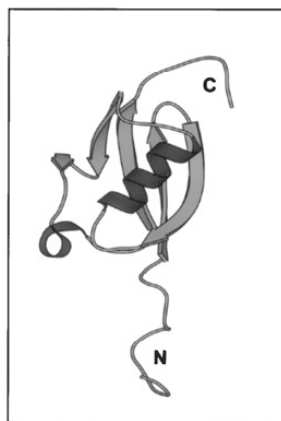


ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Διδακτορική διατριβή

**Μελέτη της ρύθμισης ηπατικών μεταγραφικών  
παραγόντων: α. Σουμοϋλίωση του LRH-1  
β. Μεταλλαγές MODY του HNF1β**

Αγγελική Χαλκιαδάκη



SUMO-1

Ηράκλειο, Οκτώβριος 2005

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Μοριακής Βιολογίας Θηλαστικών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας υπό την επίβλεψη του Ι. Ταλιανίδη, Ερευνητή Α' στα πλαίσια του διατμηματικού προγράμματος «Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής» του τμήματος Βιολογίας και της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας.

#### Συμβουλευτική Επιτροπή

Ι. Ταλιανίδης, Ερευνητής Α' (IMBB)

Ι. Παπαματθαϊάκης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)  
(Υπεύθυνος Καθηγητής)

Χ. Δελιδάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

#### Εξεταστική Επιτροπή

Ι. Ταλιανίδης, Ερευνητής Α' (IMBB)

Ι. Παπαματθαϊάκης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Χ. Δελιδάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Δ. Αλεξανδράκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Χ. Σαββάκης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ν. Πανόπουλος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Γ. Χαλεπάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Γιάννη Ταλιανίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αυτή τη διατριβή στο εργαστήριό του καθώς και για την επιστημονική βοήθεια, την καθοδήγηση και την υποστήριξη του κατά τη διάρκεια της εργασίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα παιδιά στο εργαστήριο, τη Νίτσα, τον Κώστα, την Αντιγόνη, την Ειρήνη, τη Γιάννα, τον Παντελή και τον Gergely για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Νεκτάριο Ταβερναράκη για τη βοήθεια και τις συμβουλές του για το συνεστιακό μικροσκόπιο αλλά και για το ενδιαφέρον του για το επόμενο βήμα. Ευχαριστώ πολύ τους κ. Χρήστο Δελιδάκη και Σήφη Παπαματθαϊάκη που ήταν μέλη της τριμελούς επιτροπής του Διδακτορικού μου, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τους κ. Θηραίο και Τζαμαρία για τις συμβουλές και το ενδιαφέρον τους για το μετά-διδακτορικό μου.

## Περίληψη

Οι μεταγραφικοί παράγοντες υπόκεινται σε διάφορες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ρυθμίζουν τη λειτουργία τους σε πολλά επίπεδα. Η ομοιοπολική σύζευξη πολλών μεταγραφικών παραγόντων με το SUMO επηρεάζει συνήθως αρνητικά τη δράση τους, ενδεχομένως μεταβάλλοντας τις αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες πάνω στους υποκινητές ή απομακρύνοντάς τους από αυτούς. Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στη μελέτη της ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργότητας του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα LRH-1 από την τροποποίηση με SUMO. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το LRH-1 υπόκειται σε σουμοϋλίωση και τα τροποποιημένα μόρια εντοπίζονται αποκλειστικά στα σωμάτια PML, μακριά από την ενεργή χρωματίνη. Το LRH-1 βρίσκεται στον πυρήνα σε δύο πληθυσμούς, σουμοϋλιωμένο και μη οι οποίοι βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία. Η αποσουμοϋλίωση του LRH-1 συμπίπτει με την απομάκρυνσή του από τα σωμάτια PML γεγονός που δείχνει ότι η σύζευξη με SUMO είναι απαραίτητη για τη στόχευση και τη διατήρησή του στα σωμάτια. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο τα σωμάτια SUMO-PML αποτελούν αποθηκευτικούς χώρους για τους μεταγραφικούς παράγοντες και ελέγχουν τη διαθεσιμότητά τους στις περιοχές ενεργής χρωματίνης.

Μεταλλαγές στο γονίδιο HNF1β, που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα HNF1β ο οποίος φέρει τη συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA POU-homeodomain, προκαλούν διάφορους φαινοτύπους συμπεριλαμβανομένου και του νεανικού διαβήτη τύπου 5 (MODY5). Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, με σκοπό να διερευνηθεί ο μοριακός μηχανισμός που ευθύνεται για τον παραπάνω φαινότυπο, πραγματοποιήθηκε η λειτουργική ανάλυση τεσσάρων φυσικών μεταλλαγών του HNF1β. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, παρόλο που δεν παρουσιάζουν πρόβλημα όσον αφορά την πρόσδεση στο DNA, δεν αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με τις ακετυλοτρανσφεράσες CBP ή PCAF. Σε αντίθεση με το HNF1β αγρίου τύπου, του οποίου η μέγιστη ενεργότητα επιτυγχάνεται από τη συνεργατική δράση των CBP και PCAF, η ενεργότητα αυτών των μεταλλαγών δεν αυξήθηκε με τη συνεργατική δράση αυτών των δύο συνενεργοποιητών ή παρουσία του αναστολέα απακετυλασών, TSA. Τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το σύνδρομο που συνδέεται με

αυτές τις μεταλλαγές MODY5 του HNF1β οφείλεται στην ανεπαρκή ενεργοποιητική τους δράση.

## Abstract

Transcription factors are subject to various post-translational modifications, which regulate their activity at multiple levels. Posttranslational modification by SUMO elicits a repressive effect on many transcription factors. In principle, sumoylation may either influence transcription factor activity on promoters, or it may act indirectly by targeting the modified factors to specific cellular compartments. To provide direct experimental evidence for the above, not necessarily mutually exclusive models, we analysed the role of SUMO modification on the localization and the activity of the orphan nuclear receptor LRH-1. The results demonstrate that sumoylated LRH-1 is exclusively localized in promyelocytic leukemia protein (PML) nuclear bodies and that this association is a dynamic process. Release of LRH-1 from nuclear bodies correlated with its desumoylation, pointing to the pivotal role of SUMO conjugation in keeping LRH-1 in these locations. SUMO-dependent shuttling of LRH-1 into PML bodies defines two spatially separated pools of the protein, of which only the soluble, unmodified one is associated with actively transcribed target genes. The results suggest that SUMO-PML nuclear bodies may primarily function as dynamic molecular reservoirs, controlling the availability of certain transcription factors to active chromatin domains.

Mutations in the HNF1 $\beta$  gene, encoding the dimeric POU-homeodomain transcription factor HNF1 $\beta$ ; cause various phenotypes including maturity onset diabetes of the young 5 (MODY5). In order to gain insight into the molecular mechanisms underlying this phenotype, in the second part of the thesis four disease-causing mutations of HNF1 $\beta$  were functionally characterized. The transcriptional impairment of those mutants, whose DNA-binding activity was weakly or not affected, correlated with the loss of association with one of the histone acetyltransferases CBP or PCAF. In contrast to wild-type HNF1 $\beta$ , whose transactivation potential depends on the synergistic action of CBP and PCAF, the activity of these mutants was not increased by the synergistic action of these two coactivators or by treatment with the specific histone deacetylase inhibitor TSA. Our findings suggest that the complex syndrome associated with these MODY5 mutations arise from defective transactivation function.

