl*II (-85 to +51) fragment of the HSV-TK-CAT (18) plasmid was blunt ended and ligated to the *Sma*I site of pUC-CAT. Then double stranded AIVC oligonucleotide was inserted to this vector and plasmids containing three concatamerized AIVC oligonucleotides in the sense orientation were selected. [CIIIJ-F]AIVCM-CAT was generated by PCR based mutagenesis method using mutated sense and antisense AIVC oligonucleotides as internal primers. The external primers were synthesized from vector sequences located

at the 5' or 3' adjacent region of AIV-CAT. The amplified products were mixed and subjected to a second amplification using only the external primers. This secondary product was sequentially digested with *Bsu*36I and *Hind*III, and inserted to the same sites of [CIIIJ-F]AIV-CAT. The AIV-GI(380) plasmid which contains the -700 to -2 nucleotide region of the apo A-IV promoter was obtained by inserting a PCR fragment encompassing this region into the *Xba*I/*Eco*RV sites of the previously described pGI- (19). pMT-HNF-4, pMT-Arp-1 and pMT-Ear-3 (12,20), were generously provided by Dr J.Ladias. pCB6-HNF-4 was created by subcloning the *Eco*RI/*Hind*III fragment of pMT-HNF-4, containing the entire coding region of HNF-4, into the *Asp*718/*Hind*III sites of the pCB-6 expression vector (21). All clones were verified by DNA sequencing using T7 polymerase (Sequenase).

In vitro DNA binding assays

Rat liver nuclear extracts were prepared according to Lichsteiner *et al.* (22), with the exception that protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (0.1 mM), aprotinin (10 µg/ml), pepstatin (1 µg/ml) and leupeptin (1 µg/ml) were included in all buffers. Whole cell extracts from Cos-1 cells were prepared as described in (12). DNase-I footprinting, mobility shift assays and methylation interference assays were performed as previously described (12, 19).

The oligonucleotides used in this study were as follows:

AIVC: 5' TCGATAGTCTCAGGGTCACAAAAGTCCAAGAGGCC-120
 AIVCM: 5' ACGTAGTCTCAGATCTACAACTTCCAAGAGGCC-121
 CIIIB: 5' TCGAGGTCAGCAGGTGACCTTGGCCAGCG-67
 HNF-1A: 5' TCGAGGCTGAAGTCCAAGTTCAGTCCCTTCGC-41
 AlbPE: 5' TCGAGTGTGGTTAATGATCTACAGTTA-48

Cell cultures and transfections

Monolayer cultures of HepG2 and CaCo2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% and 20% heat inactivated fetal calf serum, respectively. Twenty four hours before transfections, cells were seeded at 50-60% confluency. The indicated amounts of various constructs alongside with 3 µg pRSV-β-gal plasmid (24) were introduced to the cells by the calcium phosphate DNA coprecipitation method (25). Forty hours later the cells were harvested and lysed by three consecutive freeze-thaw cycles. Chloramphenicol acetyltransferase activity was assayed as described in (26), using constant amounts of proteins. The protein concentrations and incubation times were carefully selected by titration and kinetic experiments to assure that the enzyme reaction was at a linear range. β-galactosidase activity was measured according to (24), and the values were used to normalize variations in the transfection efficiency.

In vitro transcription assays

200 ng AIV-GI(380) and 100 ng AdML(180) (27) templates supplemented with 300 ng salmon sperm DNA, were incubated with 50 µg protein containing rat liver nuclear extract, in a reaction mixture containing 25 mM Hepes pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 35 units of RNasin, 0.5 mM dithiothreitol, 0.1 mM 3'-O-methyl-GTP, 0.6 mM ATP and CTP, 0.035 mM UTP, 7 µCi [α³²P]UTP (3000 Ci/mmol) and 10% glycerol, in the presence or absence of 100 ng double stranded competitor oligonucleotides as indicated. The reactions were allowed to proceed for 45 minutes at 30°C and stopped by the addition of 2.5 µl 6% SDS, 250 mM EDTA 250 mM Tris pH 8.0 and 2.5



Figure 1. Mapping the nuclear factor binding sites in the proximal Apo A-IV promoter. DNase-I footprint analysis was performed with 5' end labeled probes containing the -165 to +10 (panel A), and -322 to +10 (panel B) nucleotide region of the apo A-IV promoter using the indicated amounts of rat liver nuclear extracts. G/A represent Maxam-Gilbert chemical sequencing ladders of the same probes. Panel C: Nucleotide sequence of the proximal apo A-IV promoter and summary of the protected regions (boxed).

µl 16 mg/ml proteinase K, 0.5 mg/ml tRNA. The samples were digested at 65°C for 20 minutes, extracted with phenol-chloroform, precipitated with ethanol and analysed in 6% polyacrylamide-8 M urea gels.

RESULTS

Identification of an orphan receptor binding site in the proximal region of apo A-IV promoter

The binding sites of nuclear proteins along the apo A-IV proximal promoter (-300 to +10) were determined by DNase I

footprinting using rat liver nuclear extracts. Four protected regions were identified: AIVA (-32 to -22), AIVB (-84 to -42), AIVC (-148 to -92) and AIVD (-274 to -250) (Fig. 1). In addition to the protected regions, these extracts induced at least six DNase I hypersensitive sites in the upper strand at the nucleotide positions -50, -222, -228, -238, 307 and 308 (Fig. 1). Inspection of the sequence at the protected region AIVC (AGGGTCACAAAAGTCCAA), revealed a high degree of similarity with the consensus binding site of the liver enriched transcription factor HNF-4 (28). To assess if indeed HNF-4 and/or other members of the hormone receptor family can interact with this site we performed electrophoretic mobility shift experiments using Cos cell extracts expressing HNF-4, Arp-1 and Ear-3. As shown in Fig. 2, each of these proteins formed a complex with the AIVC oligonucleotide probe. In order to determine the relative binding affinities of these proteins to the AIVC site, we performed mobility shift assays in which constant amounts of protein extracts were titrated with increasing amounts of radiolabeled probe. Scatchard analysis (29) of the data revealed that HNF-4, Arp-1 and Ear-3 bind with similar affinities to the AIVC site. The dissociation constants (Kd) were: 5.5 nM for HNF-4, 4.3 nM for Arp-1 and 7.7 nM for Ear-3 (data not shown). The participation of these orphan receptors in the DNA-protein complex formed with AIVC recognition site with crude rat liver nuclear extracts was evidenced by competition and antibody supershift assays (Fig 3). Strong competition was observed with previously well characterized hormone receptor binding sites from the apo C-III promoter (CIIB) and HNF-1 promoter (A), but not with mutant AIVC site (AIVCM1) (Fig. 3A). Antibodies raised against HNF-4 which recognize only HNF-4, and COUP-TF which recognize Arp-1 and Ear-3 but not HNF-4, supershifted part of the complex formed on AIVC site (Fig. 3B). A substantial amount of unaltered activity remained when both antibodies were included in the binding reaction, which may indicate that besides these hormone receptors other nuclear factors can also recognize this element.

Methylation interference of nuclear protein binding to the AIVC oligonucleotide probe was observed in the region between -142 and -128. Binding of HNF-4 was affected by methylation of guanine residues at positions -141, -140, -131, in the coding strand and at -138, -136, -129, -128 in the non-coding strand. Interference of Arp-1 and Ear-3 binding was observed by methylation of guanine residues at positions -142, -141, -140, -131 in the coding strand, and at -138 in the non coding strand (Fig. 4). This methylation interference pattern shows that although these factors recognize highly overlapping sites of the AIVC region, they do not make exactly the same contacts, suggesting subtle differences in their DNA binding specificities.

HNF-4 is a dominant activator of the apo A-IV promoter

The function of HNF-4, Arp-1 and Ear-3 on the AIVC element was tested by transient transfection assays in HepG2 cells using a reporter in which three AIVC sites were fused to the herpes simplex virus thymidine kinase minimal promoter ([AIVC]₃TK-CAT). HNF-4 activated transcription driven by this chimeric promoter 7-fold, while Arp-1 and Ear-3 repressed this activation (Fig. 5A). These results demonstrate that the AIVC region represents a functional orphan receptor response element.

The involvement of HNF-4 in the activity of the apo A-IV promoter was initially assayed in cell free transcription system. The DNA template containing the -700 to -1 nucleotide region

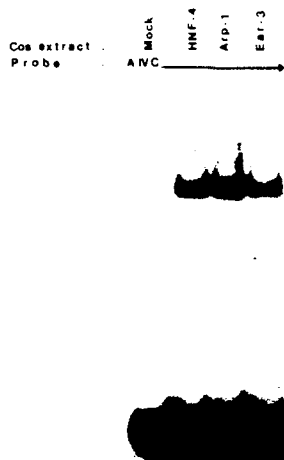


Figure 2. Binding of HNF-4, Arp-1 and Ear-3 to element AIVC. Double stranded oligonucleotide AIVC was labeled and used as a probe in gel electrophoretic mobility shift assay performed with whole cell extracts from mock transfected (M), pMT2-HNF-4 transfected (HNF-4), pMT2-Arp-1 transfected (Arp-1) or pMT2-Ear-3 transfected (Ear-3) Cos-1 cells. Each binding reaction was performed with 5 μ g total protein containing cellular extract.

of the apo A-IV gene fused to a -380 bp G-free cassette was incubated with transcriptionally active rat liver nuclear extract in the presence or absence of excess double stranded competitor oligonucleotides AIVC, CIIIB and 'A'. AIVC and CIIIB are binding sites of both HNF-4 and Arp-1, while site 'A' is able to bind only HNF-4 with high affinity (19). As shown in Fig. 5B the apo A-IV promoter (-700 to -1) could efficiently drive transcription of the reporter cassette *in vitro*, as compared to the AdML promoter which was used as internal control. This activity was reduced to the basal levels when the different HNF-4 binding sites were used as competitors, suggesting that binding of HNF-4 to AIVC site is absolutely necessary for the activity of the apo A-IV promoter.

The upstream (-890 to -500) regulatory elements of the apo C-III gene enhance apo A-IV promoter activity in HepG2 and Caco2 cells

Further analysis of the apo A-IV regulatory region was pursued in transient transfection assays. Initially a reporter construct containing the apo A-IV promoter region from -700 to $+10$ nucleotide position (apo A-IV-CAT) was tested in HepG2 and Caco2 cells. Surprisingly, we observed a very weak promoter activity in both cell lines (approximately 1–1.5% of the activity obtained with RSV-CAT). In order to identify any possible *in vivo* acting negative element, progressive 5' deletion mutants up to the nucleotide position -160 were tested. None of these mutants exhibited higher activity (data not shown). These findings show that in contrast to the *in vitro* situation, the -700 to $+10$ nucleotide region of the apo A-IV gene is not sufficient to drive transcription *in vivo*, and additional regulatory regions may be required for its activity. In search of such type of sequences we found that the apo C-III promoter region (-890 to -65), which is situated approximately 6500 bp upstream of the apo A-IV transcriptional start site, enhanced the transcription driven by the proximal apo A-IV promoter 9 to 10-fold in both HepG2 and Caco2 cells (Fig. 6 lanes 1–2). In order to localize the minimal sequences required for this enhancer activity we have linked

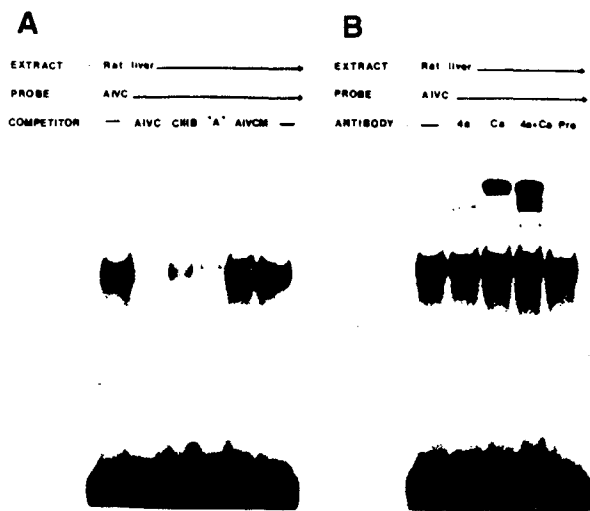


Figure 3. The presence of nuclear hormone receptors in the DNA-protein complex formed on AIVC site using rat liver nuclear proteins. Gel electrophoretic mobility shift assays were performed with rat liver nuclear extracts (10 μ g total protein per lane), in the presence or absence of 100-fold molar excess double stranded cold competitor oligonucleotides AIVC, CIIIB, 'A' and AIVCM (panel A), or antiserum raised against HNF-4 (4a) and COUP-TF (Ca) or both (4a+Ca) or preimmune serum (pre) (panel B).

different 3' and 5' deleted fragments of the apo C-III promoter upstream to the apo A-IV regulatory region. The results obtained from transient transfection experiments of these constructs suggest that the sequences located between the -890 to -500 region of the apo C-III gene exhibited the most marked effect (17.8 and 11.8 fold induction in HepG2 and Caco2 cells respectively), and they were sufficient and necessary for the full enhancer activity in both HepG-2 and Caco2 cells (Fig. 6 lanes 1–4). Essentially the same level of induction was observed when this region was fused to the apo A-IV promoter in the opposite orientation (Fig. 6 lane 6). Further deletions sharply decreased or abolished the enhancer activity (Fig. 6 lanes 7–12). Cotransfection with an HNF-4 expression vector further stimulated the activity of the active enhancer constructs (up to 156-fold and 50-fold above the basal levels in HepG2 and Caco2 cells respectively Fig. 6 lanes 1–5). Since none of the reporters except [CIIIB-B]AIV-CAT contained an HNF-4 binding site on the apo C-III region, we suspected that HNF-4 exerted its effect through binding to the apo AIVC site, and the mechanism of action of the apo C-III enhancer may involve a functional synergism. To test this hypothesis, we introduced a mutation to the AIVC region that completely abolished HNF-4 binding. As shown in Fig. 6 lane 5 the apoC-III upstream elements enhanced this mutant promoter at a greatly reduced level (25 to 30% of the wild type). More importantly, HNF-4 could not transactivate this mutant promoter, suggesting that the enhancer functions by inducing HNF-4 dependent transcription driven by the proximal apo A-IV promoter.

Independent evidence for this notion was provided by transfection experiments using chimeric reporter constructs containing dissected parts of regulatory regions in front of the AdML minimal promoter. The apo C-III upstream elements enhanced approximately 5-fold the activity of the AdML promoter (Fig. 7 lanes 1–2). As expected, HNF-4 did not transactivate these constructs. Single copies of HNF-4 binding sites from the

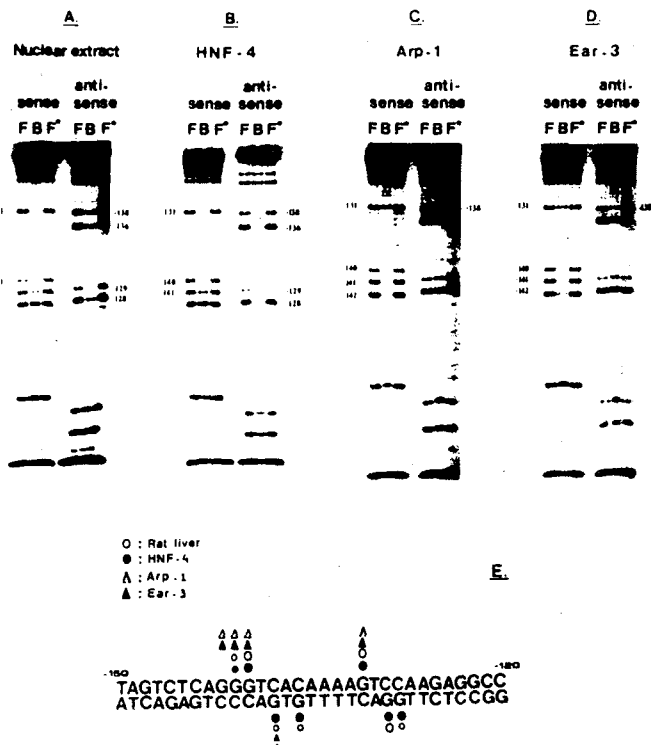


Figure 4. Methylation interference pattern of protein-DNA complexes obtained with the AIVC site. DNA binding reactions were performed with partially methylated double stranded AIVC oligonucleotide labeled at the 5' end of the coding strand (sense) or the 5' end of the noncoding strand (antisense) using rat liver nuclear extract (panel A), or whole cell extracts from Cos-1 cells transfected with pMT2-HNF-4 (panel B), pMT2-Arp-1 (panel C) and pMT2-Ear-3 (panel D). F, free DNA; B, bound DNA and F*, free DNA recovered after binding. The positions of methylated G residues which interfered with binding are indicated by numbers and summarized in panel E. Stronger or weaker interference is indicated by different size of the symbols.

apo A-IV (AIVC) and the apo C-III promoter (CIII_B), increased at a low or insignificant degree AdML promoter activity in both HepG2 and Caco2 cells (Fig. 7 lanes 3-4). Cotransfection with HNF-4 induced this activity 3 to 5 fold above basal levels. On the other hand the transcriptional activity of both single HNF-4 binding site containing constructs ([CIII_B]ML44-CAT and [AIVC]ML44-CAT) were dramatically increased by the apo C-III upstream elements (Fig 7. lanes 5-6). The 23 and 34 fold increase in HepG2, and the 15 and 30-fold increase observed in Caco2 cells, represent a 3 to 4-fold induction above the sum obtained by either regulatory sequence alone, suggesting synergistic interactions between nuclear proteins binding to the apo C-III enhancer and HNF-4. A more profound difference was observed in cotransfection experiments with an HNF-4 expression vector. HNF-4 transactivated the enhancer-AIVC and enhancer-CIII_B containing constructs 148 to 198-fold above basal levels in HepG2 and 118 to 192 fold in Caco2 cells respectively (Fig. 7. lanes 5-6). These values represent a 14 to 18-fold increase above the sum of the activity obtained by the vectors containing either element alone in HNF-4 transfected cells.

Taken together, these data suggest that the apo C-III enhancer acts by a mechanism which strongly potentiates HNF-4 mediated transcription from downstream promoter elements.

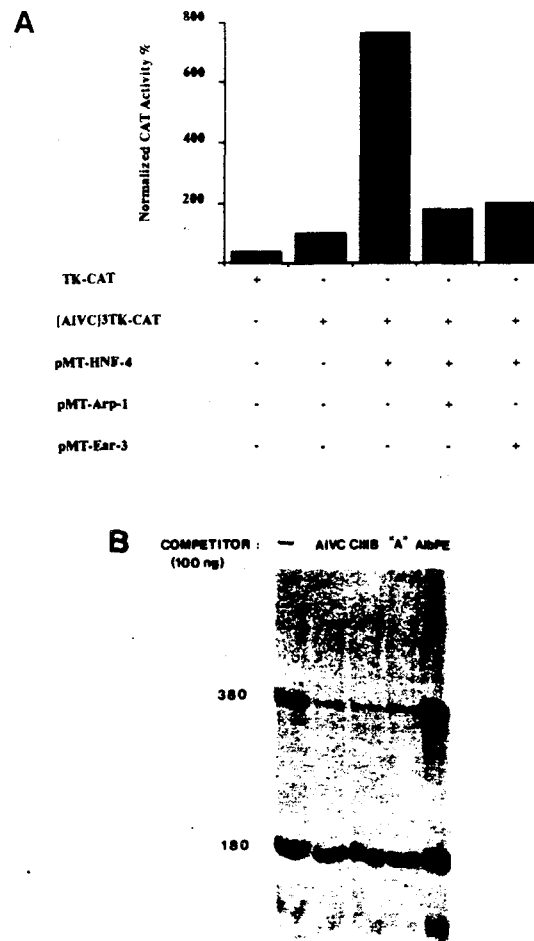


Figure 5. Demonstration that the AIVC site represents a functional hormone receptor response element and it is required for apo A-IV promoter activity. Panel A: HepG2 cells were transfected with 2 μg of TK-CAT or [AIVC]₃TK-CAT reporter plasmids in the presence (+) or absence (-) of 2 μg of pMT2-HNF-4, pMT2-Arp-1 and pMT2-Ear-3 expression vectors. The graphs represent mean values of normalized CAT activities from at least five independent experiments with two different plasmid preparations. The data are expressed as the percentage of normalized CAT activity obtained with [AIVC]₃TK-CAT. Panel B: The AIVG(380) template was incubated for *in vitro* transcription with rat liver nuclear extracts in the presence or absence of 100 ng double stranded cold competitor oligonucleotides as indicated. The transcription signals from the test template (380) and the AdML(180) internal control template (180) is indicated.

Antagonistic effects of Arp-1 or Ear-3 and HNF-4 on apo AIV promoter

We have shown in the previous sections that transcriptional activation of the apo A-IV promoter by HNF-4 depends on the AIVC element, which is also recognized by Arp-1 and Ear-3. These factors had an opposing effect on a homopolimeric promoter containing three AIVC sites, raising the possibility that HNF-4, Arp-1 and Ear-3 may regulate in the opposite direction the apo A-IV promoter by competing for the same binding site. To address this question we have performed cotransfection experiments using the [CIII_B-F]AIV-CAT reporter and different combinations of HNF-4 and Arp-1 or Ear-3 expression vectors. As seen in Fig 8. both Arp-1 and Ear-3 repressed transcription of this promoter to the level of 13 to 15 % of the control. This repression was alleviated by increasing amounts of HNF-4, while

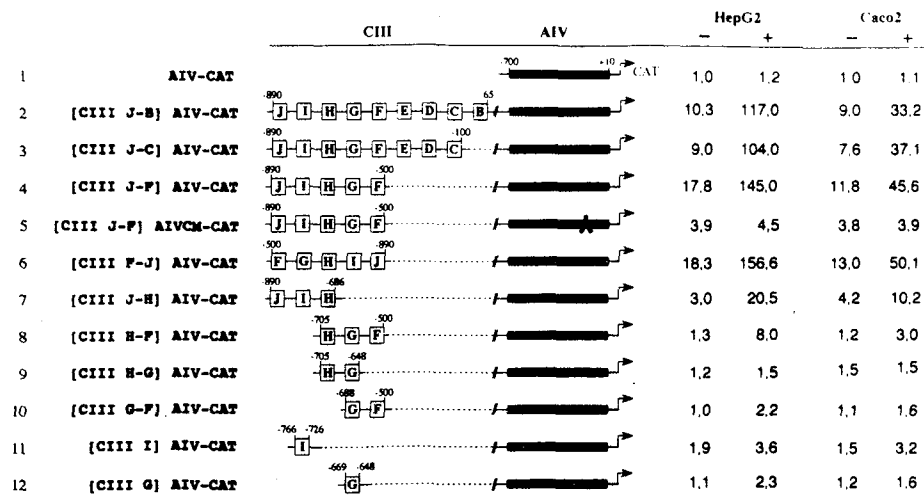


Figure 6. The upstream regulatory elements of the apo C-III gene enhance apo A-IV promoter activity in HepG2 and Caco2 cell lines. HepG2 and Caco2 cells were transfected with 2 μ g of reporter plasmids shown in the left side in the presence (+) or absence (-) of 2 μ g pCB-HNF-4 expression vector. The numbers represent mean values of normalized CAT activities with less than 10% standard deviation, from five independent experiments with at least two different plasmid preparations. The data are presented relative to the activity obtained with AIV-CAT.

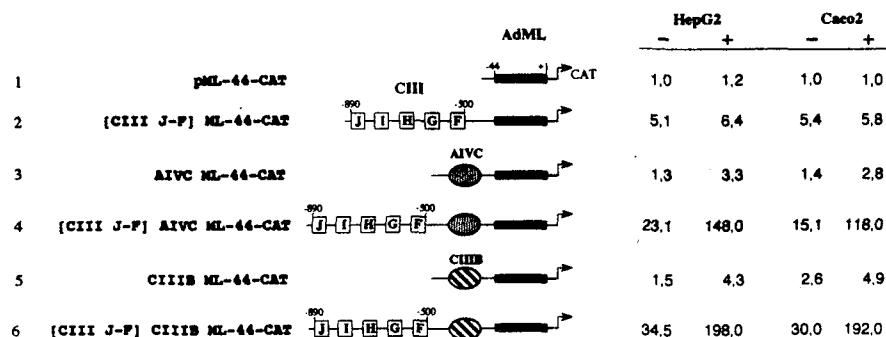


Figure 7. The upstream regulatory elements of the apo C-III gene enhance HNF-4 dependent transcription driven by chimeric promoter constructs containing single HNF-4 binding sites. HepG2 and Caco2 cells were transfected with 2 μ g of the reporter plasmids shown in the left side, in the presence (+) or absence (-) of 2 μ g pCB-HNF-4 expression vector. The numbers represent mean values of normalized CAT activities with less than 10% standard deviation, from four independent experiments. The data are presented relative to the activity obtained with pML-44-CAT.

increasing amounts of Arp-1 or Ear-3 abolished HNF-4 mediated transactivation. Since Arp-1 and Ear-3 did not affect the same reporter containing a mutated AIVC site (Fig. 8C), we conclude that their negative effect is exerted by competition with HNF-4 for the same binding site.

DISCUSSION

In order to elucidate the molecular basis of the tissue specific expression of the apo A-IV gene we have isolated and characterized its promoter region. Alignment of the 5' flanking sequences of the apo A-IV gene derived from different species, revealed a remarkable conservation extending from nucleotide -167 to -77 (9). Within this region we identified a *cis*-acting element between nucleotides -148 and -92 (AIVC), which plays an important role in the transcriptional regulation of the apo A-IV gene. Part of this element can recognize HNF-4, as well as other members of the hormone receptor superfamily like Arp-1 and Ear-3. HNF-4 strongly activated, while Arp-1 and

Ear-3 repressed transcription driven by the apo A-IV promoter. Several lines of evidence presented in this study suggest that the opposing transcriptional effects between HNF-4 and Arp-1 or Ear-3, may be exerted via direct competition for binding to AIVC site. First, all three factors bind to this element with similar affinities in a mutually exclusive manner. Second, transcription driven by the homopolymeric AIVC site containing heterologous promoter was affected in the same direction. Third, these factors did not influence the activity of the apo A-IV promoter containing mutated AIVC site. Since HNF-4, Arp-1 and Ear-3 are present in the same cells in the liver and intestine (20), it seems possible that similarly to other apolipoproteins (12,20), transcription of the apo A-IV gene is also dependent, at least in part, on the relative intracellular concentrations of these hormone receptors. Since HNF-4, Arp-1 and Ear-3 are members of the same hormone receptor family, the possibility exists that they may respond to as yet unidentified ligands. Such ligands, may for instance be the byproducts of intracellular lipid metabolism, and may modulate positively or negatively the expression of the apo

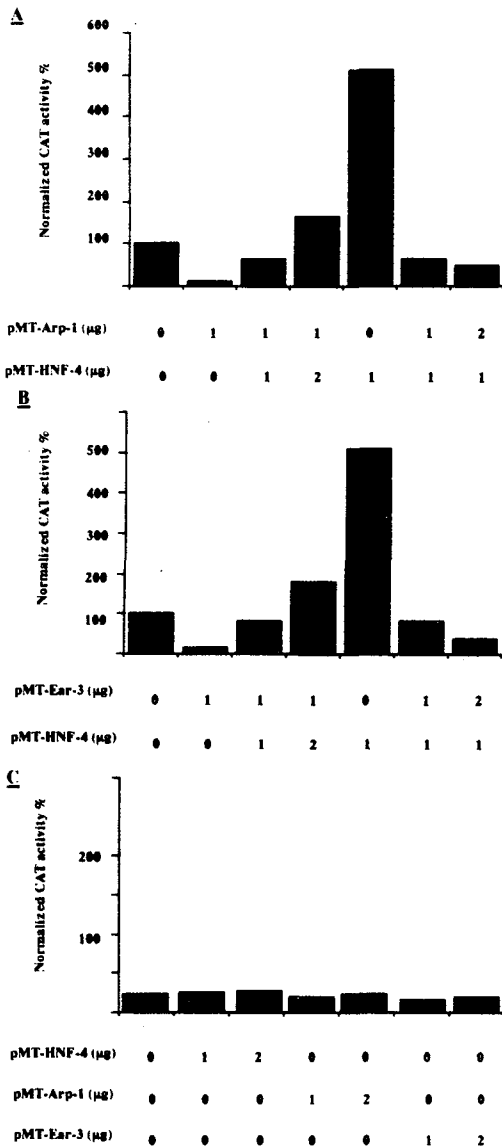


Figure 8. Antagonistic effects of HNF-4 and Arp-1 or Ear-3 on apo A-IV transcription. HepG2 cells were transfected with 2 μg of [CIII]-F AIV-CAT (panel A and B) or 2 μg of [CIII]-F AIVCM-CAT containing mutated AIVC site (panel C) alongside with the indicated amounts of expression plasmids. The graphs represent mean values of normalized CAT activities with less than 10% standard deviation from three independent experiments. The data are expressed as the percentage of normalized CAT activity obtained with [CIII]-F AIV-CAT. Note the different scale of the ordinate in panel C!

A-IV gene according to the metabolic state of the cell. The common regulatory effects of HNF-4 and its family members on the transcription of several apolipoprotein genes (e.g. apo A-1, apo A-II, apo A-IV, apo B, and apo C-III) (12, 20), may be conceivable with the theme relating this subset of nuclear factors in the accomplishment of a specific metabolic goal. This speculation however is contradicted by the important regulatory function of HNF-4 and Arp-1 on a large number of functionally unrelated genes, including pyruvate kinase (30), coagulation factor IX (31), transferrin (32), transthyretin (33), retinol binding

protein II (34), ornithine transcarbamylase (35), and ovalbumine (36). Another explanation for the phenomenon, would assume the evolution of apolipoprotein genes from a common ancestor, through a series of deletion, translocation and duplication events, that accidentally positioned or preserved a dominant hormone receptor response element in their regulatory region. Consistent with this hypothesis are the phylogenetic studies proposing that apo C-III, apo A-I, apo A-II, apo A-IV, and apo E have evolved by sequential duplication and transposition events of an ancestor of apo C-I gene (37).

Although the 5' flanking sequences of the human apo A-IV gene extending up to -700 nucleotide were sufficient to drive transcription *in vitro*, this was not the case *in vivo*. This apparently controversial observation can be resolved by taking into consideration the biological complexity of the experimental system. In the *in vitro* system the availability of regulatory proteins at optimal concentrations in the nuclear extracts is the only rate limiting factor in the formation of transcriptionally active complex. In contrast, DNA introduced into living cells is assembled into higher order chromatin structure, and therefore transcription depends on more complex nuclear events, which may necessitate the presence of additional regulatory elements and factors. Precedent cases for the requirement of such extra regulatory elements to obtain maximal transcriptional activity *in vivo* but not *in vitro*, have been described. Well documented examples are the α 1-antitrypsin (38), and human transferrin promoters (39).

The results presented in this study show that sequences located within the regulatory region of the distantly linked apo C-III gene are necessary for apo A-IV promoter activity *in vivo*. The minimal region required for the induction was located between -890 and -500 nucleotide positions of the apo C-III gene. This region enhanced transcription driven by the apo A-IV and the heterologous AdML promoters in an orientation independent fashion, which is characteristic of a typical enhancer. Since the respective binding sites in the reporters used in this study are brought much closer to each other than their position on the chromosome, we can only indirectly suggest that the apo C-III upstream region is functioning as a physiological enhancer for the apo A-IV gene. However, the extrapolation of our results to the *in vivo* situation seems to be valid in the light of the recent finding, that only a large DNA segment extending up to -7700 nucleotide position from the transcriptional start site was able to drive apo A-IV transcription in transgenic animals (11), since this construct included the apo C-III promoter region which is located approximately at a -6500 bp distance. Similar results were obtained by transient transfection experiments in HepG2 cells (10), although in the latter case a shorter DNA construct extending up to -3500 nucleotide position had also some activity, suggesting the existence of a second weaker enhancer.

The localization of elements enhancing the apo A-IV promoter, in the upstream regulatory region of the apo C-III gene, is interesting in the light of recent findings, which suggest that this region may function as a common enhancer for all three physically linked apolipoprotein genes in the apo A-I/apo C-III/apo A-IV cluster. Similarly to apo A-IV, transcription driven by the proximal apo C-III (12, Talianidis *et al.*, in preparation), and apo A-I (40) promoter was greatly enhanced by this locus. Analogous function have been described for the locus control region of the β -globin cluster (41), or the distal regulatory region of albumin and α -fetoprotein genes (42). In both cases a common

enhancer region orchestrates the transcription of distinct but physically linked downstream genes.

With respect to the mechanism of action of the apo C-III enhancer we propose that a functional interplay between the factors which recognize this region, and HNF-4 which binds to the proximal apo A-IV promoter is responsible for high level transcription. This notion is strongly supported by the finding that the apo C-III enhancer induced the mutated HNF-4 binding site containing proximal apo A-IV promoter only at a very reduced rate. In addition, the apo C-III enhancer sequences induced transcription driven by single HNF-4 binding sites containing minimal promoter constructs much more efficiently, than the ones lacking the HNF-4 sites. These findings indicate that the observed effect is due to synergistic interactions between the factors which bind to the apo C-III enhancer and HNF-4 which binds to the proximal apo A-IV promoter. The requirement of synergistic interactions between HNF-4 and other factors for high level activation has been observed in several other regulatory regions. Well documented cases include synergism of HNF-4 with C/EBP on the apo B (43), or with HNF-1 on the L-type pyruvate kinase (30), or with CREB on the tyrosine aminotransferase promoters (44). The molecular basis for the 'crosstalk' of HNF-4 with these varied assortment of structurally unrelated factors remains to be investigated.

In humans and in transgenic mice apo A-IV expression is mainly observed in intestinal cells and to a lesser extent in the liver. In contrast, we observed similar enhancer dependent apo A-IV promoter activity in cell lines of both hepatic (HepG2) and intestinal (Caco2) origin. Since HepG2 cells express gene products characteristic to the fetal liver, rather than the adult phenotype (45), this difference may reflect distinct expression patterns of the apo A-IV gene during development. Nevertheless, we can not exclude the possibility that posttranscriptional mechanism(s) affecting RNA stability differently in the adult liver and intestine, may be responsible for the observed pattern of apo A-IV messenger RNA in these tissues.

In conclusion, our results show that transcription of the apo A-IV gene is controlled by HNF-4, which binds to its proximal promoter region. In this promoter context HNF-4 alone is not an efficient activator *in vivo*, and requires the presence of factors which recognize enhancer elements located in the upstream promoter region of the distantly linked apo C-III gene. The functional synergism observed between HNF-4 and the factors binding to the apo C-III enhancer, may represent a common mechanism by which these sequences influence the expression of the tandemly linked Apo A-I, apo C-III and apo A-IV genes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr J.Ladiaz and Dr S.Karathanasis for the pMT-HNF-4, pMT-Arp-1 and pMT-Ear-3; Dr C. Brewer for the pCB-6; Dr C.Flordellis for pBS-A-IV-700 plasmids; Dr F.Sladek and Dr M.J.Tsai for the HNF-4 and COUP-TF antibodies. We are grateful to Dr A.Ochoa and Dr M.Zakin for constructive discussions, and communication of results prior to publication; Dr N.Moschonas and Dr J.Papamatheakis for critical reading of the manuscript. Dr J.M.L. was supported by an EEC Human Capital and Mobility postdoctoral fellowship (CT920081). This work was supported by EEC grants (BIOT-CT91-0260; BIOT-CT93-0473) and the Greek General Secretariat for Science and Technology.

REFERENCES

1. Bisgaier, C. L., *et al.* (1985) *J. Lipid Res.* **26**, 11–25.
2. Uterman, G., and Beisiegel, U. (1979) *Eur. J. Biochem.* **99**, 333–343.
3. Steinmetz, A., *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7859–7863.
4. Steinmetz, A., and Uterman, G. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2258–2264.
5. Goldberg, I. J., *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4266–4272.
6. Karathanasis, S. K., Yunis, I., and Zannis, V. I. (1986) *Biochemistry* **25**, 3962–3970.
7. Staels, B., *et al.* (1990) *Endocrinology* **126**, 2153–2163.
8. Apfelbaum, T. F., Davidson, N. O., and Glickman, R. M. (1987) *Am. J. Physiol.* **252**, 662–666.
9. Elshourbagy, N. A., *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 7973–7981.
10. Ochoa, A., Bovard-Houppermans, S., and Zakin, M. M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1210**, 41–47.
11. Lauer, S. J., *et al.* (1991) *Circulation* **84**, 1390.
12. Ladias, J. A. A., *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 15849–15860.
13. Karathanasis, S. K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6374–6378.
14. Ladias, J. A. A., and Karathanasis, S. K. (1991) *Science* **251**, 561–565.
15. Wang, L. H., *et al.* (1989) *Nature* **340**, 163–166.
16. Ogami, K., *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 9808–9815.
17. Ham, J., *et al.* (1991) *EMBO J.* **10**, 2931–2940.
18. Cato, A. C. B., *et al.* (1986) *EMBO J.* **5**, 2237–2240.
19. Kritis, A. A., *et al.* (1993) *Nucl. Acids. Res.* **21**, 5882–5889.
20. Mietus-Snyder, M., *et al.* (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1708–1718.
21. Anderson, S., *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8222–8229.
22. Lichsteiner, S., and Schibler, U. (1989) *Cell* **57**, 1179–1187.
23. Sambrook, J., Fritsch, J. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: Laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
24. Edlund, T., *et al.* (1985) *Science* **230**, 912–916.
25. Graham, F. L., and Van der Eb, A. J. (1973) *Virology* **52**, 456–467.
26. Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044–1051.
27. Sawadogo, M., and Roeder, R. G. (1985) *Cell* **43**, 165–175.
28. Sladek, F. M., *et al.* (1990) *Genes Dev.* **4**, 2353–2365.
29. Scatchard, G. (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672.
30. Guerra, M. M. D., *et al.* (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7725–7733.
31. Reijnen, M. F., *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6300–6303.
32. Shaeffer, E., *et al.* (1993) **268**, 23399–23408.
33. Costa, R. H., and Grayson, D. R. (1991) *Nucl. Acids Res.* **19**, 4139–4145.
34. Nakshatri, H., and Chambon, P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 890–902.
35. Kimura, A., *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 11125–11133.
36. Tsai, S. Y., *et al.* (1987) *Cell* **50**, 701–709.
37. Luo, C. C., *et al.* (1986) *J. Mol. Biol.* **187**, 325–340.
38. Monaci, P., Nicosia, A., and Cortese, R. (1988) *EMBO J.* **7**, 2075–2087.
39. Mendelzon, D., Boissier, F., and Zakin, M. M. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**, 5717–5721.
40. Walsh, A., *et al.* (1993) *J. Lipid Res.* **34**, 617–623.
41. Orkin, S. H. (1990) *Cell* **63**, 665–662.
42. Godbout, R., Ingram, R., and Tilghman, S. M. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 477–487.
43. Metzger, S., *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16831–16838.
44. Nitsch, D., Boshart, M., and Schutz, G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5479–5483.
45. Rollier, A., *et al.* (1993) *Mol Biol. Cell.* **4**, 56–69.

An indirect negative autoregulatory mechanism involved in hepatocyte nuclear factor-1 gene expression

Aristidis A.Kritis, Eleni Ktistaki, Dina Barda, Vassilis I.Zannis and Iannis Talianidis*

Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology and University of Crete Medical School, PO Box 1527, Heraklion 711 10, Crete, Greece

Received September 20, 1993; Revised and Accepted November 18, 1993

ABSTRACT

Recent studies have revealed that hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) is an essential positive regulator of another liver enriched transcription factor HNF-1, defining a transcriptional hierarchy between the two factors operating in hepatocytes. To assess the possible autoregulation of the HNF-1 gene we have examined the effect of HNF-1 on its own transcription. In transient transfection assays, HNF-1 strongly down-regulated transcription driven by its own promoter in HepG2 cells. In addition HNF-1 also repressed the activity of HNF-4 dependent ApoCIII and ApoAI promoters. The same effect was observed using vHNF-1, a distinct but highly related protein to HNF-1. Both HNF-1 and vHNF-1 downregulated HNF-4 activated transcription from intact and chimeric promoter constructs carrying various HNF-4 binding sites implying that they act by impeding HNF-4 binding or activity. DNA binding and cell free transcription experiments however failed to demonstrate any direct or indirect interaction of HNF-1 and vHNF-1 with the above regulatory regions. Both factors repressed HNF-4 induced transcription of the ApoCIII and HNF-1 genes in HeLa cells, arguing against the requirement of a hepatocyte specific function. These findings define an indirect negative autoregulatory mechanism involved in HNF-1 gene expression, which in turn may affect HNF-4 dependent transcription of other liver specific genes.