## Περιεχόμενα

<b>Πρόλογος</b> .....	1
<b>Εισαγωγή</b> .....	2
Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης.....	3
Χρωματίνη.....	3
Μεταγραφική ενεργοποίηση & καταστολή.....	5
Η ρύθμιση των ρυθμιστών της μεταγραφής.....	8
Το μονοπάτι προσθήκης SUMO .....	10
SUMO.....	10
Τα ένζυμα του μονοπατιού SUMO .....	11
Ο ρόλος της τροποποίησης με SUMO .....	14
Το περιβάλλον του πυρήνα .....	17
Η γενωμική οργάνωση στον πυρήνα της μεσόφασης .....	19
Οι περιοχές μεταγραφής από RNA πολυμεράση II και III.....	20
Ο πυρηνίσκος .....	21
Τα σωμάτια Cajal .....	21
Τα σωμάτια PML .....	21
Οι πυρηνικοί υποδοχείς .....	28
Ο πυρηνικός υποδοχέας LRH-1 (Liver Receptor Homolog -1) .....	29
<b>Στόχος</b> .....	34
<b>Κεφάλαιο Α</b> .....	35
<b>Αποτελέσματα</b> .....	36
Πρόλογος .....	36
Το LRH-1 τροποποιείται <i>in vivo</i> και <i>in vitro</i> με SUMO .....	36
Το τροποποιημένο με SUMO LRH-1 τοποθετείται σε διακριτά υποπυρηνικά σωμάτια .....	41
Οι περιοχές που εντοπίζεται το τροποποιημένο με SUMO LRH-1 αντιστοιχούν σε σωμάτια PML.....	45
Το τροποποιημένο με SUMO LRH-1 συνδέεται δυναμικά με τα σωμάτια PML.....	49
Η σουμοϋλίωση ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα του LRH-1, αποκλείοντάς το από τις μεταγραφικά ενεργές περιοχές .....	55
<b>Συζήτηση</b> .....	62

---

<b>Κεφάλαιο Β</b> .....	68
<b>Αποτελέσματα</b> .....	69
Πρόλογος .....	69
Αλληλεπίδραση του HNF1β με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς της μεταγραφής .....	71
Λειτουργικές συνέπειες των αλληλεπιδράσεων του HNF1β με τους συνενεργοποιητές και τους συγκαταστολείς.....	75
<b>Συζήτηση</b> .....	77
<b>Υλικά &amp; Μέθοδοι</b> .....	81
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	93



## Πρόλογος

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην ανάλυση του ρόλου της μεταμεταφραστικής τροποποίησης με SUMO του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα LRH-1. Προκειμένου να γίνουν κατανοητά τα επιστημονικά ερωτήματα που τέθηκαν, η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε και η ανάλυση των αποτελεσμάτων, προηγείται αυτών ένα εισαγωγικό κεφάλαιο.

Στην εισαγωγή περιγράφονται συνοπτικά οι μηχανισμοί και τα διάφορα επίπεδα της γονιδιακής ρύθμισης. Στη συνέχεια αναλύεται το ενζυματικό μονοπάτι της τροποποίησης με SUMO και οι συνέπειες από αυτή την προσθήκη κυρίως όσον αφορά τη λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων. Επειδή μία από τις βασικότερες συνέπειες της τροποποίησης με SUMO είναι η στόχευση των μεταγραφικών παραγόντων στα πυρηνικά σωματίδια PML, στο επόμενο τμήμα της εισαγωγής αναλύονται κυρίως τα σωματίδια PML και ο ρόλος τους. Τέλος δίνονται κάποια στοιχεία για τους πυρηνικούς υποδοχείς και αναλύεται ο ρόλος και ο τρόπος δράσης του LRH-1.

Στο πρώτο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων αναλύονται τα πειράματα και τα αποτελέσματα που οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το LRH-1 τροποποιείται με SUMO. Η τροποποίηση αυτή έχει ως συνέπεια την απομάκρυνσή του από τους υποκινητές που ρυθμίζει και την συγκράτησή του στα σωματίδια PML. Ακολουθεί συζήτηση όπου εξηγούνται τα αποτελέσματα και με βάση αυτά και τις υπάρχουσες αναφορές προτείνονται υποθέσεις και μοντέλα για το ρόλο των σωματίων PML και της τροποποίησης με SUMO στη μεταγραφή.

Το δεύτερο κεφάλαιο επικεντρώνεται στα αποτελέσματα μιας εργασίας που έγινε σε συνεργασία με το εργαστήριο της S. Cereghini στο CNRS, στο Παρίσι. Αφορά την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων του μεταγραφικού παράγοντα HNF1β με γνωστούς συνενεργοποιητές και συγκатаστολείς και τις λειτουργικές συνέπειες αυτών. Ως εργαλεία για αυτή την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν φυσικές μεταλλαγές του που οδηγούν στο νεανικό διαβήτη MODY5. Στον πρόλογο του κεφαλαίου αυτού παρατίθεται συνοπτικά ο ρόλος του HNF1β στο έμβρυο και τον ενήλικα καθώς και στοιχεία για την ασθένεια MODY. Ακολουθεί η ανάλυση των πειραμάτων και των αποτελεσμάτων και στη συνέχεια τα συμπεράσματα που εξάγονται όσον αφορά μηχανισμό της μεταγραφικής ρύθμισης από το HNF1β.

# Εισαγωγή

## Εισαγωγή

### Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης

Η ικανότητα κάθε κυττάρου να προγραμματίζει το γονιδίωμά του και να καθορίζει ποια γονίδια πρέπει να εκφραστούν κάθε δεδομένη στιγμή σύμφωνα με τα ειδικά σήματα που δέχεται, είναι κεντρικής σημασίας σε διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση ιστών, η οργανογένεση, η ανάπτυξη και η αντιμετώπιση ασθενειών. Το «πρόβλημα» είναι ότι η ίδια γενετική πληροφορία περιέχεται σε όλα τα κύτταρα και πολλές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, υπάρχουν σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και δρουν αδιάκριτα σε *cis* στοιχεία του DNA. Πολλοί και διαφορετικοί μηχανισμοί έχουν εφευρεθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ώστε να εξασφαλίζεται η αυστηρή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ο έλεγχος της γονιδιακής ρύθμισης γίνεται σε πολλά και διακριτά στάδια, από το πακετάρισμα ενός γονιδίου σε χρωματίνη και τη θέση του μέσα στον πυρήνα μέχρι τη ρυθμιζόμενη στρατολόγηση πολυπρωτεϊνικών συμπλοκών στον υποκινητή του (Emerson 2002).

### Χρωματίνη

Το DNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς καλύπτεται τουλάχιστον από ίση μάζα πρωτεϊνών και σχηματίζεται έτσι η χρωματίνη. Η βασική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, που αποτελείται από ~165bp DNA και είναι υπερελικωμένο γύρω από το οκταμερές των ιστονών (ένα ζεύγος από H2A, H2B, H3 και H4) (Kornberg 1974, Luger et al 1997). Η πιο συμπυκνωμένη μορφή χρωματίνης είναι η ετεροχρωματίνη που είναι μεταγραφικά ανενεργή και η πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων δεν είναι επιτρεπτή. Η χρωματίνη που περιλαμβάνει γονίδια που εκφράζονται έχει πιο χαλαρή δομή και αποτελεί την ευχρωματίνη. Η πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA των νουκλεοσωμάτων της ευχρωματίνης είναι περιορισμένη. Ωστόσο υπάρχουν μηχανισμοί που απομακρύνουν τα νουκλεοσώματα εντελώς ή χαλαρώνουν την υπερελικώση του DNA και έτσι επιτρέπεται η πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων σε αυτό.

Η χρωματίνη μπορεί να υποστεί τροποποιήσεις που να επηρεάσουν το βαθμό της συμπύκνωσής της και κατά συνέπεια τη μεταγραφική ενεργότητα.