INTRODUCTION

Cell type specific gene expression is mainly achieved by the interplay of some cell restricted transcription factors and regulatory proteins interacting directly or indirectly with cis-acting DNA elements. Several such transcription factors required for liver specific gene regulation have been identified and characterized. These include HNF-1 (hepatocyte nuclear factor) and vHNF-1—distantly related members of the POU-homeobox family (1–5), HNF-4—a member of the hormone receptor family (6), C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- γ and C/EBP- δ —also called

bZIP proteins with basic DNA binding regions linked to a leucine zipper dimerization domain (7–10), and the HNF-3 family—proteins with sequence similarity to the forkhead gene of *Drosophila* (11). Although these proteins play a pivotal role in the activation of many liver specific genes, none of them can be defined as a universal liver specific transcription factor, since none of them is strictly restricted to the liver. For example, HNF-1 and HNF-4 can also be found in kidney and intestinal cells (5, 12). However, only the liver contains these factors at high concentrations (12). Since none of these factors alone is sufficient to confer the hepatic phenotype, the prevailing view is that liver specificity is mainly determined by the simultaneous expression of these proteins at high levels. Thus the elucidation of the mechanism(s) by which the genes encoding these factors are regulated may provide important insight into the events leading to the establishment and maintenance of the hepatocyte specific phenotype.

Studies on the expression pattern of the HNF-1, HNF-3, HNF-4 and C/EBP genes have shown that the limited tissue distribution of these factors is mainly achieved at the level of transcription regulation (12). In addition, regulatory interactions between hepatic transcription factors have been described indicating a coordinate regulation of HNF-1 and HNF-4 independently of HNF-3 and C/EBP (13). HNF-4 was found to be a crucial positive transactivator of HNF-1 gene, defining an HNF-4 → HNF-1 transcriptional hierarchy in hepatic cells which is controlled by a higher order locus (13, 14).

HNF-1 and vHNF-1 are distinct nuclear proteins with high degree of homology in their DNA binding and dimerization domains. They have indistinguishable recognition sequence specificity, and can form heterodimers *in vivo* and *in vitro* (1, 3, 15, 16). Both factors are important transactivators of many liver specific genes (5). HNF-1 binding activity is enriched in differentiated hepatocytes and is absent in dedifferentiated variants and cell hybrids exhibiting extinguished hepatocyte phenotype. In contrast, vHNF-1 is present in both dedifferentiated cells and extinguished cell hybrids, suggesting distinct developmental functions for these two factors (17, 18).

HNF-4 is a major positive regulator of a different set of liver specific genes, including apolipoproteins AI and C-III (19, 20, 6).

* To whom correspondence should be addressed

It is a unique member of the steroid hormone receptor superfamily, though no ligand has been identified yet for it, and therefore considered as an 'orphan receptor'.

In this paper we describe a negative feed-back regulatory loop controlling the HNF-1 gene. We have studied the effect of HNF-1 and vHNF-1 on the human ApoCIII, ApoAI and the rat HNF-1 promoters. Both, HNF-1 and vHNF-1 downregulated transcription driven by these promoters in HepG2 cells. Similar negative effect was observed in HeLa cells, indicating that this regulatory event is not strictly confined to hepatocytes. We present evidence for an indirect mechanism involved in this process.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructions

To clone the HNF-1 promoter, a 40 nucleotide long oligomer corresponding to 1–40 nt region of HNF-1 cDNA (4) was used to screen a rat genomic library by standard hybridization procedures (21). Partial nucleotide sequence analysis of the obtained single clone revealed complete identity with the previously published +50 to –250 nt region of the rat HNF-1 promoter (14). The +44 to –242 nt fragment was isolated by the polymerase chain reaction (PCR) using the appropriate primers, and subcloned into the SmaI/HindIII sites of pUCCAT (22), generating the plasmid HNF-1-CAT. The construction of ApoCIII-CAT and ApoAI-CAT have been previously described (22, 23). pMT-HNF-4, pMT-Arp-1, pMT-Ear-3 and pMT-Ear-2 (19) were generously provided by Dr J. Ladias. Plasmid pRSV-HNF-1 (24) and pRSV-LFB3 (3) were kind gifts from M. Yaniv and V. DeSimone. Throughout this paper we refer LFB3 as vHNF-1, a name more widely used for this protein. pRSV-ΔHNF-1 was obtained by digestion of the pRSV-HNF-1 plasmid with Xho-1, followed by filling in with Klenow fragment and religation.

The chimeric promoter containing plasmids were constructed as follows: first the EcoRI/BglII (–85/+51) fragment of HSV-TK-CAT (25) was blunt ended with Klenow enzyme and ligated to the SmaI site of pUC-CAT. Double stranded synthetic oligonucleotides encompassing the –96 to –61 nt region of the human ApoCIII, the –220 to –190 nt region of the human ApoAI and the –70 to –41 nt region of rat HNF-1 promoter were ligated into the SalI site of this plasmid. CIIB-TK-CAT and AID-TK-CAT contains one copy of the CIIB and AID site in the sense orientation, while HNF1A-TK-CAT contains four copies of the HNF-1A site in front of the thymidine kinase minimal promoter.

The G-less cassette vector p(C2AT)380, (26) was modified by inserting a polylinker region containing XbaI, NsiI, KpnI, BamHI and EcoRV sites in front of the G-less sequence, and a HindIII, XhoI and EcoRI site containing linker downstream of the cassette yielding pGI-1. The –3 to +890 region of the ApoCIII promoter, the –250 to –1 region of the ApoAI promoter and the –240 to –1 region of the HNF-1 promoter was isolated by PCR and subcloned into the BamHI/EcoRV sites of pGI-1 generating the pApoCIII-GI380, pApoAI-GI380 and pHNF-1-GI380 constructs. All clones were verified by nucleotide sequencing using T-7 polymerase (Sequenase).

Cell culture and transfections

Monolayer cultures of HepG2, HeLa and Cos-1 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO)

supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum. Twenty four hours before transfection the cells were seeded at 50–60% confluency. Different amounts of the various constructs were introduced to the cells by the calcium-phosphate DNA coprecipitation method (27). 3 μg of pRSV-β-gal plasmid (28) was included in all experiments to correct for variations in the transfection efficiency. 48 hours later the cells were harvested and lysed by three freeze thaw cycles. Protein concentration was determined by the BioRad protein assay system (29). Chloramphenicol acetyltransferase enzyme activity was assayed using constant amounts of protein as described previously (30). The protein concentrations and incubation times were carefully selected by titration and kinetic experiments to assure the linear conversion of the chloramphenicol to acetylated form. β-galactosidase activity in the cell extracts was measured according to Edlund *et al.* (28), and the values were used to normalize variations in the transfection efficiency.

Electrophoretic mobility shift assays

The following oligonucleotides were used in this study:

AlbPE site: TCGAGTGTGGTTAATGATCTACAGTTA –48
 CIIB site: TCGAGGTCAGCAGGTGACCTTTGCCAGCG –67
 AID site: TCGATCCGCCCCACTGAACCCTTGACCCTCGC –188
 HNF-1A site: TCGAGGCTGAAGTCCAAAGTTTCAGTCCCTTCGC –41

Double stranded oligonucleotides were annealed and radiolabeled by filling in the overhanging ends with T-7 polymerase (Sequenase) in the presence of [α - 32 P]dATP and [α - 32 P]dCTP. The DNA binding reactions were performed in 15 μl volume containing 20 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 4 mM spermidine, 0.02 mM Zn-acetate, 0.1 μg/ml bovine serum albumin, 10% glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 2 μg poly (dI-dC), 5 to 10 μg nuclear extract. Rat liver nuclear extracts were prepared according to Lichsteiner *et al.* (31). When indicated a 100 fold molar excess of cold competitor oligonucleotide was also included. The reaction mixture was incubated on ice for 15 minutes, followed by another 30 minutes incubation in the presence of labelled probe. Antibodies raised against HNF-1 (32), HNF-4 (6) and COUP-TF/Ear-3 (33) were kind gifts from S. Cereghini, M. Zakin and M.J. Tsai. When indicated, 1 μl of these antibodies (diluted at 1:6 ratio in PBS – 1 μg/ml BSA) were preincubated with the nuclear extract at room temperature for 10 minutes before starting the binding reaction. Protein-bound and free probes were resolved by electrophoresis in 4% native polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

In vitro transcription assays

100 to 200 ng of test DNA templates were mixed with 100 ng AdML [180] (34) control template, supplemented with 300 to 400 ng salmon sperm DNA and preincubated with 30 to 50 μg rat liver nuclear extract at room temperature in the presence or absence of 200 ng competitor oligonucleotide or specific antiserum (1 μl of a 1:3 dilution). The reaction mixture (20 μl) contained 25 mM HEPES, pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 35 units RNasin, 0.5 mM DTT, 0.1 mM 3'-O-methyl-GTP, 0.6 mM ATP and CTP, 35 μM UTP, 7 μCi [α - 32 P]UTP (3000 Ci/mmol) and 10% glycerol. Following incubation at 30°C for 45 minutes, the reactions were stopped by the addition of 2.5 μl 6% SDS, 250 mM EDTA, 250 mM Tris-HCl pH 8.0, and 2.5 μl 16mg/ml proteinase K, 0.5 mg/ml tRNA solutions. The samples were digested at 65°C for 20 min, extracted with

phenol/chloroform and precipitated with ethanol. Precipitates were dissolved in formamide/dye loading buffer and electrophoresed in 6% polyacrylamide-7M urea gel. After autoradiography the specific signals were quantitated by densitometry.

RESULTS

HNF-1 and vHNF-1 downregulate ApoCIII, ApoAI and HNF-1 promoters in HepG2 cells

To investigate the possible functional consequences of HNF-1 and vHNF-1 on the transcription of HNF-4 dependent promoters we carried out transient transfection experiments using pRSV-HNF-1 and pRSV-vHNF-1 expression vectors. The regulatory regions of HNF-1, apolipoprotein CIII and apolipoprotein AI genes were studied. We have cloned and characterized the rat HNF-1 promoter, and identified a single cis-acting element at the position of -47 to -69 responsible for its activity. Further studies revealed that HNF-4 can recognize this element and activate transcription *in vivo* and *in vitro*, in agreement with previous reports (13, 14). The promoter elements and factors involved in ApoCIII and ApoAI gene regulation have been extensively studied. *In vitro* mutagenesis and DNA binding analysis revealed that HNF-4 plays a dominant role in the highly complex regulation of these promoters (19, 20, 22, 23). Constant amounts of the ApoCIII-CAT, ApoAI-CAT and HNF-1-CAT reporter constructs were cotransfected with increasing amounts of expression vectors in the human hepatoma cell line HepG2, which contains low levels of HNF-1. Surprisingly RSV-HNF-1 inhibited the promoter activity of ApoCIII, ApoAI and HNF-1 to 3%, 20% and 8% of the control respectively (Fig. 1). Similar negative effect was observed when CMV promoter driven HNF-1 expression was used (data not shown). Cotransfection with pRSV-vHNF-1 also reduced the activity of these promoters, albeit at somewhat lower degree: inhibition to 18% for ApoCIII, to 30% for ApoAI and to 30% for HNF-1 promoter was observed (Fig. 1). This effect was quite unexpected since HNF-1 is considered as a positive activator for its target genes studied so far. Moreover close inspection of the nucleotide sequences of our promoters did not reveal any motif resembling to the HNF-1 and vHNF-1 consensus recognition site GTTAATNATTAAC (5), present in the promoter regions of HNF-1 regulated genes. To exclude the possibility of an artefact, we performed the assays several times with different plasmid preparations, and have consistently obtained similar results. Control experiments performed with empty RSV promoter vector or RSV driven vector containing other transcription factor (such as NF-1) did not influence either the ApoCIII, ApoAI and HNF-1 promoter activity or the absolute β -galactosidase activity (data not shown). Moreover, both RSV-HNF-1 and RSV-vHNF1 activated the albumin promoter containing reporter (AlbCAT) approximately 28 and 20 fold (Fig. 1D), excluding the possibility of an experimental artefact generated by the expression vectors used. The results indicate that the repression of HNF-1, ApoCIII and ApoAI promoters was specifically exerted by elevated active HNF-1 and vHNF-1 protein levels in our transfection experiments. The notion is further supported by cotransfection experiments with pRSV- Δ HNF-1. Deletion of the region corresponding to amino acid residues 18 to 53 in this vector disrupts the dimerization domain of HNF-1 resulting in the expression of a truncated protein with intact POU-homeo and transactivation domains, which is unable to bind DNA (24).

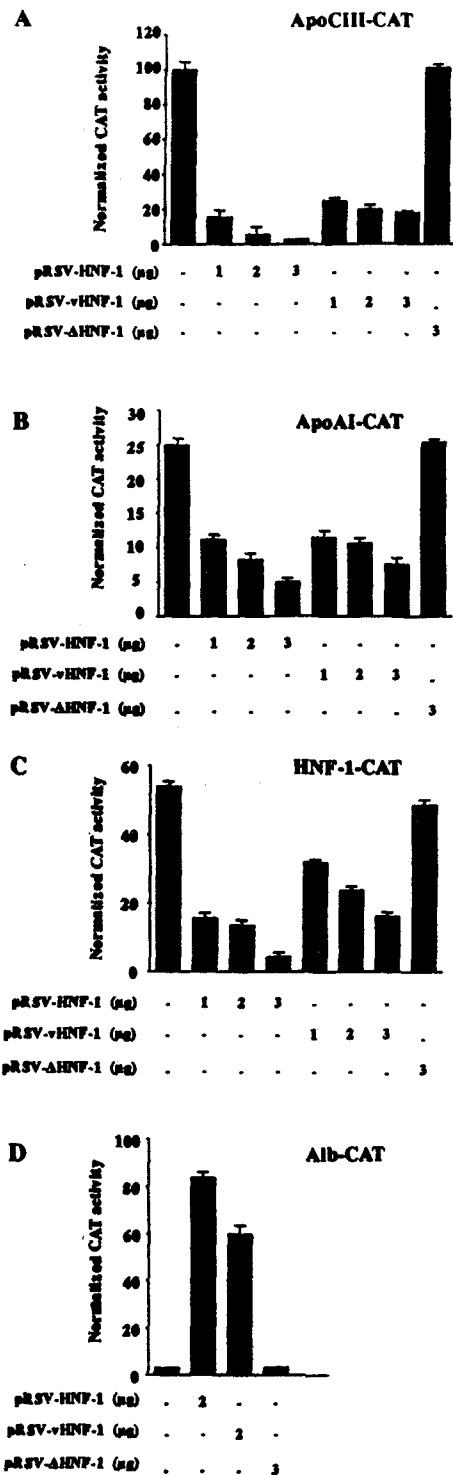


Figure 1. Negative regulation of ApoCIII, ApoAI and HNF-1 promoters by HNF-1 and vHNF-1. HepG2 cells were cotransfected with different amounts (1, 2 and 3 μ g) of pRSV-HNF-1, pRSV-vHNF-1 and pRSV- Δ HNF-1 expression vectors and 2 μ g of ApoCIII-CAT (A), ApoAI-CAT (B), HNF-1-CAT (C) and Albumin-CAT (D) reporter plasmids. The column graphs represent mean values plus standard errors of the β -gal normalized chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activities from at least six independent experiments. All values are expressed as the percentage of the activity obtained with ApoCIII-CAT (100%), that equalled to ~15% of pRSV-CAT derived activity. Note the different scale of the ordinates!

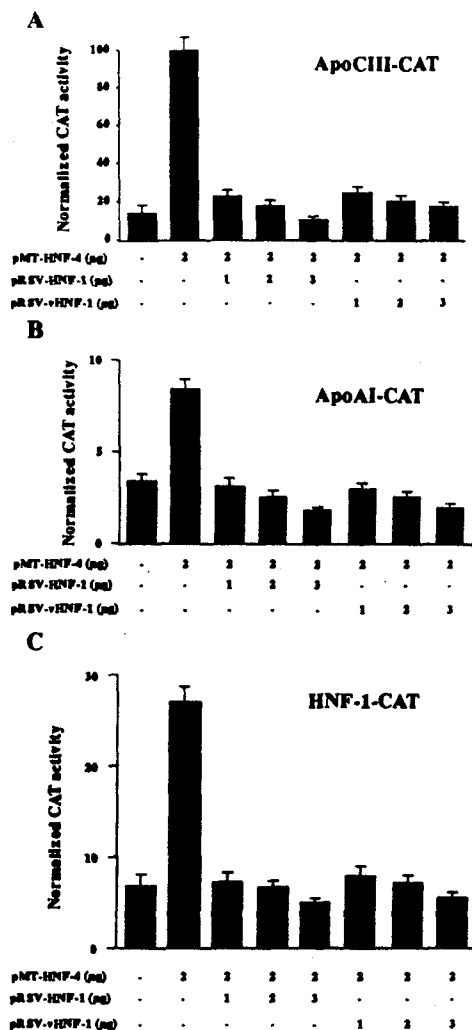


Figure 2. Inhibition of HNF-4 activated transcription by HNF-1 and vHNF-1. CAT assays were performed with extracts of HepG2 cells cotransfected with constant amounts (2 μg) of ApoCIII-CAT (A), ApoAI-CAT (B), and HNF-1-CAT (C) reporter plasmids and the indicated amounts of pMT-HNF-4, pRSV-HNF-1 and pRSV-vHNF-1. The bar graphs represent mean values and standard errors of normalized CAT activities from four independent experiments. Values are expressed as a percentage of HNF-4 induced ApoCIII-CAT activity (100%). Note the different scale of the ordinates!

Cotransfection of this mutant did not affect ApoCIII, ApoAI, HNF-1 and albumin promoter activity (Fig. 1. A,B,C and D).

HNF-1 and vHNF-1 repress HNF-4 induced transactivation

The only known common feature of the three promoters studied in this work is their positive regulation by the transcription factor HNF-4 (13, 19, 20 and Fig. 2). Therefore, we tested whether HNF-1 and vHNF-1 affect HNF-4 dependent transactivation of these genes in hepatic cells. Fig. 2 shows cotransfection experiments performed with pMTHNF-4 plasmid, an expression vector containing the rat HNF-4 cDNA driven by the adenovirus major late promoter. HNF-1 does not influence this promoter as evidenced by *in vitro* transcription assays (14 and Fig. 6) and by transfection experiments assessing the activity of pMT-C/EBP (data not shown). pMTHNF-4 activated transcription driven by the ApoCIII, ApoAI and HNF-1 regulatory regions 6.9, 2.4 and

3.8 fold respectively. This increased activity dropped to the level of 11% – 25% when pRSV-HNF-1 or pRSV-vHNF-1 were also introduced in the cells alongside pMTHNF-4. These results suggested that the mode of action of HNF-1 and vHNF-1 may involve a mechanism that prevents HNF-4 mediated activation. Consistent with this notion is the direct correlation between the degree of HNF-1 mediated repression and the HNF-4 induced activation. It followed strictly the order: ApoCIII > HNF-1 > ApoAI (Fig. 1 and Fig. 2). To further corroborate the above hypothesis we introduced mutations into the HNF-4 binding sites of these promoters, and tested for HNF-1 and vHNF-1 dependent transrepression. This approach, however, turned out to be unsuccessful, since mutations that entirely abolished HNF-4 binding, diminished promoter activity to experimentally hardly measurable levels, making unreliable the detection of repression (data not shown). Another approach to characterize the function of a particular cis-acting DNA element is studying its effect on transcription when linked to a heterologous promoter. We have subcloned the HNF-4 binding sites derived from the ApoCIII, ApoAI and HNF-1 promoters (CIIB, AID, HNF-1A) in front of the minimal regulatory region (-89 to +51 nt) of the HSV thymidine kinase gene linked to the CAT cDNA, thus generating the constructs CIIB-TK-CAT, AID-TK-CAT and HNF-1A-TK-CAT. As expected, these sites enhanced hepatic transcription driven by the thymidine kinase promoter. HNF-4 further activated transcription from these chimeric constructs 5 to 7 fold (Fig. 3). Cotransfection with pRSV-HNF-1 or pRSV-vHNF-1 reduced HNF-4 mediated transactivation to the level of 20 to 40% (Fig. 3).

Taken together, these data clearly demonstrate that HNF-1 and vHNF-1 act through the HNF-4 binding site, leading to the repression of HNF-4 induced transcriptional activation.

Negative regulation by HNF-1 and vHNF-1 involves an indirect mechanism

The functional significance of the HNF-4 binding sites observed in the above experiments, raised the question whether HNF-1 and vHNF-1 may exert their effects via a direct or indirect interaction with these elements. A series of *in vitro* experiments were carried out to test this possibility. Direct binding of HNF-1 to CIIB, AID, and HNF-1A site was first evaluated by mobility shift assays using proteins expressed in Cos-1 cells. HNF-1 formed a DNA-protein complex only with the albumin proximal element (AlbPE) but not with CIIB, AID, or HNF-1A probes, and no evidence for dimerization between HNF-1 and HNF-4 was observed in mixing experiments (data not shown). Although the above results argue against the direct binding of HNF-1 to HNF-4 recognition sites or heterodimerization between HNF-1 and HNF-4, one can still speculate that in hepatic cells as a consequence of cell specific posttranslational modifications and/or by the aid of another intermediate protein this type of interaction may occur. To this end we performed mobility shift assays using rat liver and/or HepG2 nuclear extracts. To identify the possible participation of HNF-1 or vHNF-1 in the retarded complex obtained with HNF-4 binding sites, we included excess of AlbPE competitor oligonucleotide or polyclonal antibody raised against HNF-1 in the binding reaction. If *in vitro* HNF-1-HNF-4 interaction occurs in hepatic cell extracts, an alteration in the mobility of the HNF-4-DNA complexes would be expected. As seen in Fig. 4 only the complex formed on AlbPE probe reacted with HNF-1 antiserum giving rise to a double band with lower mobility. The antibody did not 'supershift' any part of the

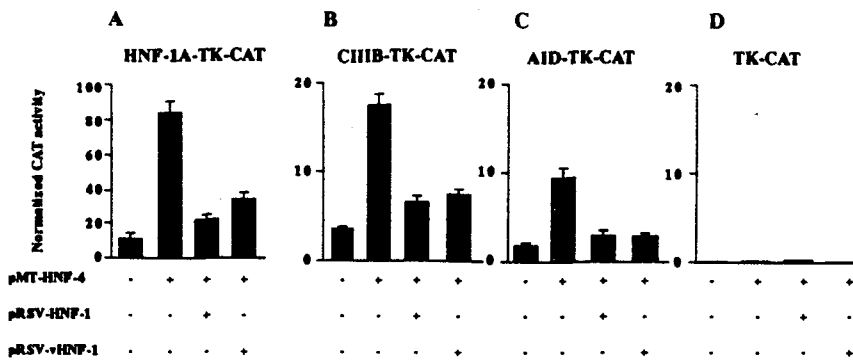


Figure 3. Effects of HNF-1 and vHNF-1 on HNF-4 activated transcription of chimeric constructs. HepG-2 cells were transfected with 5 μ g of HNF-1-A-TK-CAT (A), CIIB-TK-CAT (B), AID-TK-CAT (C) and TK-CAT (D) reporter plasmids in the presence (+) or absence (-) of 2 μ g pMT-HNF-4, pRSV-HNF-1 and pRSV-vHNF-1. HNF-1A-TK-CAT contains four copies of HNF-1A site, CIIB-TK-CAT and AID-TK-CAT contains one copy of CIIB and AID site in front of the thymidine kinase basal promoter vector (TK-CAT). The graphs represent mean values and standard errors of normalized CAT activities from at least three independent transfection experiments. The data are expressed as the percentage of normalized CAT activity obtained with pRSV-CAT. Note the different scale of the ordinates!

signal obtained with CIIB, AID or HNF-1A probe, and more importantly it did not cause detectable alterations in the electrophoretic profile of these complexes (Fig. 4 B, C and D). Similarly, the high affinity binding site for HNF-1 (AlbPE) did not compete or alter the specific complexes formed on these probes. Therefore, we concluded that HNF-1 itself does not interact directly or via intermediary proteins with HNF-4 recognition sites *in vitro*.

Functional evidence for the indirect mechanism involved in HNF-1 mediated downregulation of the ApoCIII, ApoAI and HNF-1 promoters were provided by cell free transcription experiments. This system is an invaluable tool to study the function of regulatory proteins on naked templates. Using antibodies or competitor oligonucleotides, one can rapidly assess the function of a particular factor in transcription. It was of interest to see how the 'removal' of HNF-1 or vHNF-1 from the transcriptionally active nuclear extract would influence the *in vitro* activity of our promoters. The pApoCIII-GI380, pApoAI-GI380 and pHNF-1-GI380 templates were incubated with rat liver nuclear extracts pretreated with antibodies raised against HNF-4 and HNF-1, or double stranded oligonucleotides encompassing the appropriate HNF-4 binding sites, or the high affinity HNF-1 binding site AlbPE. As expected, specific inhibition of transcription was observed either when the HNF-4 binding sites (CIIB, AID and HNF-1A), or HNF-4 antiserum was added to the reaction (Fig. 5). In contrast, neither the AlbPE competitor nor the antibody raised against HNF-1 increased the *in vitro* activity of these constructs, an effect that would be expected if HNF-1 acted directly or through preexisting proteins in the nuclear extract.

These results further substantiate the conclusion drawn in the previous section regarding the dispensability of promoter elements outside the HNF-4 recognition sites for HNF-1 induced repression, and the indirect nature of HNF-1 action.

HNF-1 and vHNF-1 mediated repression is not restricted to hepatocytes

The biological significance of the above observations, prompted us to examine whether the mechanism involved in this negative regulation is specific to hepatocytes. We have utilized cotransfection assays employing HeLa cells to reexamine the

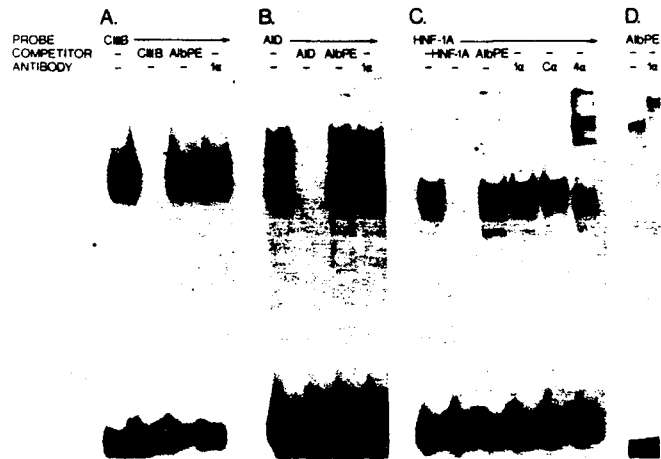


Figure 4. Lack of *in vitro* interaction between HNF-1 and HNF-4 in rat liver nuclear extracts. Mobility shift experiments were performed with rat liver nuclear extracts (10 μ g total protein/assay) and labelled CIIB (A), AID (B), HNF-1A (C) or AlbPE (D) probes. Where indicated 100 fold molar excess of cold competitor oligonucleotides, or 1 μ l HNF-1-(1 α), COUP-TF-(C α); HNF-4- (4 α) antiserum (1:6 dilution) was included in the reaction.

effect of HNF-1 and vHNF-1 in a nonhepatic system. HeLa cells are particularly suited to our task, since they express neither the transcription factors nor the target genes employed in this study. Furthermore, no liver specific modification is necessary for HNF-4 function (6), enabling the measurement of the activity of certain hepatic promoters in HNF-4 transfected HeLa cells. As expected, HNF-4 was able to stimulate transcription from ApoCIII and HNF-1 promoters 60 and 10 fold above the basal level (Fig. 6). No activation was observed on the ApoAI promoter, suggesting that other important factor(s) required for its activity is missing from these cells (data not shown). Both HNF-1 and vHNF-1 reduced HNF-4 mediated transactivation of HNF-1 and ApoCIII promoters to 23%–26%, and to 8%–22% respectively (Fig. 6). These results strongly support the notion, that the mechanism involved in HNF-1 induced downregulation of HNF-4 dependent genes is not specific to the liver.

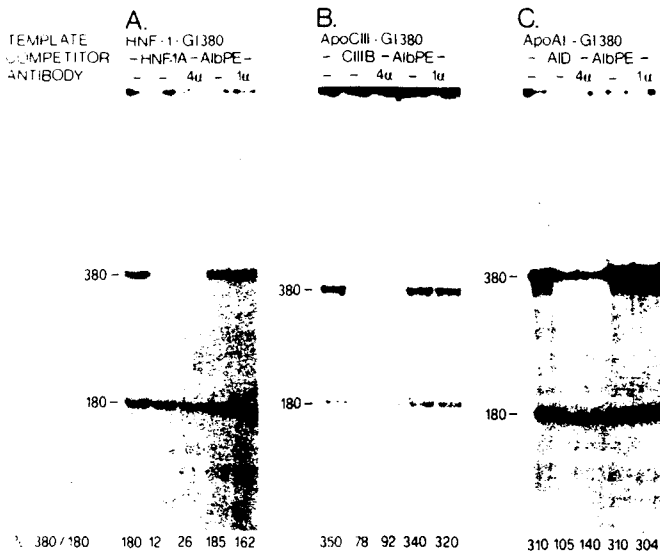


Figure 5. HNF-1 and vHNF-1 do not affect cell free transcription driven by the HNF-1, ApoCIII and ApoAI promoters in normal rat liver nuclear extracts. 200 ngs of HNF-1-G1380 (A), ApoAI-G1380 (C) and 100 ng of ApoCIII-G1380 (B) were incubated for *in vitro* transcription with normal rat liver nuclear extracts. 100 ng of AdML(180) plasmid was included in all reactions as an internal control. Where indicated, the nuclear extracts (30–40 μ g) were preincubated with 200 ng competitor oligonucleotides (HNF-1A, CIII B, AID or AibPE), or 2 μ l HNF-1 (1 α) and HNF-4 (4 α) antibodies (1:3 dilution). The transcription signals obtained with the HNF-1, ApoCIII and ApoAI promoters (380 bp), and the AdML promoter (180 bp), were quantitated by densitometry scanning of the autoradiograms. The data (at the bottom) are expressed as a percentage of the control AdML promoter activity (380/180 \times 100).

DISCUSSION

HNF-1 and HNF-4 are two nuclear proteins essential for the transcription of a wide range of liver specific genes (19, 5, 6). Given the large number of liver specific genes they control, HNF-1 and HNF-4 are considered as two of the most prominent transcription factors responsible for the establishment and maintenance of hepatocyte specific phenotype. Therefore, deciphering the mechanism controlling the expression of these two factors is of paramount importance in understanding the biological events governing liver specificity. In this work we describe a negative autoregulatory mechanism by which HNF-1 may influence the transcription rate of its own gene, and other HNF-4 dependent genes. The regulatory regions of HNF-1, and two HNF-4 dependent downstream genes ApoCIII and ApoAI were investigated in parallel. We found that HNF-1 and its functional homologue vHNF-1 downregulated transcription driven by the ApoCIII, ApoAI and HNF-1 promoters in HepG2 cells. This finding is in contradiction with the results reported recently by N. Myura and K. Tanaka (35). They propose that HNF-1 may bind to the -25 to -3 nt region of its own promoter, and works synergistically with HNF-4. Our results are more consistent with two previous reports (13, 14), identifying this region as the TATA box, and the lack of HNF-1 binding and direct action on the -242 to +44 nt promoter region (14, and Fig. 5). The difference observed in the transactivation assays could be due to the different cell line (P19), or promoter vectors used in the report (35).

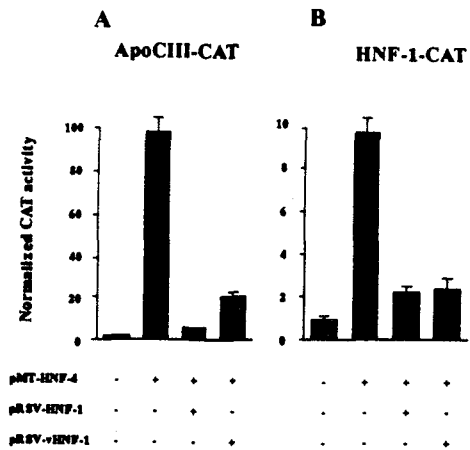


Figure 6. HNF-1 and vHNF-1 downregulate HNF-4 activated transcription in HeLa cells. HeLa cells were transfected with 2 μ g ApoCIII-CAT and HNF-1-CAT reporter plasmids, combined with 2 μ g pMT-HNF-4, pRSV-HNF-1 or pRSV-vHNF-1 expression vectors. The columns represent mean values and standard errors of CAT activities obtained from three independent experiments. The values are expressed as the percentage of HNF-4 induced ApoCIII-CAT activity (100%).

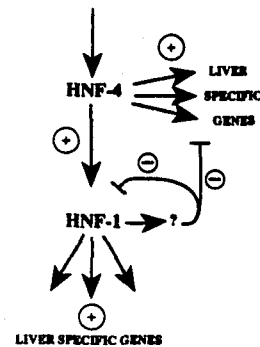


Figure 7. Schematic representation of the proposed positive (+) and negative (-) regulatory pathways.

The lack of HNF-1 binding to the ApoCIII, ApoAI and HNF-1 promoters suggested that the negative regulation by HNF-1 may involve an indirect mechanism. Considering the common feature in the regulation of these genes, i.e. the absolute requirement of HNF-4 for their activity, as evidenced by *in vitro* transcription, and *in vivo* transactivation experiments, we suspected that downregulation by HNF-1 and vHNF-1 may be achieved by the inhibition of HNF-4 dependent transcription in general. Our demonstration that both HNF-1 and vHNF-1 repressed HNF-4 dependent transactivation of all three promoters strongly supports this notion. More impressively, the same inhibitory effect was observed in experiments employing chimeric constructs carrying the appropriate HNF-4 binding sites linked to the minimal promoter region of the thymidine kinase gene. Since hepatic transcription from these templates was solely dependent on the interaction of HNF-4 with its binding site, these findings clearly established that HNF-1 and vHNF-1 must exert their effects by counteracting HNF-4 activation. The intrinsic capability of these

cis-elements to confer both HNF-4 dependent activation and HNF-1 mediated repression, raised the expectation that HNF-1 and vHNF-1 may interact directly or indirectly with the HNF-4 binding sites. By definition, indirect interaction would mean the formation of a protein-protein complex between HNF-1 and HNF-4 either by heterodimerization or through a third intermediary protein. Precedent cases for the existence of such protein-protein interactions have been described. Well known examples are the association of transcription intermediary factors (TIFs) with the progesterone receptor (36), the VP16-Oct-1 complex (37), Sp-1 multimers (38) or the 'coactivators' and 'tethering factors' bridging distally bound transcription factors with the general transcriptional machinery (39, 40). Several lines of evidence presented in this paper suggest that no such type of interaction exists between HNF-1 and HNF-4 *in vitro*. Direct binding of HNF-1 to HNF-4 recognition sites, or dimerization of HNF-1 and HNF-4 was ruled out by *in vitro* DNA binding experiments. In addition neither HNF-1 antibodies nor excess AlbPE competitor oligonucleotide increased the transcription driven by the ApoCIII, ApoAI and HNF-1 promoters in a cell free transcription system, an effect that would be expected if HNF-1 acted directly or via preexisting factors in the nuclear extracts. These findings strongly argue against but not entirely exclude the possible existence of an HNF-1-HNF-4 interaction *in vivo*. This putative complex could be unstable or undetectable under our *in vitro* experimental conditions. However, considering the completely different structural domains required for dimerization of these two proteins—myosine like in HNF-1 (41) and steroid receptor like in HNF-4 (6)—combined with our negative results of different approaches, the *in vivo* existence of such an interaction seems unlikely. The results discussed above do not exclude entirely the possibility of the so called 'squenching phenomenon' (42, 43) as an interpretation of the data obtained in our transfection experiments. High levels of HNF-1 may nonspecifically titrate out cellular targets from the regulatory regions, thus interfering with HNF-4 transcription function. The finding that a mutant HNF-1 ($\Delta 18-53$ aa) was unable to repress the activity of the studied promoters argues against this possibility.

Our demonstration that negative regulation by HNF-1 requires a fully functional protein with respect to DNA binding and transactivation properties, invokes its action through binding to another gene, suggesting the involvement of a multistep mechanism triggered by increased intracellular levels of this transcription factor. It is tempting to speculate that negative regulation by HNF-1 may involve a process that activates the recently proposed extinguishing locus in chromosome 1 (13), eventually leading to decreased HNF-4 expression. Our finding however, that HNF-1 and vHNF-1 repressed the transcription mediated by both endogenous and expression vector derived HNF-4 argues against this hypothesis. More consistent with our results would be a mechanism that involves post-translational modification of HNF-4 affecting its activity or nuclear localization. The key role of phosphorylation in DNA binding, transactivation or nuclear translocation has been ascribed to a number of transcription factors, including AP-1 (44), Oct-1 (45), GHF1/Pit1 (46), the cAMP response element binding protein (47), NF κ B/I κ B (48), NF-IL6 (49) and ISGF3 (50). Incidentally, there are at least three threonine/serine rich regions present in the HNF-4 molecule, which are potential casein kinase II phosphorylation sites (6). Whether phosphorylation or dephosphorylation is required for HNF-4 activity remains to be determined. It should be emphasized however that if

posttranslational modification of HNF-4 plays a role in its regulation, it can not be a liver specific process, since HNF-4 transactivated the ApoCIII and HNF-1 promoters in HeLa cells. In addition, the negative effect of HNF-1 and vHNF-1 on HNF-4 mediated transactivation could also be reproduced in this extrahepatic cell line, excluding the existence of a liver specific mechanism. Another possible hypothesis would assume the activation of a negative factor by HNF-1 and vHNF-1 antagonizing HNF-4 action on the studied promoters. Recent studies have identified three such negatively transacting factors Arp-1, Ear-3 and Ear-2 which compete with HNF-4 for the common binding site on ApoAI and ApoCIII promoters resulting in a sharp decrease of transcription (19, 20, 51). However neither Arp-1, nor Ear-3 and Ear-2 binds to or affects transcription driven by the HNF-1 promoter (Fig. 4C and data not shown). Therefore, if we assume the involvement of a common mechanism in HNF-1 mediated downregulation of ApoCIII, ApoAI and HNF-1 genes, these factors are not likely to participate in it. Nevertheless, we can not formally exclude the involvement of an as yet unidentified negative factor in this process. Several other regulatory proteins that converge to the HNF-4 binding sites of ApoCIII and ApoAI promoters (52, 53) have not yet been characterized in this context.

The conclusions drawn from our results are summarized in a model presented in Fig. 7. According to this model we propose an indirect negative autoregulatory loop involved in HNF-1 gene regulation. This negative effect is achieved via a multistep process, initially induced by elevated levels of HNF-1 and eventually leading to the inhibition of HNF-4 mediated activation of its own gene, and other HNF-4 dependent downstream genes. On the other hand HNF-1 activates a variety of promoters carrying its consensus recognition site. The model exemplifies a regulatory network by which the same transcription factor orchestrates the coordinated expression of two otherwise unrelated groups of liver specific genes. Whether this regulatory circuit functions predominantly in cell lines (e.g. HepG2) expressing gene products characteristic to the fetal rather than the adult hepatic phenotype (54), needs further investigation.

The involvement of autoregulation in the control of cell specific gene expression has been extensively studied in invertebrates. The complex genetic programme that guides the development of *Drosophila melanogaster* involves sequential cascades of transcription factors (55). A number of crossregulatory and autoregulatory actions have been described to control the accurate temporal induction of several proteins involved in the formation of body structures (56-58). The growing number of homologous mammalian transcription factors suggested that similar control mechanisms might exist in eukaryotes. Indeed, detailed functional analysis of erythrocyte specific GATA-1 (59), the muscle specific MyoD (60), the pituitary specific Pit-1/GHF (61) and the hepatic HNF-3 β (62) promoters revealed that these factors positively regulate their own transcription. Positive autoregulation may ensure the high level expression of these factors once their gene is turned on. In contrast, the negative autoregulatory loop described in this study may serve as a mechanism for the maintenance of balanced intracellular concentrations of HNF-1. The mechanism involved in HNF-1 autoregulation has a broader biological significance, since HNF-1 concurrently downregulates a distinct class of liver specific genes whose transcription is driven by the same factor (HNF-4) which regulates its own gene. This implies that the actual intracellular concentration of HNF-1 may play a central role in the fine tuning of hepatocyte specific gene expression.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr J. Ladias, Dr S. Karathanasis, Dr M. Yaniv and Dr V. DeSimone for providing the expression vectors used in this study; Dr S. Cereghini, Dr M. Zakin and Dr M.J. Tsai for the HNF-1, HNF-4 and COUP-TF antibodies. We are grateful to N. Katrakili for the expert technical assistance, Dr F.C. Kafatos, Dr N. Ktistakis, Dr J. Papamatheakis and Dr G. Thireos for critical reading of the manuscript. This work was supported by an EEC grant (BIOT-CT91-0260), and the Greek General Secretariat for Science and Technology.