α) Η αναδιοργάνωση των νουκλεοσωμάτων από μεταγραφικά σύμπλοκα είναι μία από αυτές τις τροποποιήσεις. Τα ένζυμα που αναδιοργανώνουν τα νουκλεοσώματα προκαλούν τη μετατόπισή τους και έτσι αποκαλύπτουν διάφορες θέσεις πρόσδεσης στο DNA με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας. Με αυτό τον τρόπο βοηθούν τους μεταγραφικούς παράγοντες να αποκτήσουν πρόσβαση στις θέσεις πρόσδεσης τους. Διάφορα σύμπλοκα έχουν ταυτοποιηθεί και όλα φέρουν κάποιο συστατικό με ενεργότητα ATPάσης, ώστε με την υδρόλυση του ATP να παραχθεί η απαιτούμενη ενέργεια για τη μετατόπιση/ αναδιοργάνωση του νουκλεοσώματος. Τα πιο καλά ταυτοποιημένα σύμπλοκα αυτής της ενεργότητας ανήκουν στην υπεροικογένεια SWI/SNF και συνήθως στρατολογούνται από τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τους ενεργοποιητές (Becker and Horz 2002). β) Τα νουκλεοσώματα δεν συμμετέχουν παθητικά στην αναγνώριση του DNA από του μεταγραφικούς παράγοντες. Μπορούν να υποστούν τροποποιήσεις στις ιστόνες, είτε με ομοιοπολική προσθήκη χημικών ομάδων στις ουρές (Goll and Bestor 2002, Zhang and Reinberg 2001) ή με ανταλλαγή των συγκεκριμένων ιστονών με άλλα παραλλάγματα αυτών (variants) (Ahmad and Henikoff 2002, Redon et al 2002). Οι τροποποιήσεις στις ουρές των ιστονών που έχουν ταυτοποιηθεί είναι ακετυλίωση, μεθυλίωση και ουβικουΐτινιλίωση σε κατάλοιπα λυσίνης, μεθυλίωση σε κατάλοιπα αργινίνης και φωσφορυλίωση σε σερίνες. Οι τροποποιήσεις επηρεάζουν αρνητικά ή θετικά η μία την άλλη και όλες μαζί αποτελούν σήματα για τη μεταγραφική κατάσταση της χρωματίνης, που ονομάζεται κώδικας ιστονών. Ο συνδυασμός των τροποποιήσεων μπορεί να προκαλεί περαιτέρω μεταγραφικά γεγονότα, όπως ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής καθώς και ετεροχρωματινοποίηση (Strahl and Allis 2002). Οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν να μεταβάλλονται ανάλογα με τη μεταγραφική κατάσταση του γενετικού τόπου. Γονίδια που είναι μεταγραφικά ενεργά είναι πλούσια σε ακετυλιωμένες λυσίνες ενώ αντίθετα κατασταλαμένα γονίδια είναι υποακετυλιωμένα. Η μεθυλίωση μπορεί να αποτελεί σήμα για ενεργοποίηση ή σιώπηση, αναλόγως το κατάλοιπο που έχει τροποποιηθεί. Διάφορα ένζυμα έχουν βρεθεί που είναι υπεύθυνα για αυτές τις τροποποιήσεις, όπως ακετυλοτρανσφεράσες (Gcn5, P/CAF, CBP, p300), απακετυλάσες (HDACs, NcoR, SMRT, Sin3 complex), μεθυλτρανσφεράσες (PRMT1, CARM1, Set1/9, Snf2h, G9a, Suvar3/9) και απομεθυλάσες (LSD-1, PAD-4). Τα ένζυμα

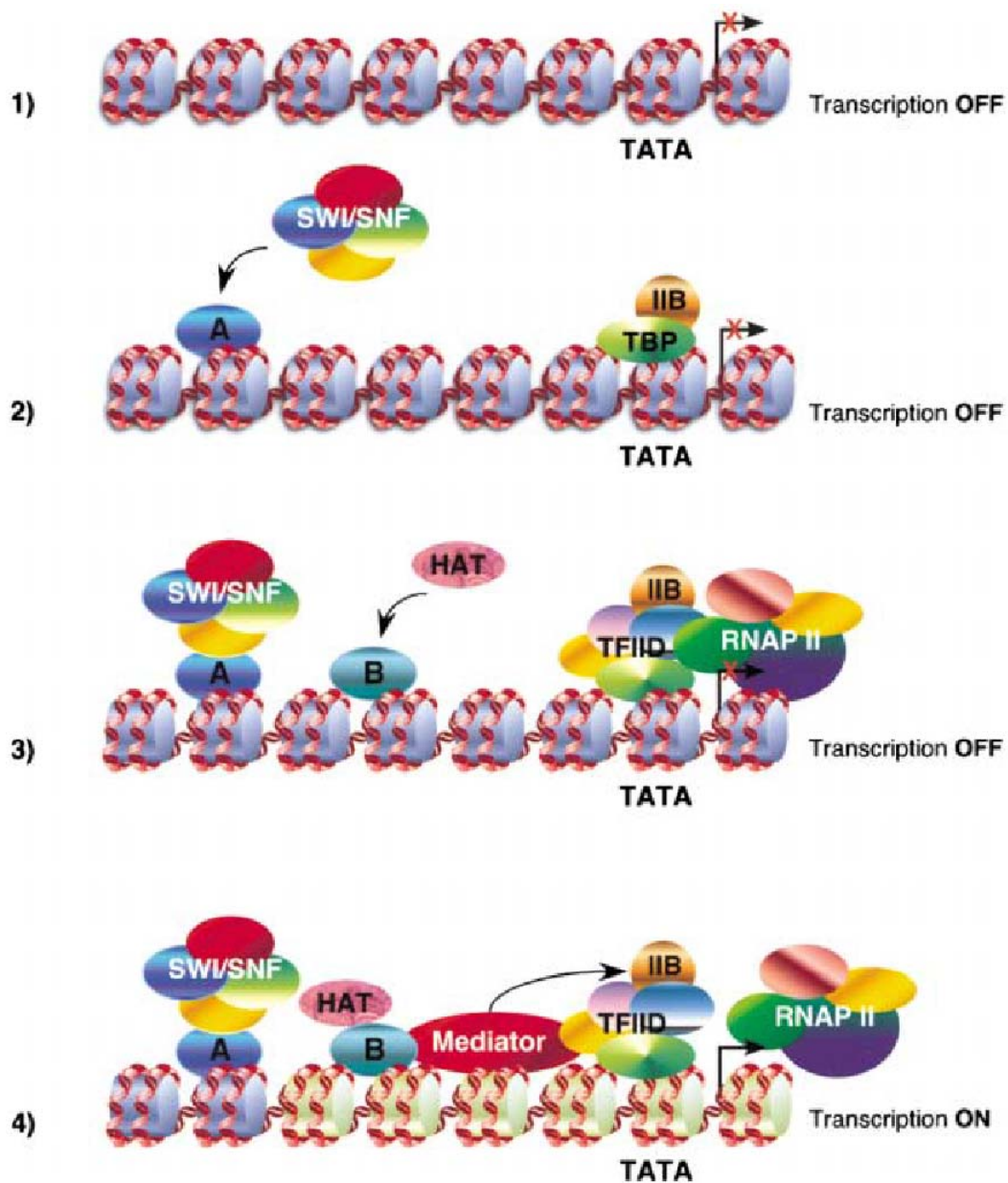
αυτά χαρακτηρίστηκαν αρχικά ως συνενεργοποιητές ή συγκαταστολείς της μεταγραφής.