REFERENCES

- Bach, I., Mattei, M.-G., Cereghini, S. and Yaniv, M. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3553–3559.
- Baumhueter, S., Mendel, D.B., Conley, P.B., Kuo, C.J., Turk, C., Graves, M.K., Edwards, C.A., Courtois, G. and Crabtree, G.R. (1990) *Genes Dev.*, **4**, 372–379.
- De Simone, V., De Magistris, L., Lazzaro, D., Gerstner, J., Monaci, P., Nicosia, A. and Cortese, R. (1991) *EMBO J.*, **10**, 1435–1443.
- Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stampfli, S., Frank, R. and Cortese, R. (1989) *Cell*, **59**, 145–157.
- Mendel, D.B. and Crabtree, G.R. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 677–680.
- Sladek, F.M., Zhong, W., Lai, E. and Darnell, J.E. (1990) *Genes Dev.*, **4**, 2353–2365.
- Cao, Z., Umek, M. and McKnight, S.L. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 1538–1552.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J. and McKnight, S.L. (1988) *Genes Dev.*, **5**, 786–800.
- Poli, V., Mancini, F.P. and Cortese, R. (1990) *Cell*, **63**, 643–653.
- Williams, S.C., Cantwell, C.A. and Johnson, P.F. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 1553–1567.
- Lai, E., Prezioso, V.R., Tao, W., Chen, W.S. and Darnell, J.E. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 416–427.
- Xanthopoulos, K.G., Prezioso, V.R., Chen, W.S., Sladek, F.M., Cortese, R. and Darnell, J.E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 3807–3811.
- Kuo, C.J., Conley, P.B., Chen, L., Sladek, F.M., Darnell, J.E. and Crabtree, G.R. (1992) *Nature*, **355**, 457–461.
- Tian, H.-M., Schibler, U. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 2225–2234.
- Mendel, D.B., Hansen, L.P., Graves, M.K., Conley, P.B. and Crabtree, G.R. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 1042–1056.
- Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M. and Cereghini, S. (1991) *EMBO J.*, **10**, 1445–1457.
- Cereghini, S., Yaniv, M. and Cortese, R. (1990) *EMBO J.*, **9**, 2257–2263.
- Kuo, C.J., Mendel, D.B., Hansen, L.P. and Crabtree, G.R. (1991) *EMBO J.*, **10**, 2231–2236.
- Ladias, J.A.A., Cladaras-Hadzopoulou, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V.I. and Cladaras, C. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 15849–15860.
- Mietus-Snyder, M., Sladek, F.M., Ginsburg, G.S., Kuo, C.F., Ladias, J.A.A., Darnell, J.E. and Karathanasis, S.K. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1708–1718.
- Sambrook, J., Fritsch, J.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: Laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Ogami, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C. and Zannis, V.I. (1991) *J. Biol. Chem.*, **265**, 9808–9815.
- Papazafiri, P., Ogami, K., Ramji, D.P., Nicosia, A., Monaci, P., Cladaras, C. and Zannis, V.I. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 5790–5797.
- Chouard, T., Blumenfeld, M., Bach, I., Vandekerckhove, J., Cereghini, S. and Yaniv, M. (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 5853–5863.
- Cato, A.C.B., Miksicsek, R., Schutz, J., Arnermann, J. and Beato, M. (1986) *EMBO J.*, **5**, 2237–2240.
- Monaci, P., Nicosia, A. and Cortese, R. (1988) *EMBO J.*, **7**, 2075–2087.
- Graham, F.L. and Van der Eb, A.J. (1973) *Virology*, **52**, 456–467.
- Edlund, T., Walker, M.D., Barr, P.J. and Rutter, W.J. (1985) *Science*, **230**, 912–916.
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. (1982) *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044–1051.
- Lichsteiner, S. and Schibler, U. (1989) *Cell*, **57**, 1179–1187.
- Cereghini, S., Ott, M.O., Power, S. and Maurey, M. (1992) *Development*, **116**, 783–797.
- Wang, L.H., Tsai, S.Y., Cook, R.G., Beattie, W.G., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1989) *Nature*, **340**, 163–166.
- Sawadogo, M. and Roeder, R.G. (1985) *Cell*, **43**, 165–175.
- Myura, N. and Tanaka, K. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3731–3736.
- Shemshedini, L., Ji, J., Brou, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1991) *J. Biol. Chem.*, **267**, 1834–1839.
- Stern, S., Tanaka, M. and Herr, W. (1989) *Nature*, **341**, 624–630.
- Pascal, E. and Tjian, R. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 1646–1656.
- Dynlacht, B.D., Hoey, T. and Tjian, R. (1991) *Cell*, **66**, 563–576.
- Pugh, F.B. and Tjian, R. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 1935–1945.
- Nicosia, A., Monaci, P., Tomei, L., DeFrancesco, R., Nuzzo, M., Stunnenberg, H. and Cortese, R. (1990) *Cell*, **61**, 1225–1236.
- Gill, G. and Ptashne, M. (1988) *Nature*, **334**, 721–724.
- Tasset, D., Tora, L., Fromental, C., Scheer, E. and Chambon, P. (1990) *Cell*, **62**, 1177–1187.
- Boyle, W.J., Smeal, T., Defize, L.H.K., Angel, P., Woodgett, J.R., Karin, M. and Hunter, T. (1991) *Cell*, **64**, 573–584.
- Segil, N., Roberts, S.B. and Heintz, N. (1991) *Science*, **254**, 1814–1816.
- Kaploff, M.S., Farkash, Y., Wegner, M. and Rosenfield, M.G. (1991) *Science*, **253**, 786–789.
- Yamamoto, K.K., Gonzales, G.A., Biggs, W.H. and Montminy, M.R. (1988) *Nature*, **334**, 494–498.
- Kerr, L.D., Inoue, J., Davis, N., Link, E., Baeuerle, P., Bose, H.R. and Verma, I.M. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 1464–1476.
- Metz, R. and Ziff, E. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 1754–1766.
- Kessler, D.S., Veals, S.A., Fu, X.Y. and Levy, D.E. (1990) *Genes Dev.*, **4**, 1753–1765.
- Widom, R.L., Ladias, J.A.A., Kouidou, S. and Karathanasis, S.K. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 677–687.
- Ogami, K., Kardassis, D., Cladaras, C. and Zannis, V.I. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 9640–9646.
- Rottman, J.N., Widom, R.L., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. and Karathanasis, S.K. (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3814–3820.
- Rollier, A., DiPersio, C.M., Cereghini, S., Stevens, K., Tronche, F., Zaret, K. and Weiss, M.C. (1993) *Mol. Biol. Cell*, **4**, 56–69.
- Levine, M. and Hoey, T. (1988) *Cell*, **55**, 537–540.
- Bergson, C. and McGinnis, W. (1990) *EMBO J.*, **9**, 4287–4297.
- Krasnow, M.A., Saffman, E.E., Kornfeld, K. and Hogness, D.S. (1989) *Cell*, **57**, 1031–1043.
- Winslow, G.M., Hayashi, S., Krasnow, M., Hogness, D.S. and Scott, M.P. (1989) *Cell*, **57**, 1017–1030.
- Tsai, S.-F., Strauss, E. and Orkin, S.H. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 919–931.
- Thayer, M.J., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Wright, W.E., Lassar, A.B. and Weintraub, H. (1989) *Cell*, **58**, 241–248.
- Chen, R., Ingraham, H.A., Treacy, M.N., Albert, V.R., Wilson, L. and Rosenfeld, M.G. (1990) *Nature*, **346**, 583–586.
- Pani, L., Qian, X., Clevidence, D. and Costa, R.H. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 552–562.

Activation of CAAT Enhancer-binding Protein δ (C/EBP δ) by Interleukin-1 Negatively Influences Apolipoprotein C-III Expression*

(Received for publication, March 4, 1997, and in revised form, June 27, 1997)

Jean-Marc Lacorte^{†§¶}, Eleni Ktistaki[‡], Anne Beigneux[§], Vassilis I. Zannis[‡], Jean Chambaz[§], and Iannis Talianidis^{¶||}

From the [‡]Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, P. O. Box 1527, Herakleion 711 10, Crete, Greece and the [§]URA-CNRS1283, Institute des Cordeliers, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

Tissue-specific transcription of the apolipoprotein C-III (apoC-III) gene is mainly regulated by synergistic interactions between the liver-enriched transcription factor HNF-4, which binds to the proximal promoter, and ubiquitous factors, which bind to the upstream enhancer region. Here we show that apoC-III expression in HepG2 cells is negatively regulated in response to interleukin-1 (IL-1), and this inhibition is mainly due to transcriptional repression. CAAT enhancer-binding protein δ (C/EBP δ) was found to be the main mediator of IL-1-induced suppression. Analysis of the apoC-III promoter revealed two IL-1 response elements. The first is located in the proximal promoter region D and the second in the distal enhancer region I. Proximal element D is a high affinity binding site for C/EBP δ , while the enhancer element I is not directly recognized by this transcription factor. Functional analysis of different combinations of homologous and heterologous promoter constructs revealed that indirect interaction of C/EBP δ with site I, in the context of the full promoter, leads to repression. C/EBP δ is activated by phosphorylation during IL-1-induced signal transduction pathway. This modification is important for both DNA binding activity and indirect transrepression of the apoC-III promoter.

Systematic injury, or infections, trigger a complex series of regulatory mechanisms that eventually lead to dramatic alterations in the serum levels of several proteins that are predominantly synthesized in the liver (1, 2). These characteristic changes involving proteins that have protective or regulatory roles in the inflammatory response define the hepatic acute phase reaction, an important host defense mechanism to maintain physiological homeostasis, prior to the onset of the immune response (3–5). A number of cytokines, such as interleukin-1 (IL-1),¹ interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor,

which are released from activated monocytes and macrophages, transmit their signals to hepatocytes through binding to specific cell surface receptors. These interactions trigger a multistep process eventually leading to the activation of distinct combinations of a small subset of transcription factors that recognize well defined response elements in the promoters of acute phase genes (6). Members of the C/EBP, STAT, and NF κ B transcription factor family, or combinations of them, have been implicated as the main mediators of the cytokine-induced activation of several hepatic genes including C-reactive protein (7), hemopexin (8, 9), haptoglobin (10, 11), α_2 -macroglobulin (12, 13), serum amyloid A (14–18), α_1 -acid glycoprotein (19), and the third component of complement (C3) (20, 21).

Previous studies on the IL-1-dependent regulation of several hepatic genes have shown that the main mediators of the response belong to different gene families, including members of the NF κ B (22) and C/EBP (23–26) family. NF κ B has been found to be involved in the IL-1-mediated regulation of complement factor B (27), angiotensinogen (28), and serum amyloid A (14) genes. C/EBP proteins have been demonstrated to play an important role in the IL-1-dependent activation of the IL-6 gene (24), the complement 3 gene (20), and serum amyloid A gene (18). Of particular interest is the recent finding that NF κ B can physically interact with C/EBP proteins (29, 30). The functional consequence of this association can be either synergistic activation (14, 16, 30, 31) or inhibition of NF κ B-mediated transactivation by C/EBP proteins (28).

The recent finding of a potential NF κ B binding site in the proximal region of the apoC-III promoter (32) raised the possibility that the expression of this gene may be modulated during the IL-1 signaling pathway. ApoC-III is a major component of chylomicrons and very low density lipoprotein particles and a minor component of HDL. *In vitro*, ApoC-III inhibits the hydrolysis of triglycerides by lipoprotein lipase (33), and it causes the inhibition of apoE-mediated clearance of lipoproteins from the serum (34), suggesting that it plays a critical role in the regulation of plasma triglyceride levels through its effect on the catabolism of lipoproteins (35–37). Therefore changes in apoC-III expression levels in response to extracellular signals may have important physiological consequences.

In this paper we demonstrate that IL-1 treatment of HepG2 cells causes an inhibition of apoC-III expression. We present evidence that C/EBP δ is the main mediator of the IL-1-dependent down-regulation of apoC-III transcription. We propose a mechanism that involves disruption of the synergistic interactions between enhancer binding factors and HNF-4, as a result of indirect interaction of C/EBP δ with the I element of the apoC-III enhancer.

* This work was supported by European Union Grant BIOT-CT91-0260, the Greek General Secretariat for Science and Technology, Greek Ministry of Health Grant KESY94E463, and by grants from CNRS and the French Ministry of Education and Research. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ Supported by European Union Human Capital and Mobility Post-doctoral Fellowship CT920081.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 30-81-391100; Fax: 30-81-391101.

¹ The abbreviations used are: IL, interleukin; AdML, adenovirus major late; apo, apolipoprotein; APRE, acute phase response element; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; C/EBP, CAAT enhancer-binding protein; HNF, hepatocyte nuclear factor; NF κ B, nuclear factor κ B; USF, upstream stimulatory factor.

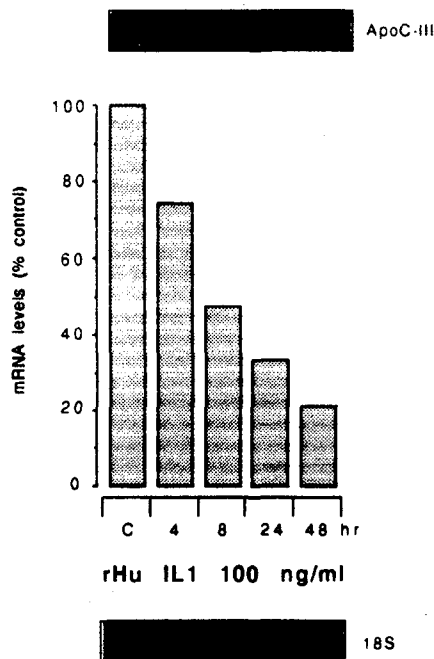


FIG. 1. Treatment of HepG2 cells by IL-1 inhibits apoC-III expression. Total RNAs from HepG2 cells treated with 100 ng/ml IL-1 for 0–48 h were prepared and analyzed by Northern blot hybridization using the apoC-III cDNA (top panel) or the 18 S ribosomal RNA (bottom panel) as a probe. After densitometric quantification, the values obtained by the apoC-III cDNA probe were divided by those obtained by the 18 S rRNA probe and expressed as a percentage of the normalized values of untreated cells (bar graph).

MATERIALS AND METHODS

Plasmids—The different apoC-III promoter constructs apoC-III-890-CAT, apoC-686-CAT, apoC-214-CAT, apoC-99-CAT, apoC-III Δ D-CAT, [CIII J-F] ML-44-CAT, and apoCIII-G1380 have been described before (38–41). [CIIIID]3AdML-CAT and [CIII-I]3AdML-CAT were constructed by ligating phosphorylated double-stranded CIIIID or CIII-I oligonucleotide into the *Sal*I site of AdML-CAT, and plasmids containing three concatamerized oligonucleotides were selected. The expression vectors pRSV-C/EBP α (25), pRSV-C/EBP β (26), and pRSV-C/EBP δ (9) were generously provided by Drs. S. McKnight (Tularic Inc.), R. Cortese (IRBM, Rome, Italy), and G. Ciliberto (IRBM), respectively. RCMV p50 and RCMV p65 (42) were kind gifts from Dr. L. Schmitz (Genzentrum, Munich, Germany).

Northern Blot Analysis—Total RNA from untreated and IL-1-treated HepG2 cells were prepared by the hot phenol method (43) and separated on formaldehyde containing 1% agarose gels (43). After capillary transfer onto GeneScreen membranes, the blot was used for hybridization with the cDNA probe encompassing the apoC-III coding region. Hybridization and washings were performed as described previously (44). Specific hybridization signals were visualized by autoradiography and quantitated by densitometry.

In Vitro DNA Binding Assays—Nuclear extracts from HepG2 and COS-1 cells were prepared by a modification of the Dignam method (45). Protein concentrations were determined according to Bradford (46). Double-stranded oligonucleotides were labeled by filling in the overhanging ends with Sequenase (U. S. Biochemical Corp.) in the presence of [α - 32 P]dATP and [α - 32 P]dCTP. DNA binding reactions were performed in 15- μ l volume containing 20 mM Hepes, pH 7.9, 50 mM KCl, 2 mM MgCl $_2$, 4 mM spermidine, 0.02 mM zinc acetate, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 10% glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 2 μ g of poly(dI-dC), and 5–10 μ g of nuclear extract. When indicated 100-fold molar excess of cold competitor oligonucleotide was also included. In supershift experiments the nuclear extracts were preincubated with 1 μ l (diluted at 1:6 ratio) C/EBP α , C/EBP β , Sp1 (Santa Cruz), or C/EBP β and p50 (kindly provided by Sheng-Chung Lee (National University, Taiwan, Republic of China) and A. Israel (Pasteur Institute, Paris, France), respectively) antibodies prior to the binding reaction. Protein-bound and free probes were separated by electrophoresis in 6% native polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

The following oligonucleotides were used in this study: CIIIID,

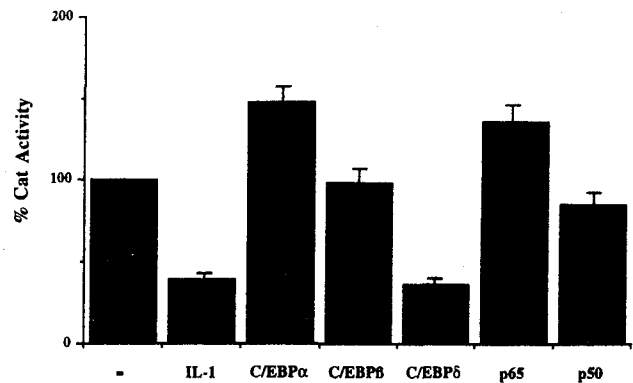


FIG. 2. Inhibition of apoC-III promoter activity by IL-1 and C/EBP δ . HepG2 cells were transfected with 2 μ g of CIII-890-CAT promoter construct and 2 μ g of either C/EBP α (third column), C/EBP β (fourth column), C/EBP δ (fifth column), p65 (sixth column), or p50 (seventh column) expression vectors. In the experiment presented in the second column the cells were treated with 100 ng/ml IL-1 for 24 h before harvest. The column graphs represent mean values and S.E. of normalized chloramphenicol acetyltransferase (Cat) activities from at least six independent experiments. All values are expressed as the percentage of the activity obtained by the CIII-890-CAT construct alone (100%).

5'-CTCAGTCTCCTAGGGATTTCCTCAACTCTCCCGCCC (40); CIII-I, 5'-GAGACCAGCTCCTCCCCAGGGATGTTATCAGTGGGTCCAG (40, 41); IM-1, 5'-GAGACCAGCTAAGATCTCAGGGATGTTATCAGTGGGTCCAG (41); IM-2, 5'-GAGACCAGCTCCTCCCCACTCTAGATTATCAGTGGGTCCAG (41); A1bD, 5'-TGGTATGATTTTGTAAATGGGGTAGGA-3' (47); α_2 -macroglobulin, 5'-TCGAATCCTTCTGGGAATTC-TGCC-3' (13); Ig κ IB, 5'-ACAGAGGGGACTTTCCGAGAGG-3' (48); and Sp1, 5'-TCGATTTCGATCGGGGGCGGGCGAGC-3' (41).

For Western blot analysis 50 μ g of nuclear extracts or immunoprecipitated proteins were separated on 12% polyacrylamide/SDS gel, electrotransferred to nitrocellulose membrane, and probed with C/EBP δ antibody at 1:200 dilution or 0.5 μ g/ml horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine (PY20, ICN) as described previously (49).

Cell Culture and Transfections—HepG2 cells were grown and transfected with the indicated amounts of plasmid constructs together with 3 μ g of pCMV- β gal plasmid using the calcium phosphate coprecipitation method (49, 50). In some experiments the cells were treated with 100 ng/ml human recombinant IL-1 (R & D Systems) in serum-free medium 12 h after transfection and grown for additional 24 h before harvest. Chloramphenicol acetyltransferase activities using constant amounts of protein were determined as described previously (49, 50). β -Galactosidase activities were measured according to Edlund *et al.* (51), and the values were used to normalize variations in the transfection efficiency.

RESULTS

Down-regulation of ApoC-III Expression by Interleukin-1—Total RNAs from HepG2 cells treated with 100 ng/ml IL-1 for various time intervals were prepared, and Northern blot hybridizations were carried out using the human apoC-III cDNA as a probe. As shown in Fig. 1, IL-1 induced a dramatic decrease of apoC-III mRNA. The inhibition was evident as early as 4 h after exposure to IL-1 and continued during the subsequent 48 h to the level of 20% of the control, indicating that apoC-III expression is negatively regulated during IL-1 signal transduction pathway.