## Μεταγραφική ενεργοποίηση & καταστολή

Τα γονίδια έχουν στους υποκινητές και τους ενισχυτές τους *cis* στοιχεία που ελέγχουν την έκφρασή τους με τελικό σκοπό τη στρατολόγηση του εναρκτήριου συμπλόκου της μεταγραφής. Τα στοιχεία αυτά είναι γενικά για τη μεταγραφή από την RNA polymerase II και αποτελούν το βασικό υποκινητή που περιλαμβάνει το στοιχείο TATA, το στοιχείο έναρξης (initiator) INR και το στοιχείο του υποκινητή προς το 3' άκρο του (downstream promoter element) DPE. Άλλα στοιχεία που μπορεί να εντοπίζονται προς το 5' του σημείου έναρξης της μεταγραφής είναι τα GC box, CCAAT box κ.α. Στους ενισχυτές αλλά και στους υποκινητές υπάρχουν στοιχεία στα οποία προσδένονται ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες που εκφράζονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, ιστούς ή κυτταρικές γενεαλογίες ή μετά από κάποια σηματοδότηση και ενεργοποιούν τη μεταγραφή (Lemon and Tjian 2000).

Η RNA polymerase II είναι το ένζυμο που καταλύει την παραγωγή του mRNA που μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, χρησιμοποιώντας ως καλούπι το DNA. Η δράση της εξαρτάται από άλλους παράγοντες, αφού δεν είναι ικανή μόνη της να αρχίσει τη μεταγραφή ή να αποκριθεί σε σήματα εξειδικευμένων μεταγραφικών παραγόντων. Κατά το πρώτο στάδιο τη μεταγραφικής ενεργοποίησης κάποιος ειδικός μεταγραφικός παράγοντας προσδένεται στο αντίστοιχο στοιχείο *cis* του υποκινητή. Σε αυτή τη φάση είναι πιθανό τα νουκλεοσώματα να μην έχουν τροποποιηθεί, ωστόσο ο μεταγραφικός παράγοντας έχει πρόσβαση στην αλληλουχία συνάφειάς του στο DNA. Σε ένα δεύτερο στάδιο ο μεταγραφικός παράγοντας στρατολογεί διάφορα ένζυμα-συνενεργοποιητές για να επιτευχθεί η τροποποίηση της χρωματίνης (**Εικόνα 1, στάδιο 2**). Τα ένζυμα αυτά, που συνήθως ανήκουν σε σύμπλοκα συνενεργοποιητών, είναι ακετυλτρανσφεράσες ιστονών (TAF250, p300/CBP, SRC-1, P/CAF), μεθυλτρανσφεράσες (Set1, Set7/9) και αναδιοργανωτές των νουκλεοσωμάτων (SWI/SNF). Η σειρά μπορεί να είναι και αντίστροφη, δηλαδή τα ένζυμα αρχικά τροποποιούν τη χρωματίνη ώστε να επιτραπεί η πρόσδεση του ειδικού μεταγραφικού παράγοντα. Για να αρχίσει όμως η μεταγραφή

απαιτείται η στρατολόγηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής που γίνεται συνήθως με την εξής σειρά.



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση των πιθανών σταδίων της μεταγραφικής ενεργοποίησης. (Emerson 2002)

Το σύμπλοκο TFIID που αποτελείται από το TBP (TATA Binding Protein) και ~10 TAFs (TBP-associated factors) προσδένεται στο στοιχείο TATA μέσω του TBP. Στη συνέχεια προσδένεται το TFIIB που είναι ένα πολυπεπτίδιο που προσδένεται στο στοιχείο BRE, συνδέει το TFIID με την πολυμεράση και ουσιαστικά βοηθά την RNA pol II να εντοπίσει τη θέση έναρξης της μεταγραφής. Το ολοένζυμο της

RNA pol II μπορεί τώρα να αλληλεπιδράσει με τον υποκινητή και μαζί με τους παράγοντες TFIIIF, TFIIIE και TFIIH σχηματίζει το προεναρκτήριο σύμπλοκο (pre-initiation complex: PIC) **(Εικόνα 1, στάδιο 3)**. Η διπλή έλικα στο σημείο του υποκινητή λιώνει (promoter melting) και η μεταγραφή μπορεί να αρχίσει **(Εικόνα 1, στάδιο 4)**. Το TFIIH φωσφορυλιώνει την καρβοξυτελική ουρά της πολυμεράσης και αυτή μπορεί να προχωρήσει από τον υποκινητή προς την κωδική περιοχή του γονιδίου (Cosma 2002, Hampsey and Reinberg 1999, Orphanides et al 1996).

Η καταστολή της μεταγραφής έχει συνδεθεί με την υποακετυλιωμένη κατάσταση των ιστονών **(Εικόνα 1, στάδιο 1)**. Πολλοί καταστολείς έχουν αναφερθεί να δρουν μέσω της στρατολόγησης συμπλόκων αποακετυλίωσης, όπως το σύμπλοκο Sin3-Rpd3 στα θηλαστικά, που απαρτίζεται μεταξύ άλλων από HDACs (Histone Deacetylases). Ως αποτέλεσμα, τα νουκλεοσώματα του υποκινητή έχουν αποακετυλιωμένες ουρές ιστονών και αυτό οδηγεί σε μια πιο συμπυκνωμένη δομή της χρωματίνης που είναι απαγορευτική για την πρόσδεση του συμπλόκου TFIIID και το σχηματισμό του προεναρκτήριου συμπλόκου (Struhl 1998).

Σε κατάσταση γονιδιακής καταστολής σε ευχρωματινικές περιοχές έχουν βρεθεί στους υποκινητές ένζυμα που μεθυλιώνουν τη λυσίνη 9 (K9) της ιστόνης H3. Τα ένζυμα αυτά (G9a, ESET) είναι πιθανό να μεθυλιώνουν τη χρωματίνη υποκινητών που δεν είναι σε θέση να στρατολογήσουν ενεργοποιητές. Το χαρακτηριστικό αυτής της κατάστασης είναι ότι μπορεί να ανατραπεί με τη δράση κατάλληλων σημάτων που έχουν ως συνέπεια τη στρατολόγηση ενεργοποιητών και συνενεργοποιητών στους υποκινητές. Η δομή των υποκινητών αλλάζει και επιτρέπεται η σταδιακή πρόσδεση του προεναρκτήριου συμπλόκου και η έναρξη της μεταγραφής (Tachibana et al 2002).

Είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης με το πέρασμα πολλών κυτταρικών κύκλων να παραμένει σταθερή η μεταγραφική κατάσταση κάποιων γονιδίων-ρυθμιστών της κυτταρικής γενεαλογίας. Αυτό σημαίνει ότι κάποια γονίδια πρέπει να παραμείνουν μεταγραφικά ικανά και σε ευχρωματινική κατάσταση, ενώ άλλα να υποστούν μόνιμη αποσιώπηση και ετεροχρωματινοποίηση. Αυτό επιτυγχάνεται με την ανταγωνιστική δράση συμπλόκων μεθυλτρανσφερασών, και πιο συγκεκριμένα των Trx/MLL και Ash1 (Milne et al 2002, Nakanura et al 2002, Beisel et al 2002) που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ευχρωματίνης και αντίθετα των συμπλόκων Sin39 και E(z)/EZH2 που δρουν ώστε να εγκαθιδρυθεί η ετεροχρωματίνη. Αυτά τα ένζυμα