Negative Regulation of the ApoC-III Promoter Activity by IL-1 and C/EBP δ —The effect of IL-1 on the activity of the apoC-III promoter was assessed in transient transfection experiments using the C-III-890-CAT promoter construct. This construct contains all the regulatory elements required for hepatic and intestinal transcription of the apoC-III gene (40, 41). IL-1 treatment of HepG2 cells inhibited apoC-III promoter activity to approximately 39% of the control (Fig. 2), suggesting that, at least in part, the specific decrease of apoC-III mRNA levels in response to this cytokine can be ascribed to suppression of apoC-III transcription. To identify the putative mediator of the IL-1-induced repression, we have performed cotrans-

A

		% CAT activity		x fold increase
		-	C/EBP δ	
CIII-890-CAT		100	36.6 (2.5)	0.36
CIII-686-CAT		8.4 (1.1)	34.0 (3.8)	4
CIII-214-CAT		8.0 (0.6)	48.5 (2.0)	6

FIG. 3. The effect of C/EBP δ and IL-1 on the activity of different mutated apoC-III promoters. HepG2 cells were transfected with 2 μ g of 5' deletion (A) and internal (B) mutant promoter constructs shown on the left side and either treated with IL-1 or left untreated. Where indicated, cells were cotransfected with 2 μ g of pRSV-C/EBP δ . The numbers represent mean values and S.E. (in parentheses) of normalized CAT activities from at least five independent experiments. The data are presented relative to the activity obtained by CIII-890-CAT.

B

		% CAT activity			
		-	C/EBP δ	IL-1	C/EBP δ + IL-1
CIII-890-CAT		100	36.6 (2.5)	39.0 (2.2)	15.5 (2.5)
CIII Δ D-CAT		60.3 (4.1)	7.5 (0.6)	9.6 (1.2)	4.1 (1.1)
CIII-IM1-CAT		44.5 (3.5)	17.6 (1.5)	15.8 (1.2)	7.2 (1.4)
CIII-IM2-CAT		65.1 (4.8)	84.6 (7.1)	71.6 (6.6)	90.3 (6.8)

A: **GAGACCAGCTCCTCCCCAGGGATGTTATCAGTGGGTCCAG** -726
 B: **GAGACCAGCTTAAGATCTC GGGATGTTATCAGTGGGTCCAG**
 C: **GAGACCAGCTCCTCCCCAGCTCTAGA ATCAGTGGGTCCAG**

fection experiments using expression vectors for C/EBP and NF κ B family members, which have been implicated as the main mediators of IL-1-induced transcription of several genes (6). C/EBP α and p65 expression vectors had a small (1.5- and 1.3-fold) stimulatory effect, while C/EBP β and p50 expression vectors did not change apoC-III promoter activity (Fig. 2). On the other hand, overexpression of C/EBP δ decreased apoC-III promoter activity to about 36% of the control (Fig. 2). To identify the putative IL-1 response elements in the apoC-III promoter, we have analyzed the C/EBP δ -dependent transactivation of different deletion mutants. As shown in Fig. 3A, deletion mutants lacking the entire or part of the apoC-III enhancer (CIII-214-CAT, CIII-686-CAT) were activated 6- and 4-fold by C/EBP δ . These data raised the possibility of two potential response elements that function in an opposite manner: one is located in the proximal promoter region (-214 to +24 nucleotides) and the other in the distal part of the apoC-III enhancer (-890 to -686 nucleotides). As shown in Fig. 3B, the deletion mutant lacking site D (CIII Δ D-CAT) was repressed more efficiently by C/EBP δ or IL-1 treatment. On the other hand mutation of the -741 to -747-nt part of the footprint region I (CIII-IM2-CAT) abolished both IL-1-mediated repression and C/EBP δ -mediated transrepression, but no significant change was observed with CIII-IM1-CAT that contains a mutated Sp1 binding site (Fig. 3B) or constructs containing other enhancer mutations (data not shown). IL-1 treatment further enhanced C/EBP δ -induced repression of the wild type, CIII Δ D and CIII-IM1 mutants by a factor of about 2 (Fig. 3B), suggesting the

importance of an IL-1-dependent modification of C/EBP δ . These data suggest that activated C/EBP δ acts as a negative regulator when it interacts with site I of the upstream apoC-III enhancer, while its potential interaction with proximal element D partially relieves repression. Transfection experiments using chimeric promoter constructs containing three copies of site D, or site I, or the entire apoC-III enhancer in front of the minimal AdML promoter further supported this hypothesis. The 3 \times D ML-44-CAT reporter gene activity was induced 8-fold by treatment of the cells with IL-1 and 155-fold by cotransfection with C/EBP δ (Fig. 4). In contrast, the apoC-III enhancer-driven activity was inhibited by both IL-1 treatment or overexpression of C/EBP δ to about 45% of the control. Interestingly, the activity of 3 \times CIII-I ML44 CAT was increased by C/EBP δ cotransfection and IL-1 treatment 31- and 1.9-fold, respectively, showing that CIII-I acts as a negative response element only in the context of the intact enhancer. Therefore, the underlying mechanism must be due to the inhibition of a higher order enhancer complex formed between factors binding to CIII-I and adjacent sites, rather than direct repression resulting from the displacement of another factor binding to CIII-I element.

Taken together, these results suggest that C/EBP δ is the main mediator of IL-1-dependent inhibition of apoC-III transcription. Although depending on the regulatory region it acts on, C/EBP δ can modulate the apoC-III promoter in both a positive and negative direction; the negative effect brought about by its interaction with the enhancer element I dominates

FIG. 4. The effect of IL-1 and C/EBP δ on the activity of chimeric promoter constructs. HepG2 cells were transfected with 2 μ g of the indicated promoter constructs and either treated with IL-1 (third column of numbers) or left untreated (first column of numbers) or left untreated but cotransfected with 2 μ g of pRSV-C/EBP δ (second column of numbers). The numbers represent mean values and S.E. (in parentheses) of normalized CAT activities from at least five independent experiments. The data are presented relative to the activity obtained by CIII-890-CAT.

	AdML CAT	% CAT activity		
		-	C/EBP δ	IL-1
pML-44-CAT		6,8 (0.5)	7,2 (0.6)	6,6 (0.6)
3xCHID ML-44-CAT		4,2 (0.4)	653,0 (51)	33,4 (2.8)
[CIII J-F] ML-44-CAT		42,8 (3.5)	19,8 (1.5)	19,0 (1.1)
3xCHII-1 ML-44-CAT		18,3 (1.2)	570,0 (48)	35,2 (1.5)

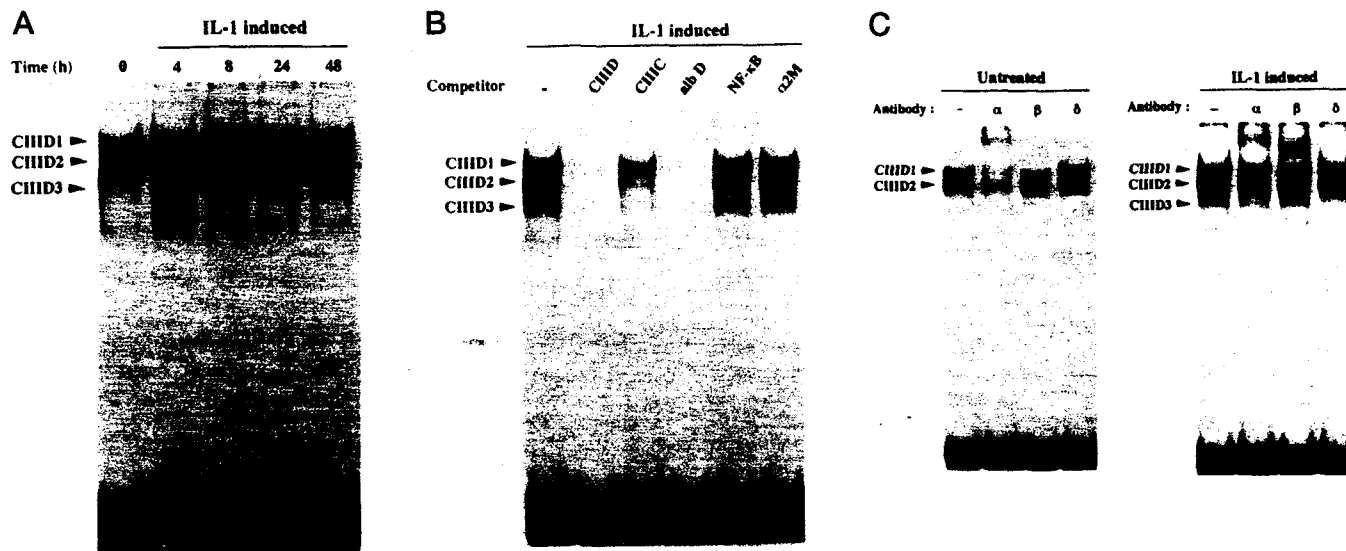


FIG. 5. IL-1 treatment induces a novel activity (C/EBP δ) interacting with the CIID regulatory region. **A**, nuclear extracts from HepG2 cells treated with 100 ng/ml IL-1 for 0–48 h were analyzed by electrophoretic mobility shift experiments using double-stranded CIID oligonucleotide as a probe. CIID1 and CIID2 are the binding activities present in the untreated extracts, while the IL-1-induced activity is designated as CIID3. **B**, electrophoretic mobility shift assays using radioactive CIID probe and nuclear extracts from HepG2 cells treated for 4 h with IL-1 were performed in the presence of 100-fold molar excess cold competitor oligonucleotides CIID, CIIC, AlbD, NF κ B (Ig κ B element) and α 2 M (α ₂-macroglobulin APRE). **C**, electrophoretic mobility shift assays using untreated (left panel) and IL-1-treated (right panel) HepG2 cell extracts were performed in the presence of antibodies raised against C/EBP α (α), C/EBP β (β), and C/EBP δ (δ).

over the positive effect resulting from its binding to the proximal elements D.

In Vitro Analysis of the Transcription Factors Interacting with the IL-1 Response Elements of the ApoC-III Promoter—To determine if in hepatic cells the binding of C/EBP and NF κ B factors to site D are induced, mobility shift assays were carried out with extracts prepared from IL-1-treated HepG2 cells. Two major DNA binding activities were detected in untreated cell extracts (CIID1 and CIID2), while a novel faster moving complex (CIID3) was also observed when extracts from IL-1-stimulated cells were analyzed (Fig. 5A). A similar pattern was observed with the AlbD probe (data not shown). We used specific competitors and antibodies recognizing NF κ B and C/EBP family proteins to reveal the identity of the different binding activities. The competitor oligonucleotide AlbD (derived from the -115 to -90-nt region of the rat albumin promoter) is a high affinity binding site for C/EBP and does not bind NF κ B-related factors (28, 47). The other competitor (Ig κ B) synthesized from the Ig κ light chain promoter is able to bind proteins that belong to the NF κ B family, but not C/EBP-related proteins (48). The formation of the IL-1-induced complex (CIID3) as well as the two other complexes (CIID1 and CIID2) was not inhibited by 100-fold molar excess of Ig κ B oligonucleotide (Fig. 5B). In addition, antibodies raised against the p50 subunit of NF κ B did not affect the electrophoretic mobility profile of

CIID-binding proteins (data not shown), indicating that members of the NF κ B family do not bind to site D of the apoC-III promoter in IL-1-induced or uninduced HepG2 cells. The APRF/STAT3 binding site oligonucleotide (α ₂-macroglobulin) (12, 13) also failed to prevent the formation of D binding complexes (Fig. 5B). On the other hand, complete competition of all three DNA binding activities was observed with the AlbD oligonucleotide (Fig. 5B), suggesting that CIID1, CIID2, and CIID3 may represent homo- and heterodimers of C/EBP-related factors. Antibodies specific to individual C/EBP proteins were used in supershift assays to determine which members of this family were involved in complex formation. The C/EBP α -specific antibody supershifted CIID1 and some of the CIID2 complex present in both untreated and IL-1 treated HepG2 extracts, but did not affect CIID3 binding activity (Fig. 5C). Similarly, an antibody to C/EBP β supershifted only a small amount of CIID1 protein in both extracts, but not CIID2 or CIID3 (Fig. 5C). The formation of the IL-1-inducible complex (CIID3) was neutralized only by the antibody raised against C/EBP δ (Fig. 5C), which did not affect CIID1 and CIID2. Therefore, we conclude that in untreated HepG2 cells C/EBP α and C/EBP β are the main binding activities interacting with the apoC-III site, while IL-1 treatment induces the binding of an additional factor which was identified as C/EBP δ .

No changes in the steady state protein levels of C/EBP δ were

observed between uninduced and IL-1-induced HepG2 cells (Fig. 6A). In addition, we could not detect the existence or induction of a truncated C/EBP δ isoform, suggesting that post-translational modification may play a role in C/EBP δ activation. Previous studies using the specific tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate have suggested that C/EBP δ may be tyrosine-phosphorylated in BNL CL2 hepatic cells under acute phase conditions (18). To test whether such modification is induced by IL-1, C/EBP δ was immunoprecipitated from untreated and IL-1-treated HepG2 cells and Western blots of the immunoprecipitates were probed with a monoclonal

antibody to phosphotyrosine. A 29-kDa tyrosine-phosphorylated band was observed in the extracts from IL-1-treated cells, but not in the extracts from untreated cells (Fig. 6B). When the nuclear extracts were pretreated with protein phosphatase, binding of C/EBP δ to CIII-D probe (CIII-D3) was eliminated, indicating that in IL-1-induced cells phosphorylation of C/EBP δ is important for DNA binding activity (Fig. 6C). Overexpression of C/EBP δ without IL-1 treatment still had a repression effect on apoC-III promoter (Figs. 2 and 3), raising the possibility of an IL-1-independent activation pathway. It is more likely, however, that this effect is rather due to the presence of small amounts of active cytokines in the serum, which is sufficient to induce modification in part of the overexpressed proteins during the first 12-h period after transfection.

Previous work in our laboratory has shown that the upstream element I is mainly recognized by Sp1 and related factors and to a lesser extent by two other so far unidentified activities named CIII-I3 and CIII-I5 (41). Binding of C/EBP factors to the upstream element I was assayed by electrophoretic mobility shift experiments. We did not observe any differences in the pattern of DNA-protein complexes produced by untreated or IL-1 treated HepG2 cell extracts (Fig. 7A). In addition, no competition was observed when excess concentrations of the high affinity C/EBP binding oligonucleotides (AlbD and CIII-D) were included in the reaction mixture, and antibodies raised against C/EBP α , β , and δ failed to supershift or neutralize the binding of the different activities on CIII-I (Fig. 7, B and C). Furthermore, we did not observe any specific DNA-protein interaction in experiments using extracts prepared from C/EBP α , β , or δ transfected COS-1 cells except a complex formed by an endogenous activity presumably related to Sp1 (data not shown). These results suggest that C/EBP α , β , and δ cannot directly bind to the CIII-I element. Taking into account the response of this element to IL-1 and C/EBP δ in transfection experiments, we assume that indirect protein-protein interaction between C/EBP δ and CIII-I binding factors may occur *in vivo* that may not be stable enough to be detected *in vitro* by electrophoretic mobility shift assays.

DISCUSSION

The molecular mechanisms responsible for the rapid but reversible induction of several positive acute phase genes have been well studied. In all documented cases increased expression of these genes in response to a variety of humoral factors

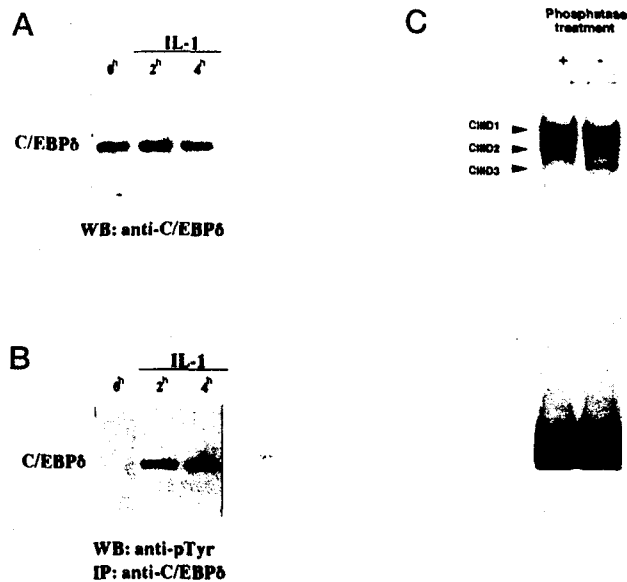


FIG. 6. IL-1 treatment induces tyrosine phosphorylation of C/EBP δ . HepG2 cells were preincubated in serum-free medium for 2 h. The cells then were treated with IL-1 for additional 2 and 4 h. **A**, nuclear extracts were prepared and half of the extracts ($\sim 30 \mu\text{g}$ of total protein) were directly separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed in Western blots using anti-C/EBP δ . **B**, the remaining extracts were first immunoprecipitated with anti-C/EBP δ , and after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransfer the blot was probed with horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (PY20, ICN). **C**, nuclear extracts ($5 \mu\text{g}$ protein) from IL-1-induced cells (4 h) were preincubated with 400 units of λ -protein phosphatase at 30°C for 30 min and then used in NA binding assays as described under "Materials and Methods."

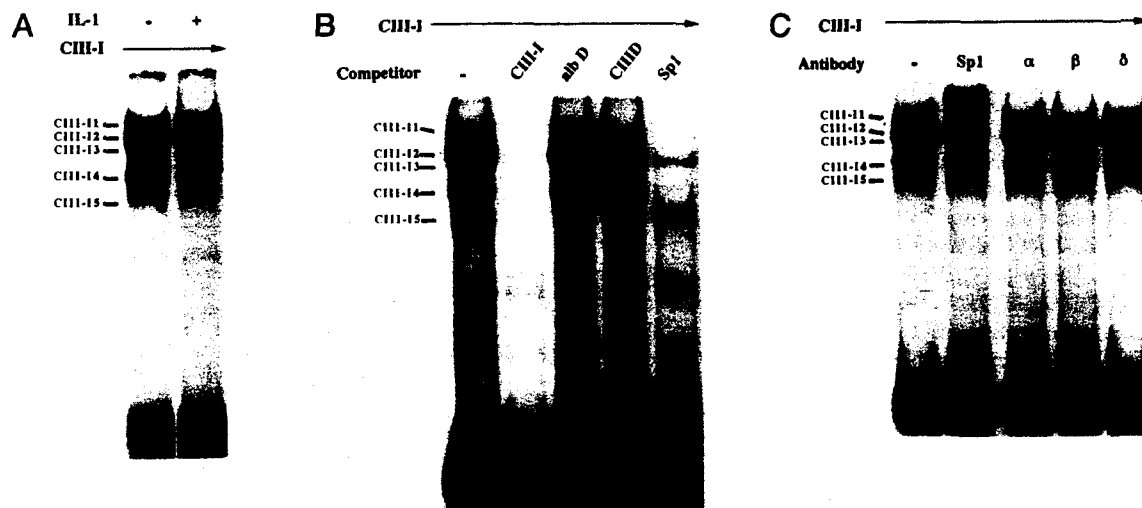


FIG. 7. C/EBP proteins do not bind to the regulatory region I of the apoC-III promoter. **A**, electrophoretic mobility shift experiments using CIII-I probe and untreated (-) or IL-1-treated (+) HepG2 extracts. **B**, competition assays in the presence of 100-fold molar excess cold competitor oligonucleotides CIII-I, CIII-D, AlbD, and Sp1. **C**, electrophoretic mobility shift assays with IL-1-treated HepG2 cell extracts were performed in the presence of antibodies raised against Sp1, C/EBP α (α), C/EBP β (β), and C/EBP δ (δ).

is mainly due to transcriptional activation. On the other hand, there are proteins whose plasma levels decrease during the hepatic acute phase reaction, e.g. albumin and apolipoprotein A-I (52). Their expression is inhibited via a posttranscriptional mechanism affecting the stability and turnover of the respective mRNAs (52). A precedent example of another class of negative acute phase genes is transthyretin, whose expression is decreased during 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute phase response (53). Down-regulation of transthyretin expression was shown to be due to decreased expression of HNF-3 α , an essential activator of this gene (53).

The results presented in this paper establish a novel mechanism that may be involved in the negative regulation of acute phase genes, in which the activation of a positive transcription factor is implicated. We show that apolipoprotein C-III is a target for IL-1-induced response. Its mRNA levels and promoter activity are decreased in IL-1-treated HepG2 cells, suggesting that this cytokine negatively regulates apoC-III expression at the transcriptional level. Because IL-1 is a potent inducer of NF κ B in a variety of cell types (14, 16, 27, 28), and the presence of a putative NF κ B regulatory element on the apoC-III promoter, members of this family were thought to play a role in the modulation of the apoC-III gene expression (32). In line with this latter report we found that the proximal element D is a potential binding site for at least two subunits (p50 and p65) of the NF κ B transcription factor (data not shown). However, DNA binding and transactivation experiments clearly showed that these factors do not participate in the IL-1-dependent down-regulation of the apoC-III gene. We cannot rule out however that under other physiological conditions induced by different combinations of signal transducers, NF κ B may modulate apoC-III transcription.

Several lines of evidence suggest that C/EBP δ is the main mediator of the IL-1 response of the apoC-III gene. First, under our experimental conditions IL-1 treatment induced a new DNA binding activity, which was identified as C/EBP δ . In agreement with previous studies (18), we found that activation of C/EBP δ in HepG2 cells involves posttranslational mechanism. In addition, there is a positive correlation between IL-1-induced phosphorylation of C/EBP δ and its DNA binding or transrepression activity. Second, C/EBP δ inhibited apoC-III promoter activity in cotransfection experiments, while other members of the C/EBP family did not have significant effect. Third, the activities of the different mutant promoter constructs analyzed in this study were affected in the same direction by IL-1 treatment or overexpression of C/EBP δ .

In all cases that have been described, C/EBP δ elicits transcriptional activation of the genes containing one or more C/EBP regulatory element (9, 18, 20, 54). The apoC-III gene therefore serves as a paradigm for a puzzling phenomenon: it is negatively regulated by an otherwise positive transcription factor. To understand the molecular mechanism responsible for this surprising effect, we have analyzed the transrepression potential of C/EBP δ on different constructs containing dissected parts of the apoC-III promoter. The results suggest that in the context of the full promoter C/EBP δ causes a net inhibition mainly through its action on the apoC-III enhancer element I. In contrast to proximal element D, we could not observe direct protein-DNA interaction between element I and C/EBP δ . On the other hand our results clearly show that C/EBP δ can exert a negative effect on apoC-III transcription through this site and a positive effect when this region is placed into a heterologous promoter context. This controversy can be explained by assuming that *in vivo* C/EBP δ may indirectly bind to element I through protein-protein interaction with factors that can recognize this element. A similar situation has been re-

ported recently for the human C/EBP α promoter (55), showing that direct binding of C/EBP α to the promoter of its own gene is not required for the observed positive autoregulation. Protein-protein interaction between C/EBP α and upstream stimulatory factor (USF) was suggested as an underlining mechanism, since C/EBP α transactivated its own promoter through a USF binding site (55).

The site-dependent dual mode of action of C/EBP δ provides an interesting example for the changes of the regulatory phenotype of a given promoter element, depending on the complex modular arrangement of neighboring cis-acting DNA sequences. The promoter context-dependent negative effect of C/EBP δ may thus be ascribed to its ability to interfere with the formation of a stronger transcriptionally active complex, rather than acting as a *bona fide* repressor.

Apolipoprotein C-III plays an important role in the regulation of triglyceride metabolism. Several studies suggested the existence of a strong positive correlation between plasma triglyceride and apoC-III levels. Overexpression of apoC-III in transgenic mice results of hypertriglyceridaemia (34, 35), while targeted disruption of the apoC-III gene results in hypotriglyceridaemia (37). These changes are in agreement with the proposed functions of apoC-III, such as inhibition of plasma triglyceride-rich lipoprotein catabolism by the inhibition of lipoprotein lipase-mediated intravascular lipolysis or their receptor-mediated uptake. During tumor necrosis factor- or IL-1-induced acute phase reaction, serum triglyceride concentrations are increased, which is correlated with increased *de novo* hepatic fatty acid synthesis (56). The biological significance of the reduced apoC-III expression in response to IL-1 may therefore be to provide a balancing mechanism to prevent the hyperaccumulation of plasma lipids during conditions that promote the acute phase reaction.

The genes encoding the human apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV are closely linked in the long arm of chromosome 11 (57). Recent studies have suggested that the upstream region of apoC-III gene may function as a common enhancer for all three physically linked apolipoprotein genes in the apoA-I/apoC-III/ApoA-IV cluster (39, 58, 59). Since C/EBP δ inhibits the activity of this common enhancer, one may expect that besides apoC-III, the expression of apoA-I and apoA-IV may also be influenced. In this way, the negative regulation of the apoC-III enhancer by C/EBP δ may induce profound changes in the production and/or utilization of different classes of lipoproteins that may lead to complete remodeling of lipoprotein metabolism during IL-1-induced hepatic acute phase reaction.

Acknowledgments—We are indebted to Drs. R. Cortese, G. Ciliberto, A. Israel, S.-C. Lee, S. McKnight, and L. Schmitz for providing different expression vectors and antibodies.

REFERENCES

1. Fey, G., and Fuller, G. (1987) *Mol. Biol. Med.* **4**, 323–338
2. Fey, G., and Gaudie, J. (1990) in *Progress in Liver Disease* (Popper, H., and Schaffner, F., eds) 2nd Ed., pp. 89–116, W. B. Saunders Co., Philadelphia
3. Baumann, H. (1989) *In Vitro Cell. & Dev. Biol.* **25**, 115–116
4. Mackiewicz, A., Kushner, I., and Baumann, H. (1993) *Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry and Clinical Applications*. 1st Ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
5. Kushner, I. (1989) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **389**, 39–48
6. Poli, V., and Ciliberto, G. (1994) in *Transcriptional Regulation of Liver Specific Genes* (Tronche, F., and Yaniv, M., eds) pp. 84–97, R. G. Landes Co., Austin, TX
7. Majjelo, B., Arcone, R., Toniatti, C., and Ciliberto, G. (1990) *EMBO J.* **9**, 457–465
8. Poli, V., and Cortese, R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 8202–8206
9. Ramji, D. P., Viteli, A., Tronche, F., Cortese, R., and Ciliberto, G. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 289–294
10. Baumann, H., Morella, K. K., Campos, S. P., Cao, Z., and Jahreis, G. P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19744–19751
11. Baumann, H., Morella, K. K., Jahreis, G. P., and Marinkovic, S. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5967–5976
12. Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X.-J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Massanobu, M., and Kishimoto, T. (1994) *Cell* **77**, 63–71

13. Hocke, G., Barry, D., and Fey, G. H. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2282-2294
14. Betts, J. C., Cheshire, J. K., Akira, S., Kishimoto, T., and Woo, P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25624-25631
15. Li, X., Huang, J. H., Rienhoff, H. Y., and Liao, W. S. L. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6624-6631
16. Li, X., and Liao, W. S.-L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15192-15201
17. Li, X., and Liao, W. S. L. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 4765-4772
18. Ray, A., and Ray, B. K. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4324-4332
19. Nishio, Y., Isshiki, H., Kishimoto, T., and Akira, S. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1854-1862
20. Juan, T. S.-C., Wilson, D. R., Wilde, M. D., and Darlington, G. J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2584-2588
21. Wilson, D. R., Juan, T. S.-C., Wilde, M. D., Fey, G. H., and Darlington, G. J. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6181-6191
22. Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1988) *Cell* **53**, 211-217
23. Cao, Z., Umek, R. M., and McKnight, S. L. (1991) *Genes Dev.* **5**, 1538-1552
24. Kinoshita, S., Akira, S., and Kishimoto, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1473-1476
25. Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J., and McKnight, S. L. (1988) *Genes Dev.* **2**, 786-800
26. Poli, V., Mancini, F. P., and Cortese, R. (1990) *Cell* **63**, 643-653
27. Nonaka, M., and Huang, Z.-M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6283-6289
28. Brasier, A. R., Ron, D., Tate, J. E., and Habener, J. F. (1990) *EMBO J.* **9**, 3933-3944
29. Leclair, K. P., Blonar, M. A., and Sharp, P. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8145-8149
30. Stein, B., and Baldwin, A. B., Jr. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7191-7198
31. Stein, B., Cogswell, P. C., and Baldwin, A. B., Jr. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3964-3974
32. Gruber, P. J., Torres-Rosado, A., Wolak, M. L., and Leff, T. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 2417-2422
33. Wang, C. S., McConathy, W. J., Kloer, H. U., and Alaupovic, P. (1985) *J. Clin. Invest.* **75**, 384-390
34. de Silva, H. V., Lauer, S. J., Wang, J., Simonet, W. S., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., and Taylor, J. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2324-2335
35. Dammerman, M., Sankuij, L. A., Halaas, J. L., Chung, W., and Breslow, J. L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4562-4566
36. Ito, Y., Azrolan, N., O'Connell, A., Walsh, A., and Breslow, J. L. (1990) *Science* **249**, 790-793
37. Maeda, N., Li, H., Lee, D., Oliver, P., Quarfordt, S. H., and Osada, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23610-23616
38. Kritis, A. A., Ktistaki, E., Barda, D., Zannis, V. I., and Talianidis, I. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 5882-5889
39. Ktistaki, E., Lacorte, J.-M., Katrakili, N., Zannis, V. I., and Talianidis, I. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4689-4696
40. Ogami, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., and Zannis, V. I. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 9808-9815
41. Talianidis, I., Tambakaki, A., Toursounova, J., and Zannis, V. I. (1995) *Biochemistry* **34**, 10298-10309
42. Schmitz, M. L., and Baeuerle, P. A. (1991) *EMBO J.* **10**, 3805-3817
43. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Chap. 7, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
44. Kritis, A. A., Argyrokastritis, A., Moschonas, N. K., Power, S., Katrakili, N., Zannis, V. I., Cereghini, S., and Talianidis, I. (1996) *Gene (Amst.)* **173**, 275-280
45. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475-1489
46. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
47. Maire, P., Wuarin, J., and Schibler, U. (1989) *Science* **244**, 343-346
48. Sen, R., and Baltimore, D. (1986) *Cell* **47**, 921-928
49. Ktistaki, E., Ktistakis, N. T., Papadogeorgaki, E., and Talianidis, I. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9876-9880
50. Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973) *Virology* **52**, 456-467
51. Edlund, T., Walker, M. D., Barr, P. J., and Rutter, W. J. (1985) *Science* **230**, 912-916
52. Morrone, G., Cortese, R., and Sorrentino, V. (1989) *EMBO J.* **8**, 3767-3771
53. Qian, X., Samadini, U., Porcella, A., and Costa, R. B. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1364-1376
54. Johnson, P. F., and Williams, S. C. (1994) in *Transcriptional Regulation of Liver Specific Genes* (Tronche, F., and Yaniv, M., eds) pp. 143-160, R. G. Landes Co., Austin, TX
55. Timchenko, N., Wilson, D. R., Taylor, L. R., Abdelsayed, S., Wilde, M., Sawadago, M., and Darlington, G. J. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1192-1202
56. Feingold, K. R., Soued, M., Serio, M. K., Moser, A. H., Dinarello, C. A., and Grunfeld, C. (1989) *Endocrinology* **125**, 267-274
57. Karathanasis, S. K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6374-6378
58. Walsh, A., Azrolan, N., Wang, K., Marcigliano, A., O'Connell, A., and Breslow, J. L. (1993) *J. Lipid Res.* **34**, 617-623
59. Bisaha, J. G., Simon, T. C., Gordon, J. I., and Breslow, J. L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 19979-19988

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Akiyama, T., and Ogawara H. (1991). Use and specificity of genistein as an inhibitor of protein-tyrosine kinases.
2. Anderson, S., Davis, D., Dahlback, H., Jornvall, H., and Russel, D. (1989). J. Biol. Chem. 264: 8222-8229.
3. Apfelbaum, T., Davidson, N., and Glickman, R. (1987). "Apolipoprotein AIV synthesis in rat intestine: regulation by dietary triglyceride." Am. J. Physiol. 252: 662-666.
4. Avraham, K., Prezioso, V., Chen, W., Lai, E., Sladek, F., Zhong, W., Darnell, J.J., Jenkins, N., and Copeland, N. (1992). "Murine chromosomal localization of four hepatocyte enriched transcription factors: HNF3 α , HNF3 β , HNF3 γ and HNF-4." Genomics 13: 264-268.
5. Bach, I., Mattei, M.-G., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1991). "Two members of an HNF-1 homeoprotein family are expressed in human liver." Nucleic Acids Res. 19: 3553-3559.
6. Bach, I., Yaniv, M. (1993). "More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF-1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing." EMBO J. 12: 4229-4242.
7. Barettino, D., Ruiz, M., Stunnenberg, H. (1994). "Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of the thyroid hormone receptor." EMBO J. 13: 3039-3049.
8. Baumhueter, S., Mendel, D., Conley, R., Kuo, C., Turk, C., Graves, M., Edwards, C., Courtois, G., Crabtree, G. (1990). "HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and ARF." Genes Dev. 4: 372-379.
9. Bergson, C., McGinnis, W. (1990). "An autoregulatory enhancer element of the drosophila homeotic gene Deformed." EMBO J. 9: 4287-4297.
10. Bisgaier, C., Sachdev, O., Megna, L., Glickman, R. (1985). "Distribution of apolipoprotein AIV in human plasma." J. Lipid Res. 26: 11-25.
11. Boyle, W., Smeal, T., Defize, H., Angel, P., Woodgett, J., Karin, M., Hunter, T. (1991). "Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity." Cell 64: 573-5584.
12. Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. 72: 248-254.
13. Bulla, G., DeSimone, V., Cortese, R., Fournier, R. (1992). "Extinction of α 1-antitrypsin gene expression in somatic cell hybrids: evidence for multiple controls." Genes Dev. 6: 316-327.

14. Burris, T., Nawaz, Z., Tsai, M.-J., O'Malley, B. (1995). "A nuclear hormone receptor-associated protein that inhibits transactivation by the thyroid hormone and retinoic acid receptor." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 9525-9529.
15. Butler, A., Parker, M. (1995). "COUP-TF II homodimers are formed in preference to heterodimers with R_xR₁ or TR₁ in intact cells." Nucleic Acids Res. 23: 4143-4150.
16. Carey, M., Kakidani, H., Leatherwood, J., Mostashari, F., Ptashne, M. (1989). "An aminoterminal fragment of Gal-4 binds DNA as a dimer." J. Mol. Biol. 209: 423-432.
17. Carter, K., Taneja, K., Lawrence, J. (1991). "Discrete nuclear domains of poly(A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus." J. Cell Biol. 115: 1191-1202.
18. Casanova, J., Helmer, E., Selmi-Ruby, S., Qi, J.-S., Au-Fliegner, M., Desai-Yajnik, V., Koudinova, N., Yarm, F., Raaka, B., Samuels, H. (1994). "Functional evidence for ligand dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor." Mol. Cell. Biol. 14: 5756-5765.
19. Cato, A., Miksicek, R., Shutz, J., Arnermann, J., Beato, M. (1986). "The hormone regulatory element of mouse mammary tumour virus mediates progesterone induction." EMBO J. 5: 2237-2240.
20. Cavailles, V., Dauvois, S., L'Horse, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P., Parker, M. (1995). "Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor." EMBO J. 14: 3741-3751.
21. Cereghini, S., Yaniv, M., Cortese, R. (1990). "Expression patterns of vHNF-1 and HNF-1 homoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles." Development 116: 783-797.
22. Cereghini, S., Yaniv, M., Cortese, R. (1990). "Hepatocyte dedifferentiation and extinction is accompanied by a block in the synthesis of mRNA coding for the transcription factor HNF1/LFB1." EMBO J. 9: 2257-2263.
23. Chartier, F., Bossu, J.-P., Laudet, V., Fruchart, J.-C., Laine, B. (1994). "Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in the human liver." Gene 147: 269-272.
24. Chen, J., Evans, R. (1995). "A transcriptional corepressor that interacts with nuclear hormone receptors." Nature 377: 454-457.
25. Chen, R., Ingraham, H., Treacy, M., Albert, V., Wilson, L., Rosenfeld, M. (1990). "Autoregulation of pit1 gene expression mediated by two cis-acting promoter elements." Nature 346: 583-586.
26. Chen, W., Manova, K., Weinstein, D., Duncan, S., Plump, A., Prezioso, V., Bacharova, R., Darnell, J.J. (1994). "Disruption of the HNF-4 gene expressed in the visceral

endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos." Genes Dev. 8: 2466-2477.

27. Chouard, T., Blumenfeld, M., Bach, I., Vandekerckhove, J., Cereghini, S., Yaniv, M. (1990). "A distal dimerization domain is essential for DNA-binding by the atypical HNF-1 homeodomain." Nucleic Acids Res. 18: 5853-5863.
28. Conneely, J., O'Malley, B. (1994). Orphan receptors: structure and function relationships. Mechanisms of steroid hormone regulation of gene transcription. M.-L. T. a. B. O. M. eds. Austin Tx, RG Landes Co: 111-133.
29. Cooney, A., Tsai, S., O'Malley, B., Tsai, M.-L. (1992). "Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCA response elements allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone and retinoic acid receptors." Mol. Cell. Biol. 12: 4153-4163.
30. Costa, R., Grayson, D. (1991). "Site-directed mutagenesis of hepatocyte nuclear factor (HNF) binding sites in the mouse transthyretin (TTR) promoter reveal synergistic interactions with its enhancer region." Nucleic Acids Res. 19: 4139-4145.
31. Darnell, J. J., Kerr, I., Stark, G. (1994). "Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." Science 264: 1415-1421.
32. DeSimone, V., DeMagistris, L., Lazzaro, D., Gerstner, J., Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R. (1991). "LFB3, a heterodimer forming homeoprotein of LFB1 family, is expressed in specialised epithelia." EMBO J. 10: 1435-1443.
33. Duncan, S., Manova, K., Chen, W., Hoodless, P., Weinstein, D., Bacharova, R., Darnell, J. J. (1994). "Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7598-7602.
34. Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., Chambon, P. (1994). "Activation function 2 (AF2) of retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of response element on AF2 activity." EMBO J. 13: 5370-.
35. Dyck, J., Maul, G., Miller, W., Chen, J., Kakizuka, A., Evans, R. (1994). "A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein." Cell 76: 333-343.
36. Dynlacht, B., Hoey, T., Tjian, R. (1991). "Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation." Cell 66: 563-576.