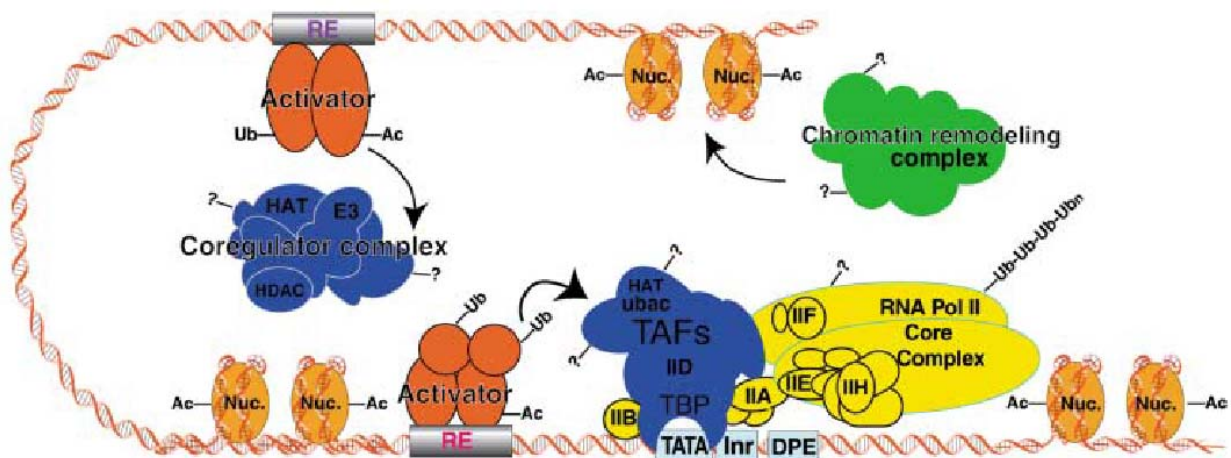
έχουν ως υποστρώματα διαφορετικά κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών H3 και H4 που επιτρέπουν ή αποτρέπουν τη δημιουργία ετεροχρωματίνης. Η ετεροχρωματίνη χαρακτηρίζεται από την πολύ συμπαγή της δομή, την παρουσία της πρωτεΐνης HP1 (Heterochromatin Protein 1) που αναγνωρίζει και προσδένεται σε μεθυλιωμένες λυσίνες K9 της ιστόνης H3, και από τη μεθυλίωση του DNA (Jenuwein 2002). Η πιο χαρακτηριστική ετεροχρωματίνη βρίσκεται στα κεντρομερή και στις μικροδορυφορικές επαναλήψεις. Για τη μεθυλίωση αυτών των περιοχών υπεύθυνη είναι το ένζυμο Suv39 (Jenuwein 2003).

## Η ρύθμιση των ρυθμιστών της μεταγραφής

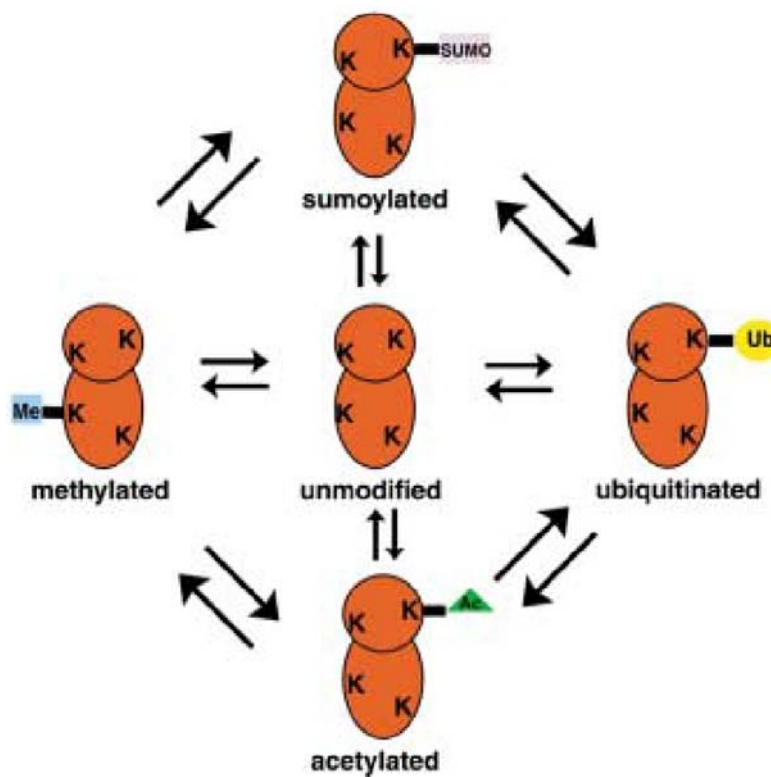
Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης καθορίζεται κατά ένα πολύ μεγάλο μέρος από την ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται σε εξειδικευμένες αλληλουχίες στους υποκινητές των γονιδίων. Πολλές από τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση που γίνονται εξαιτίας κάποιου εξωκυττάριου σήματος ή απόκρισης σε κάποιο αναπτυξιακό πρόγραμμα, οφείλονται σε αλλαγές της ενεργότητας ειδικών μεταγραφικών ενεργοποιητών ή καταστολέων. Η ρύθμιση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να γίνει σε πολλά διαφορετικά επίπεδα. Οι παράγοντες αυτοί εκφράζονται ή σταματούν να εκφράζονται, συγκρατούνται στο κυτταρόπλασμα μέσω άλλων πρωτεϊνών ρυθμιστών ή ελευθερώνονται και στοχεύονται στον πυρήνα, καθίστανται ικανοί ή όχι να προσδένονται στο DNA και να αλληλεπιδρούν με άλλους παράγοντες και τη βασική μεταγραφική μηχανή (**Εικόνα 2**). Τα παραπάνω στάδια ρύθμισης έχουν βρεθεί να είναι αντικείμενα μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Οι τροποποιήσεις των μεταγραφικών παραγόντων που έχουν ταυτοποιηθεί είναι η φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση, ουβικουΐτινιλίωση και σουμοϋλίωση και παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Διάφορες έχουν βρεθεί να είναι οι συνέπειες για κάθε μία από αυτές τις τροποποιήσεις όπως η αλλαγή στη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Barlev et al 2001), η απομάκρυνση ή είσοδος στον πυρήνα, η αλληλεπίδραση με το DNA, η στόχευση στο πρωτεάσωμα και πρωτεόλυση (Ub), η στόχευση σε άλλα διαμερίσματα του πυρήνα καθώς και η ανταγωνιστική δράση προς άλλες τροποποιήσεις που συμβαίνουν στα ίδια αμινοξικά κατάλοιπα (λυσίνες). Οι



τροποποιήσεις αυτές προσφέρουν γρήγορη και συνήθως αναστρέψιμη αλλαγή στη δομή των πρωτεϊνών (**Εικόνα 3**) (Freiman and Tjian 2003).



**Εικόνα 2.** Σχηματική απεικόνιση διάφορων μεταγραφικών παραγόντων του προεναρκτηρίου συμπλόκου της μεταγραφής που αποτελούν πιθανούς στόχους μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων. (Freiman and Tjian 2003)



**Εικόνα 3.** Τα κατάλοιπα λυσινών των μεταγραφικών παραγόντων είναι δέκτες πολλών ομοιοπολικών τροποποιήσεων. Απεικονίζεται ένα πιθανό δίκτυο αντιστρεπτών και δυναμικών τροποποιήσεων των λυσινών. (Freiman and Tjian 2003)

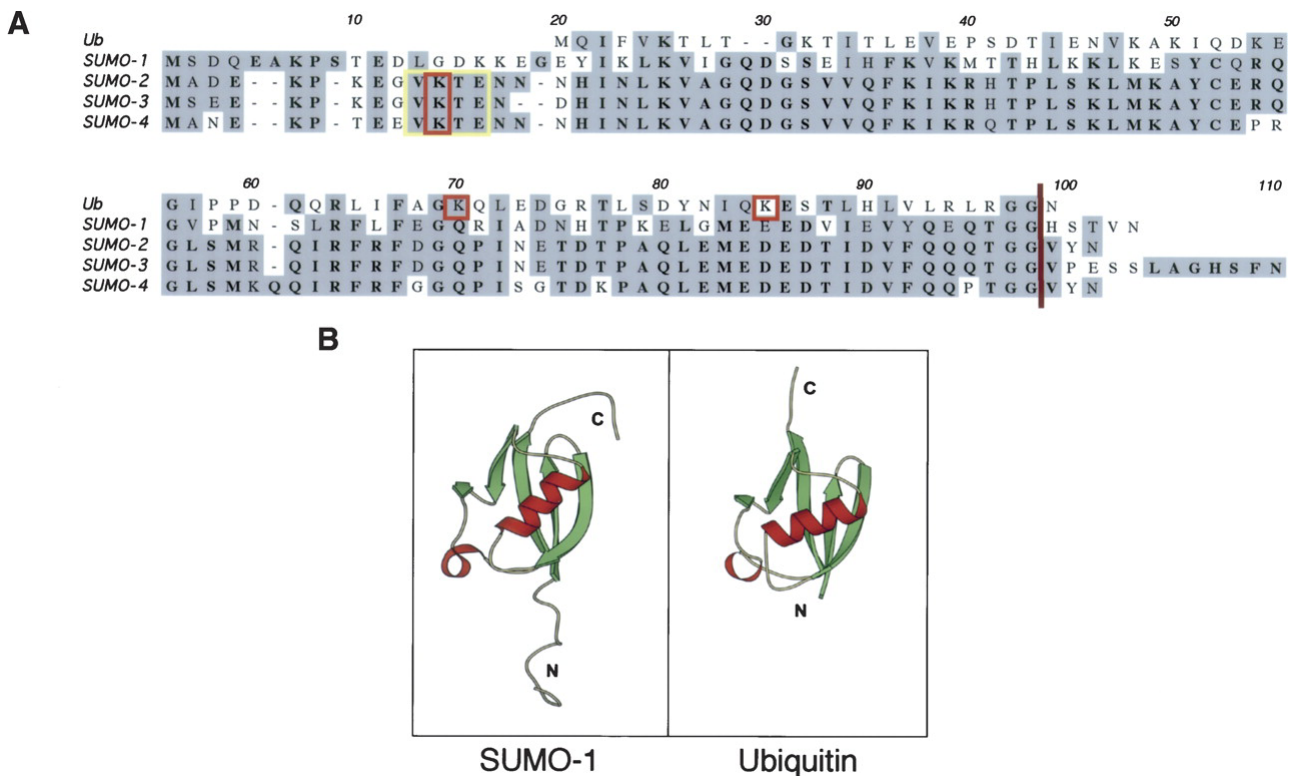
Στις περιπτώσεις της ουβικουϊτινιλίωσης και σουμοϋλίωσης γίνεται ομοιοπολική σύνδεση ενός πολυπεπτιδίου και όχι απλώς μιας χημικής ομάδας. Η προσθήκη της ουβικουϊτίνης (Ub) συνήθως αποτελεί σήμα για πρωτεόλυση από το πρωτεάσωμα. Σε αντίθεση με την Ub η προσθήκη του παρόμοιου σε δομή πολυπεπτιδίου, SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier), δεν αποτελεί σήμα για πρωτεόλυση αλλά μπορεί να τροποποιεί μεταγραφικούς παράγοντες με διάφορες συνέπειες. Θα αναλυθεί η τροποποίηση από SUMO και οι συνέπειες από αυτήν, η οποία είναι και το κύριο αντικείμενο της εργασίας.

## Το μονοπάτι προσθήκης SUMO

### SUMO

Το SUMO είναι ένα μικρό σφαιρικό πολυπεπτίδιο που μοιάζει με την ουβικουϊτίνη στη δομή και προσδένεται στις πρωτεΐνες στόχους με ένα παρόμοιο ενζυματικό μηχανισμό (**Εικόνα 4B**) (Bayer et al 1998). Η προσθήκη του SUMO γίνεται σε λυσίνες στόχους που εντοπίζονται συνήθως στη συντηρημένη περιοχή Ψ-Lys-X-Glu (Ψ: μεγάλο υδρόφοβο αμινοξύ, X: οποιοδήποτε αμινοξύ) (Rodriguez et al 2001). Στα θηλαστικά υπάρχουν 4 πρωτεΐνες SUMO, SUMO-1/Smt3C, SUMO-2/Smt3A και SUMO-3/Smt3B και SUMO-4 (**Εικόνα 4A**). Διάφορες πρωτεΐνες τροποποιούνται και από τα τρία πρώτα είδη SUMO σε πειράματα *in vivo* και *in vitro*, αλλά στις κυτταρικές διαδικασίες ενδεχομένως να υπάρχει ειδικότητα. Αυτό φαίνεται και από το γεγονός ότι στα κύτταρα των θηλαστικών το μεγαλύτερο ποσοστό του SUMO-1 βρίσκεται προσδεμένο σε πρωτεΐνες στόχους, ενώ τα SUMO2/3 είναι ελεύθερα και η πρόσδεσή τους στους στόχους είναι αποτέλεσμα σήματος μετά από έντονο κυτταρικό σοκ (θερμικό ή οξειδωτικό) (Saitoh and Hinchev 2000). Ένα άλλο παράδειγμα της διαφορετικής τους δράσης είναι ο διαφορετικός εντοπισμός του μεταγραφικού παράγοντα SATB2, όταν σε αυτόν προσδένεται SUMO-1 ή SUMO2/3. Στην πρώτη περίπτωση εντοπίζεται σε πυρηνικά σωματίδια ενώ στη δεύτερη περίπτωση στην περιφέρεια του πυρήνα (Dobrevna et al 2003). Τα SUMO2/3 είναι πιθανό να σχηματίζουν αλυσίδες όταν προσδένονται στις πρωτεΐνες στόχους, αφού φέρουν τη συντηρημένη αλληλουχία Ψ-Lys-X-Glu (Johnson and Gupta 2001, Tatham et al 2001, Pichler et al 2002). Το SUMO-4

ανακαλύφθηκε πρόσφατα και φαίνεται να έχει περιορισμένο πρότυπο έκφρασης με υψηλότερα ποσοστά στο νεφρό. (Bohren et al 2003).

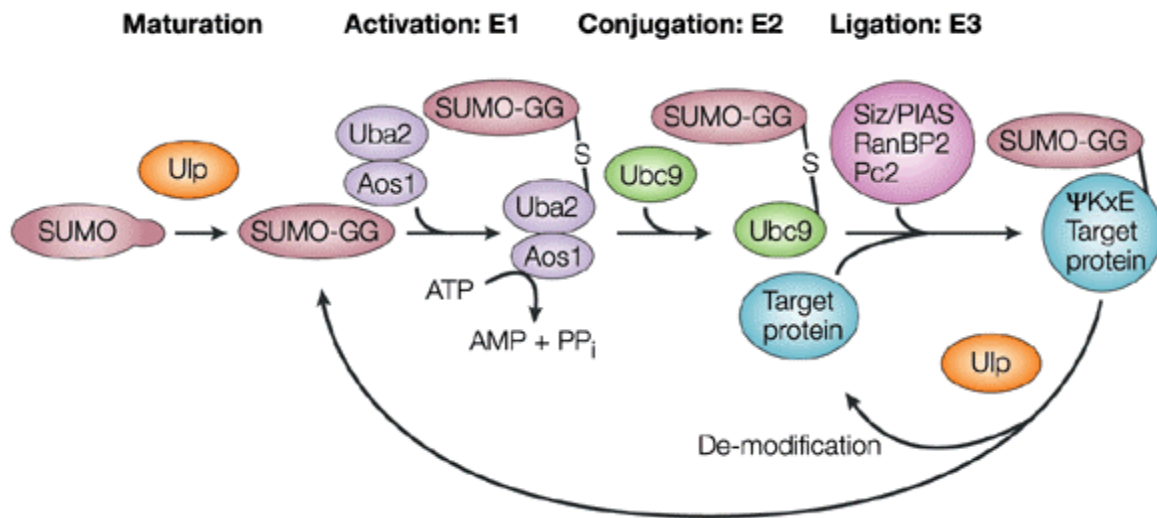


**Εικόνα 4.** (A) Οι αμινοξικές αλληλουχίες της Ub και των 4 πρωτεϊνών SUMO. Τα έντονα γράμματα αντιστοιχούν σε ίδια αμινοξέα και τα σκιασμένα σε παρόμοια. Με κίτρινο σημειώνεται η αλληλουχία προσθήκης SUMO στα SUMO-2, SUMO-3 και SUMO-4. Η λυσίνη δέκτης σημειώνεται με κόκκινο. (B) Διαγράμματα που απεικονίζουν τη δομική ομοιότητα του SUMO-1 και της Ub. Το SUMO-1 έχει μια αμινοτελική προεξοχή σε αντίθεση με την Ub. (Gill 2004)