37. Edlund, T. W., M. Barr, P., Ruttler, W. (1985). "Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for the role of two distinct 5' flanking elements." Science 230: 912-916.
38. Elshourbagy, N., Walker, D., Paik, Y., Boguski, M., Freeman, M., Gordon, J., Taylor, J. (1987). "Structure and expression of the human apolipoprotein A-IV gene." J. Biol. Chem. 262: 7973-7981.
39. Feinberg, A., Vogelstein, B. (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal. Biochem. 132: 6-13.
40. Flodby, P., Antonson, P., Barlow, C., Porch-Hallstrom, I., Xanthopoulos, K. (1993). "Differential patterns of expression of three C/EBP isoforms, HNF-1 and HNF-4 after partial hepatectomy in rats." Exp. Cell Res. 208: 248-.
41. Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stampfli, S., Frank, R., Cortese, R. (1989). "The liver specific transcription factor LFB1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain." Cell 59: 145-157.
42. Gill, G., Ptashne, M. (1988). "Negative regulation of the transcriptional activator GAL4." Nature 334: 721-724.
43. Godbout, R., Ingram, R., Tilghman, S. (1986). Mol. Cell. Biol. 6: 477-487.
44. Goldberg, I., Scheraldi, C., Yacoub, L., Saxena, V., Bisgaier, C. (1990). "Lipoprotein Apo-CII activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein AIV." J. Biol. Chem. 265: 4266-4272.
45. Gorman, C., Moffat, L., Howard, B. (1982). "Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells." Mol. Cell. Biol. 2: 1044-1051.
46. Graham, F., Van Der Eb, A. (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology 52: 456-467.
47. Guerra, M., Bergot, M., Martinez, A., Cuif, M., Kahn, A., Raymondjean, M. (1993). Mol. Cell. Biol. 13: 7725-7733.
48. Ham, J., Dostatna, N., Arnos, F., Yaniv, M. (1991). EMBO J.: 2931-2940.
49. Hata, S., Tsukamoto, T., Osumi, T. (1992). "A novel isoform of rat hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4)." Biochem. Biophys. Acta 1131: 211-213.
50. Holewa, B., Strandmann, E., Zapp, D., Lorenz, P., Ryffel, G. (1995). "Transcriptional hierarchy in xenopus embryogenesis: HNF-4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF-1A (LFB1)." Mech. Dev. 54: 45-57.
51. Horlein, A., Naar, A., Heinzl, T., Torchial, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C., Rosenfeld, M. (1995). "Ligand-independent repression by

- the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." Nature 377: 397-404.
52. Hunter, T., Karin, M. (1992). "The regulation of transcription by phosphorylation." Cell 70: 375-387.
 53. Hwang, Y.-P., Crowe, D., Tsai, S., Tsai, M.-J. (1988). "The COUP transcription factor binds to an upstream promoter element of the rat insulin II gene." Mol. Cell. Biol. 15: 2070-2077.
 54. Jiang, G., Nepomuceno, L., Hopkins, K., Sladek, F. (1995). "Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors." Mol. Cell. Biol. 15: 5131-5143.
 55. Jimenez-Garcia, I., Spector, D. (1993). "In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism." Cell 73: 47-59.
 56. Kapiloff, M., Farkash, Y., Wegner, M., Rosenfield, M. (1991). "Variable effects of phosphorylation of Pit-1 dictated by the DNA response elements." Science 253: 786-789.
 57. Karathanasis, S. (1985). "Apolipoprotein multigene family: tandem organisation of human apolipoprotein AI, CIII and AIV genes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6374-6378.
 58. Karathanasis, S., Yunis, I., Zannis, V. (1986). "Structure, evolution and tissue specific synthesis of human apolipoprotein AIV." Biochemistry 25: 3962-3970.
 59. Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. (1995). "Nonsteroid nuclear receptors: what are the genetic studies telling us about their role in real life." Cell 83: 859-869.
 60. Kerr, L., Inoue, J., Davis, N., Link, E., Baeuerle, P., Bose, H., Verma, I. (1991). "A Rel-associated pp40 protein prevents DNA binding of Rel and NF- κ B: relationship with I κ B β and regulation by phosphorylation." Genes Dev. 5: 1464-1476.
 61. Kessler, D., Veals, S., Fu, X., Levy, D. (1990). "Interferon regulates nuclear translocation of ISGF3, a multimeric transcriptional activator." Genes Dev. 4: 1753-1765.
 62. Kimura, A., Nishiyori, A., Murakami, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Osumi, T., Okamura, R., Mori, M., Takiguchi, M. (1993). "Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithin transcarbamylase in a manner antagonistic to hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4)." J. Biol. Chem. 268: 11125-11113.
 63. Koken, M., Puvion-Dutilleul, F., Guillemin, M., Viron, A., Linarez-Cruz, G., Sturman, N., DeJong, L., Szostecki, C., Calvo, F., Chomiene, C., Puvion, E., DeThe, H. (1994). "The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion." EMBO J. 13: 1073-1083.

64. Koudinova, N., Yarm, F., Raaka, B., Samuels, H. (1994). "Functional evidence for ligand-dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor." Mol. Cell. Biol. 14: 5756-5765.
65. Krasnow, M., Saffman, E., Kornfeld, K., Hogness, D. (1989). "Transcriptional activation and repression by ultrabithorax proteins in cultured drosophila cells." Cell 57: 1031-1043.
66. Kritis, A., Ktistaki, E., Barda, D., Zannis, V., Talianidis, I. (1993). "An indirect negative autoregulatory mechanism involved in hepatocyte nuclear factor 1 (HNF-1) gene expression." Nucl. Acid. Res. 21: 5882-5889.
67. Ktistaki, E., Lacorte, J.-M., Katrakili, N., Zannis, V., Talianidis, I. (1994). "Transcriptional regulation of the apolipoprotein AIV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein C-III gene." Nucleic Acid Res. 22: 4689-4696.
68. Ktistaki, E., Ktistakis, N., Papadogeorgaki, E., Talianidis, I. (1995). "Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9876-9880.
69. Kuo, C., Mendel, D., Hansen, L., Crabtree, G. (1991). "Independent regulation of HNF-1 α and HNF-1 β by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells." EMBO J. 10: 2231-2236.
70. Kuo, C., Conley, P., Chen, L., Sladek, F., Darnell, J., Crabtree, G. (1992). "A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification." Nature 355: 457.
71. Ladas, J., Karathanasis, S. (1991). "Regulation of apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily." Science 251: 561-565.
72. Ladas, J., Cladaras-Hatzopoulou, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V., Cladaras, C. (1992). "Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII and ApoAII by members of the steroid receptor superfamily HNF-4, ARP1, EAR2, EAR3." J. Biol. Chem. 267: 15849-15860.
73. Lai, E., Prezioso, V., Tao, W., Chen, W., Darnell, J. (1991). "Hepatocyte nuclear factor 3 β belongs to a gene family in mammals that is homologous to the drosophila homeotic gene fork head." Genes Dev. 5: 416-427.
74. Landschulz, W., Jonson, P., Adashi, E., Graves, B., McKnight, S. (1988). "Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP." Genes Dev. 5: 786-800.
75. Lauer, S., Simonet, W., Bucay, N., DeSilva, H., Taylor, J. (1991). "Tissue-specific expression of the human apolipoprotein A-IV gene in transgenic mice." Circulation 84.

76. Lazzaro, D., DeSimone, DeMagistris, L., Lehtonen, E., Cortese, R. (1992). "LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development." Development 114: 469-479.
77. LeDouarin, B., Zechel, C., Garnier, J-M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, B., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P., Losson, R. (1995). "The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the."
78. Leng, X., Cooney, A., Tsai, S., Tsai, M-J. (1996). "Molecular mechanisms of COUP-TF mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression." Mol. Cell. Biol. 16: 2332-2340.
79. Lerner, E., Lerner, M., Janeway, L., Steitz, J. (1981). "Monoclonal antibodies to nucleic acids containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2737-2741.
80. Levine, M., Hoey, T. (1988). "Homeobox proteins as sequence specific transcription factors." Cell 55: 537-540.
81. Lichsteiner, S., Schibler, U. (1989). "A glycosylated liver specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene." Cell 57: 1179-1187.
82. Liu, Y., Yang, N., Teng, C. (1993). "COUP-TF acts as a competitive repressor for estrogen receptor-mediated activation of the mouse lactoferrin gene." Mol. Cell. Biol. 13: 1836-1846.
83. Luo, C., Li, W., Moore, M., Chan, L. (1986). J. Mol. Biol. 187: 325-340.
84. Malik, S., Karathanasis, S. (1995). "Transcriptional activation by the orphan nuclear receptor ARP-1." Nucl. Acids Res. 23: 1536-1543.
85. Malik, S., Karathanasis, S. (1996). "TFIIB-directed transcriptional activation by the orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4." Mol. Cell. Biol. 16: 1824-1831.
86. Mangelsdorf, D., Thymmel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell 83: 835-839.
87. Mangelsdorf, D., Evans, R. (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell 83: 841-850.
88. Marten, N., Sladek, F., Straus, D. (1996). "Effect of dietary protein restriction on liver transcription factors." Biochem. J. 317: 361-370.
89. Mendel, D., Khavari, P., Conley, P., Graves, M., Hansen, L., Admon, A., Crabtree, G. (1991). "Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein." Science 254: 1762-

90. Mendel, D., Crabtree, G. (1991). "HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins." J. Biol. Chem. 266: 677-680.
91. Mendel, D., Hansen, L., Graves, M., Conley, P., Crabtree, G. (1991). "HNF-1 α and HNF-1 β (vHNF-1) share dimerization and homeodomains but not activation domains, and form heterodimers in vitro." Genes Dev. 5: 1042-1056.
92. Mendelzon, D., Boissier, F., Zakin, M. (1990). "The binding site for the liver-specific transcription factor Tf LF1 and the TATA box of the human transferrin gene promoter are the only elements necessary to direct liver-specific transcription in vitro." Nucleic Acids Res. 18: 5717-5721.
93. Metz, R., Ziff, E. (1991). "cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor NFIL-6 to translocate to the nucleus and induce c-fos transcription." Genes Dev. 5: 1754-1766.
94. Metzger, S., Halaas, J., Breslow, J., Sladek, F. (1993). "Orphan receptor HNF-4 and bZip protein C/EBP β bind to overlapping regions of apolipoprotein B gene promoter and synergistically activate transcription." J. Biol. Chem. 268: 16831-16838.
95. Mietus-Snyder, M., Sladek, F., Gisburg, G., Kuo, C., Ladas, J., Darnell, J., Karathanasis, S. (1992). "Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells." Mol. Cell. Biol. 12: 1708-1718.
96. Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R. (1988). "Two different liver-specific factors stimulate in vitro transcription from the human α 1-antitrypsin promoter." EMBO J. 7: 2075-2087.
97. Mueller, C. (1992). "The down-regulation of albumin transcription during regeneration is due to the loss of HNF-1 and the D site transcription factors." DNA and Cell. Biol. 11: 559-.
98. Nakayasu, H., Berezney, R. (1989). "Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus." J. Cell. Biol. 108: 1-11.
99. Nakshatri, H., Chambon, P. (1994). "The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol binding protein II genes are promiscuous binding sites for RXR, RAR, HNF-4 and ARP1 homo- and heterodimers." J. Biol. Chem. 269: 890-902.
100. Nicosia, A., Monaci, P., Tomei, L., DeFrancesco, R., Nuzzo, M., Stunnenberg, H., Cortese, R. (1990). "A myosin-like dimerization helix and an extra large homeodomain are essential elements of the tripartite DNA binding structure of LFB1." Cell 61: 1225-1236.
101. Nisch, D., Boshart, M., Schutz, G. (1993). "Extinction of tyrosine aminotransferase gene activity in somatic cell hybrids involves modification and loss of several essential transcriptional activators." Genes Dev. 7: 308-319.

102. Nitsch, D., Schutz, G. (1993). "The distal enhancer implicated in the developmental regulation of the tyrosine aminotransferase gene is bound by liver-specific and ubiquitous factors." Mol. Cell. Biol. 13: 4494-4504.
103. Ochoa, A., Bovard-Houppermans, S., Zakin, M. (1993). "Human apolipoprotein A-IV gene expression is modulated by members of the nuclear hormone receptor superfamily." Biochim. Biophys. Acta.
104. Ogami, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Zannis, V. (1990). "Promoter elements and factors required for the hepatic and intestinal transcription of the human apoCIII gene." J. Biol. Chem. 265: 9808-9815.
105. Onate, S., Tsai, S., Tsai, M-J., O'Malley, B. (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." Science 270: 1354-1357.
106. Orkin, S. (1990). "Globin gene regulation and switching: circa 1990." Cell 63: 662-665.
107. Pani, L., Qian, X., Clevidence, D., Costa, R. (1992). "The restricted promoter activity of the liver transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 β involves a cell specific factor and positive autoactivation." Mol. Cell. Biol. 12: 552-562.
108. Papazafiri, P., Ogami, K., Ramji, D., Nicosia, A., Monaci, P., Cladaras, C., Zannis, V. (1991). "Promoter elements and factors involved in hepatic transcription of the human ApoA1 gene: positive and negative regulators bind to overlapping sites." J. Biol. Chem. 266: 5790-5797.
109. Pascal, E., Tjian, R. (1991). "Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism." Genes Dev. 5: 1646-1656.
110. Pascal, M., Wuarin, J., Schibler, U. (1989). Science 244: 343-346.
111. Piaggio, G., Tomei, L., Toniati, C., DeFrancesco, R., Gerstner, J., Cortese, R. (1994). "LFB1/HNF1 acts as a repressor of its own transcription." Nucleic Acids Res. 22: 4284-4290.
112. Pietrangello, A., Schafritz, D. (1994). "Homeostatic regulation of hepatocyte nuclear transcription factor 1 expression in cultured hepatoma cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 182-186.
113. Poli, V., Mancini, F., Cortese, R. (1990). "IL-6 DBP, a nuclear protein involved in interleukin 6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP." Cell 63: 643-653.
114. Pontolio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J., Babinet, C., Yaniv, M. (1996). "Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic disfunction, phenylketonouria and renal Fanconi Syndrome." Cell 84: 575-585.

115. Power, S., Cereghini, S. (1996). "Positive regulation of the vHNF-1 promoter by the orphan receptors COUP-TF I/Ear3 and COUP-TF II/Arp1." Mol. Cell. Biol. 16: 778-791.
116. Pugh, F., Tjian, R. (1991). "Transcription from TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex." Genes Dev. 5: 1935-1945.
117. Qiu, Y., Tsai, S., Tsai, M-J. (1994). "COUP-TF: an orphan member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily." Trends Endocrinol. Metabol. 5: 234-239.
118. Qiu, Y., Cooney, A., Kuratani, S., DeMayo, F., Tsai, S., Tsai, M-J. (1994). "Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 4451-4455.
119. Reijnen, M., Sladek, F., Bertina, R., Reitsma, P. (1992). "Disruption of a binding site for the hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 6300-6303.
120. Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M., Cereghini, S. (1991). "vHNF-1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF-1." EMBO J. 10: 1445-1457.
121. Rollier, A., DiPersio, C., Cereghini, S., Stevens, K., Tronche, F., Zaret, K., Weiss, M. (1993). "Regulation of the albumin gene expression in hepatoma cells of fetal phenotype: dominant inhibition of HNF-1 function and role of ubiquitous transcription factors." Mol. Biol. Cell. 4: 56-69.
122. Rottman, J., Windom, R., Nadal-Ginard, B., Madhavi, V., Karathanasis, S. (1991). "A retinoic acid response element from the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways." Mol. Cell. Biol. 11: 3814-3820.
123. Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., Ptashne, M. (1988). "Gal4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator." Nature 335: 563-564.
124. Sadowski, I., Ptashne, M. (1989). "A vector for expressing Gal(1-147) fusions in mammalian cells." Nucleic Acids Res. 17: 7539-.
125. Sagami, I., Tsai, S., Wang, H., Tsai, M-J., O'Malley, B. (1986). "Identification of two factors required for transcription of the ovalbumin gene." Mol. Cell. Biol. 6: 4259-4267.
126. Sambrook, J., Fritsch, J., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: Laboratory Manual. New York, C.S.H. Press.

127. Sawadago, M., Roeder, R. (1985). "Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream the TATA box region." Cell 43: 165-175.
128. Scatchard, G. (1949). "The attractions of proteins from small molecules and ions." Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660-672.
129. Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V., Darnell, J. (1992). "Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor." Science 257: 809-813.
130. Segil, N., Roberts, S., Heintz, N. (1991). "Mitotic phosphorylation of the Oct-1 POU-homeodomain on the regulation of Oct-1 DNA-binding activity." Science 254: 1814-1816.
131. Shaffer, E., Guillou, F., Part, D., Zakin, M. (1993). "A different combination of transcription factors modulates the expression of the human transferrin promoter in liver and sertoli cells." J. Biol. Chem. 268: 23399-23408.
132. Shemshedini, L., Ji, J., Brou, C., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1991). "In vitro activity of the transcription activation functions of the progesterone receptor." J. Biol. Chem. 267: 1834-1839.
133. Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V., Darnell, J. (1992). "Activation of transcription by INF- β : tyrosine phosphorylation of a 91-kDa DNA binding protein." Science 258: 1808-1812.
134. Shuai, K., Horvath, C., Huang, L., Qureshi, S., Cowburn, D., Darnell, J. (1994). "Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions." Cell 76: 821-828.
135. Sladek, F., Zhong, W., Lai, E., Darnell, J. (1990). "Liver enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily." Genes Dev. 4: 2353-2365.
136. Sladek, F. (1994). Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). Transcriptional regulation of liver specific genes. F. Y. Tronche, M. Austin Tx., RG Landes Co.: 127-142.
137. Smith, D., Johnson, K. (1988). "Single step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase." Gene 67: 31-40.
138. Spector, D., Fu, X-D., Maniatis, T. (1991). "Associations between distinct pre-mRNA splicing and the cell nucleus." EMBO J. 10: 3467-3481.
139. Spector, D. (1993). "Nuclear organization of pre-mRNA processing." Curr. Opin. in Cell Biol. 5: 442-448.

140. Steals, B., VanTol,A., Verhoeven,G., Auwerx,J. (1990). "Apolipoprotein AIV messenger ribonucleic acid abundance is regulated in a tissue-specific manner." Endocrinology 126: 2153-2163.
141. Steinmetz, A., Uterman,G. (1985). J. Biol. Chem. 260: 2258-2264.
142. Steinmetz, A., Barbaras,R., Ghalim,N., Clavey,V., Fruchart,J., Ailhaud,G. (1990). J. Biol. Chem. 265: 7859-7863.
143. Stern, S., Tanaka,M., Herr,W. (1989). "The Oct-1 homeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16." Nature 341: 624-630.
144. Talianidis, I., Tambakaki,A., Toursounova,I., Zannis,V. (1995). "Complex interactions between SP1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF-4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human apoCIII gene." Biochemistry 34: 10298-10309.
145. Taraviras, S., Monaghan,P., Schutz,G., Kelsey,G. (1994). "Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis." Mech. Dev. 48: 67-79.
146. Tasset, D., Tore,L., Fromental,C., Scheer,E., Chambon,P. (1990). "Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms." Cell 62: 1177-1187.
147. Thayer, M., Tapscott,S., Davis,R., Wright,W., Lassar,A. Weintraub,H. (1989). "Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1." Cell 58: 241-248.
148. Tian, H.-M., Schibler,U. (1991). "Tissue specific expression of the gene encoding nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4." Genes Dev. 5: 2225-.
149. Tran, P., Zhang,X., Salbert,G., Herman,T., Lehmann,M., Pfahl,M. (1992). "COUP-TF orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways." Mol. Cell. Biol. 12: 4666-4676.
150. Trautwin, C., Caelles,C., VanDerGeer,P., Hunter,T., Karin,M., Chojkier,M. (1993). "Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain." Nature 364: 544-547.
151. Tsai, S., Sagami,I., Wang,H., Tsai,M., O'Malley,B. (1987). "Interactions between a DNA-binding transcription factor (COUP) and a non DNA-binding factor (S300-II)." Cell 50: 701-709.
152. Tsai, S., Strauss,E., Orkin,S. (1991). "Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter." Genes Dev. 5: 919-931.

153. Utermann, G., Beisiegel, U. (1979). Eur. J. Biochem.
154. Voegel, J., Heine, M., Zechel, C., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1996). "TIF2, a 160kDa transcription mediator for the ligand dependent activation function AF2 of nuclear receptors." EMBO J. 15: 3667-3675.
155. Walsh, A., Azrolan, N., Wang, K., Marcigliano, A., O'Connell, A., Breslow, J. (1993). "Intestinal expression of the human apoAI gene in transgenic mice is controlled by a DNA region 3' to the gene in the promoter of the adjacent convergently transcribed apoCIII gene." J. Lipid. res. 34: 617-623.
156. Wang, L., Tsai, S., Cook, R., Beattie, W., Tsai, M-J., O'Malley, B. (1989). "COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily." Nature 340: 163-166.
157. Weber, H., Holewa, B., Jones, E., Ryffel, G. (1996). "Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: identification of the HNF-4 binding site as an activin A responsive element in the xenopus HNF-1 promoter." Development 122: 1975-1984.
158. Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvahlo, T., Carmo-Fornesca, M., Lamond, A., Dejean, A. (1994). "Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR in acute promyelocytic leukemia cells." Cell 76: 345-356.
159. Widom, R., Ladas, J., Kouidou, S., Karathanasis, S. (1992). "Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein AI gene in liver cells." Mol. Cell. Biol. 11: 677-687.
160. Williams, S., Cantwell, C., Johnson, P. (1991). "A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro." Genes Dev. 5: 1553-1567.
161. Winslow, G., Hayashi, S., Krasnow, M., Hogness, D., Scott, M. (1989). "Transcriptional activation by the antennapedia and fushi tarazu proteins in cultured drosophila cells." Cell 57: 1017-1030.
162. Xanthopoulos, K., Prezioso, V., Chen, W., Sladek, F., Cortese, R., Darnell, J. (1991). "The different tissue transcription patterns of genes for HNF-1, C/EBP, HNF-3, and HNF-4 protein factors that govern liver-specific transcription." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3807-3811.
163. Xing, Y., Jahson, C., Dobner, P., Lawrence, J. (1993). "Higher level organisation of individual gene transcription and RNA splicing." Science 259: 1326-1330.
164. Yamamoto, K., Gonzales, G., Biggs, W., Montminy, M. (1988). "Phosphorylation-induced binding and transcription efficacy of nuclear factor CREB." Nature 334: 494-498.

165. Zhong, W., Sladek, F., Darnell, J. (1993). "The expression pattern of drosophila homologue to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation." EMBO J. 12: 537-544.
166. Zhong, W., Mirkovitch, J., Darnell, J. (1994). "Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression." Mol. Cell. Biol. 14: 7276-7284.