## Τα ένζυμα του μονοπατιού SUMO

Το μονοπάτι τροποποίησης με SUMO είναι ομόλογο με αυτό της Ub με τη διαφορά ότι συμμετέχουν διαφορετικά ένζυμα (**Εικόνα 5**). Το SUMO «ωριμάζει» μετά από πρωτεόλυση του καρβοξυτελικού κομματιού του από την ειδική πρωτεάση SUMO Protease (SuPr) και στη συνέχεια ενεργοποιείται προσδεδεμένο στο ετεροδιμερές ένζυμο E1 SAE1(AOS1)/SAE2(UBA2). Το ενεργοποιημένο SUMO μεταφέρεται στο μοναδικό ένζυμο E2, το Ubc9 και στη συνέχεια στη συγκεκριμένη λυσίνη της πρωτεΐνης στόχου (Desterro et al 1998). Η μεταφορά από το ένζυμο E2 στη λυσίνη στόχο καταλύεται από τα ένζυμα E3

που έχουν δράση λιγάσης και προσφέρουν εξειδίκευση στις *in vivo* διαδικασίες (Seeler and Dejean 2003, Gill 2004).



**Εικόνα 5.** Το ενζυματικό μονοπάτι προσθήκης SUMO. (Seeler and Dejean 2003)

Έχουν ταυτοποιηθεί τρία είδη λιγασών μέχρι στιγμής (Hochstrasser 2001). Τα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των SIZ/PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) και διαθέτουν μια σημαντική για τη δράση λιγάσης περιοχή RING που παρουσιάζει ομοιότητες με τις λιγάσες του μονοπατιού της Ub. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με το E2 ένζυμο Ubc9 και το υπόστρωμα και αυξάνουν το ρυθμό της αντίδρασης προσθήκης SUMO. Αρχικά βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη Siz1 είναι απαραίτητη για την τροποποίηση των σεπτινών και άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών του σακχαρομύκητα. Στη συνέχεια δείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες PIAS (είναι τουλάχιστον τέσσερις, 1, 3, x, και γ καθώς και προϊόντα εναλλακτικής συρραφής των mRNA) έχουν δράση E3 SUMO λιγάσης (Kahyo et al 2001, Kotaja et al 2002). Κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες έχει την ικανότητα να δράσει σε ορισμένα και όχι όλα τα υποστρώματα. Για παράδειγμα τα ένζυμα PIAS1 και PIASγ καταλύουν την προσθήκη SUMO στους μεταγραφικούς παράγοντες p53 και LEF1 αντίστοιχα (Schmidt and Muller 2002, Sachdev et al 2001). Αρχικά οι πρωτεΐνες PIAS χαρακτηρίστηκαν ως καταστολείς των STATs, στη συνέχεια όμως βρέθηκαν να επηρεάζουν τη μεταγραφική ενεργότητα πολλών παραγόντων, τόσο μέσω του μονοπατιού σουμοϋλίωσης όσο και ανεξάρτητα από αυτό.

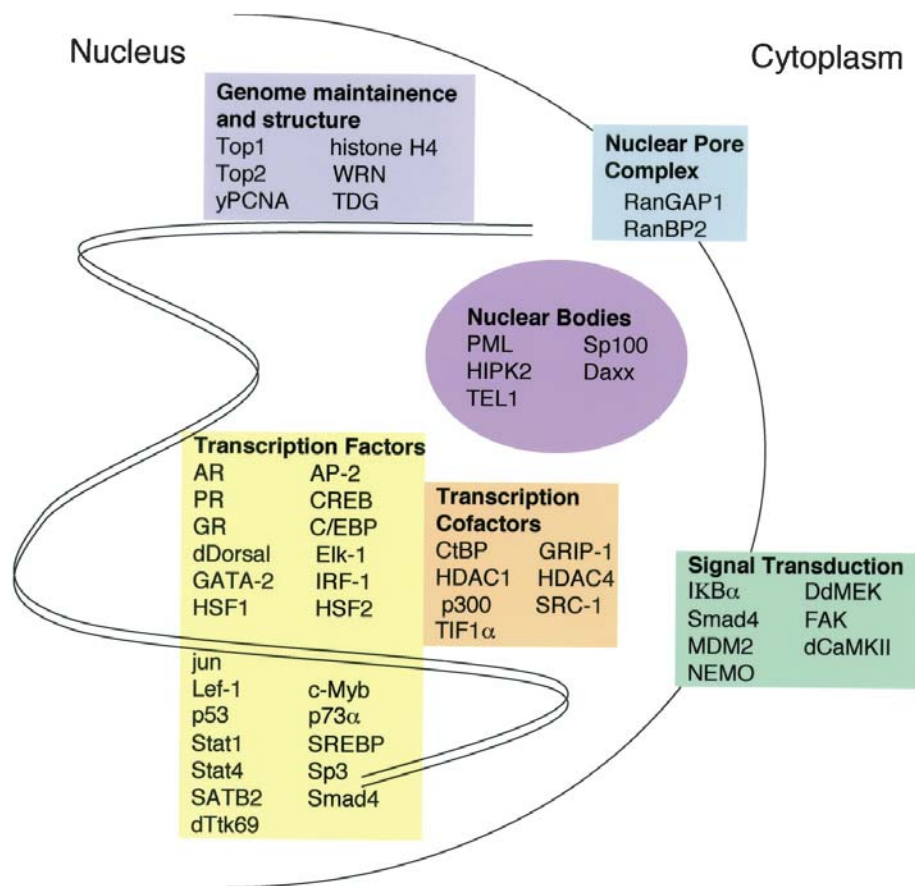
Η δεύτερη ομάδα λιγασών έχει ένα μόνο μέλος, την RANBP2 η οποία παρότι έχει περιοχή RING, αυτή δεν εντοπίζεται στην καταλυτική της περιοχή και δεν είναι απαραίτητη για την ενζυματική της δράση. Η RANBP2 καταλύει την προσθήκη SUMO στο RANGAP1 (small GTPase-activating protein). Η σουμοϋλίωση του RANGAP1 είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδρασή του με το σύμπλοκο του πυρηνικού πόρου και κατά συνέπεια τη λειτουργία εισόδου διαφόρων πρωτεϊνών μέσα στον πυρήνα (Pichler et al 2002). Η RANBP2 έχει δειχθεί επίσης να δρα ως λιγάση για το SP100, που είναι συστατικό του σωματίου PML, καθώς και για τις πρωτεΐνες HDAC4 και MDM2 (λιγάση Ub για το p53) αλλά όχι για την p53 (Kirsh et al 2002, Miyauchi et al 2002). Η τρίτη πρωτεΐνη που δείχθηκε να σουμοϋλιώνεται και να μπορεί να καταλύει τη μεταφορά του SUMO στους μεταγραφικούς συγκαταστολείς CtBP είναι η ανθρώπινη πρωτεΐνη Pc2, μέλος του συμπλόκου Polycomb Group (PcG) (Kagey et al 2003). Το σύμπλοκο PcG είναι υπεύθυνο για την αποσιώπηση των ομοιωτικών γονιδίων με τον σχηματισμό ετεροχρωματίνης. Διαθέτει ενζυμική ενεργότητα μεθυλτρανσφεράσης που είναι απαραίτητη για τη δράση του και συγκεντρώνεται σε διακριτά σωματίδια PcG (PcG bodies). Η Pc2 αρχικά ταυτοποιήθηκε ως καταστολέας, λόγω της αλληλεπίδρασής της με άλλα συστατικά του συμπλόκου PcG. Δεν παρουσιάζει καμία δομική ομοιότητα με τις άλλες λιγάσες E3 καθώς δε διαθέτει περιοχή RING και άρα αποτελεί ξεχωριστή ομάδα λιγάσης.

Η προσθήκη SUMO είναι μια δυναμική, αντιστρεπτή διαδικασία και η απομάκρυνση του SUMO γίνεται με τη δράση ειδικών πρωτεασών, των ίδιων που είναι υπεύθυνες για την ωρίμανσή του (Gong et al 2000, Kim et al 2000). Οι πρωτεάσες που είναι γνωστές μέχρι σήμερα, παρουσιάζουν η κάθε μία διαφορετικό πρότυπο εντοπισμού μέσα στον πυρήνα. Ο διαφορετικός εντοπισμός ενδεχομένως να είναι αυτός που προσδίδει και την εξειδίκευση για το σουμοϋλιωμένο υπόστρωμα που δρουν. Για παράδειγμα η πρωτεάση SENP2 εντοπίζεται στον πυρηνικό πόρο, η SMT3IP1 στον πυρηνίσκο και η SuPr-1 στα σωματίδια PML (Best et al 2002). Η SuPr-1 αποτελεί την ειδική πρωτεάση που απομακρύνει το SUMO από το PML. Αναμένεται η δράση της να είναι ρυθμιζόμενη, με άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο, αφού συνυπάρχει με το σουμοϋλιωμένο PML στα σωματίδια PML. Επιπλέον η SuPr-1 έχει δειχθεί να απομακρύνει το SUMO από το μεταγραφικό παράγοντα Sp3 με συνέπεια να αυξάνει κατά πολύ την ενεργότητά του. Επίσης δρα αυξητικά στη μεταγραφική ενεργότητα του c-Jun ανεξάρτητα από τη δυνατότητα σουμοϋλίωσης του ίδιου

του c-Jun (Best et al 2002). Αυτό σημαίνει ότι λειτουργεί με τρόπο ώστε να αυξήσει τη διαθεσιμότητα συνενεργοποιητών, όπως το CBP, πιθανότατα απελευθερώνοντας τους από τα σωματίδια PML, όπου κρατιούνται ανενεργοί μέσω της δικής τους σουμοϋλίωσης.

## Ο ρόλος της τροποποίησης με SUMO

Πάρα πολλές πρωτεΐνες, κυρίως πυρηνικές, έχουν βρεθεί να είναι στόχοι του μονοπατιού SUMO και αρκετές διαφορετικές λειτουργίες έχουν αποδοθεί σε αυτή τη μεταμεταφραστική τροποποίηση (**Εικόνα 6**).

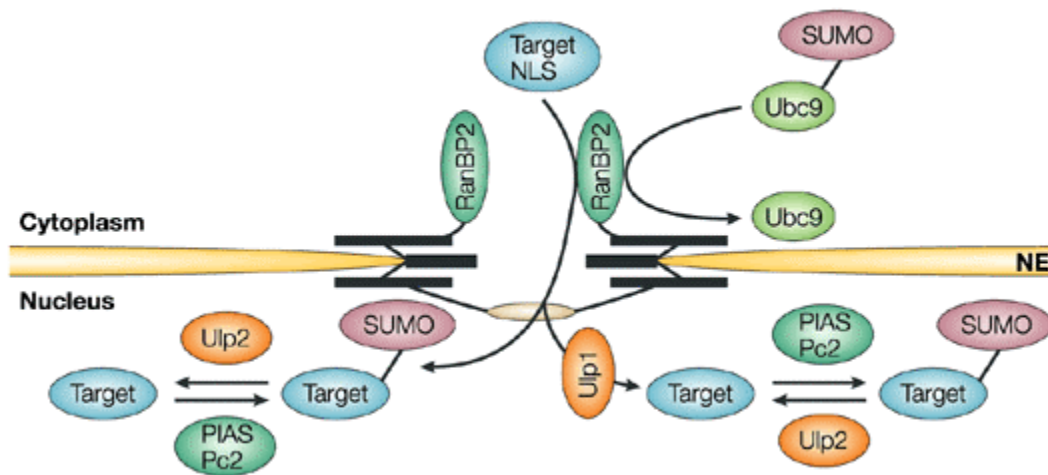


**Εικόνα 6.** Μερικές από τις πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί τροποποιημένες με SUMO. Είναι διαχωρισμένες ανάλογα με τη λειτουργία και την τοπολογία τους. (Gill 2004)

Η παρατήρηση ότι η σουμοϋλίωση του RANGAP1 είναι απαραίτητη για τη στόχευσή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρηνικό πόρο, έδειξε ότι είναι μια



σημαντική τροποποίηση για τη λειτουργία της μετακίνησης των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (**Εικόνα 7**) (Matunis et al 1996, Mahajan et al 1997). Απαραίτητο είναι επίσης το SUMO για τη στόχευση του RANGAP1 στη μιτωτική άτρακτο και τους κινετοχώρους κατά την κυτταρική διαίρεση καθώς και για τον πυρηνικό εντοπισμό της αδενοϊικής πρωτεΐνης E1B (Joseph et al 2002, Endter et al 2001). Το SUMO έχει επίσης την ιδιότητα να επηρεάζει μαζικά την αρχιτεκτονική του πυρήνα, αφού η ακεραιότητα των σωματιδίων PML εξαρτάται από την ικανότητα της πρωτεΐνης PML να είναι και να παραμένει σουμοϋλιωμένη. Η σουμοϋλίωση λοιπόν επηρεάζει τον εντοπισμό των πρωτεϊνών στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.



**Εικόνα 7.** Τροποποίηση με SUMO κατά την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα με τη δράση της E3 λιγάσης RANBP2 που είναι συστατικό του πυρηνικού πόρου. Το SUMO είναι πιθανό να απομακρύνεται μετά την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα και αν απαιτείται τροποποιείται ξανά με τη δράση άλλων E3 ενζύμων. (Seeler and Dejean)

Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί να είναι τροποποιημένες με SUMO είναι και πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες και ο αριθμός τους ολοένα και αυξάνει (**Εικόνα 6**). Ο ρόλος του SUMO στη δράση των μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να εξηγηθεί με δύο διαφορετικά μοντέλα, χωρίς αναγκαστικά να αποκλείει το ένα το άλλο. Το πρώτο μοντέλο αφορά την απομάκρυνση του μεταγραφικού παράγοντα από τον υποκινητή δράσης του και τη συγκράτησή του σε συγκεκριμένα διαμερίσματα μέσα στον πυρήνα, που πολλές φορές συμπίπτουν με τα σωματίδια PML. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο παράγοντας LEF-1 που η αλληλεπίδραση με τη λιγάση PIASy έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του πυρηνικού του εντοπισμού. Ο LEF-1

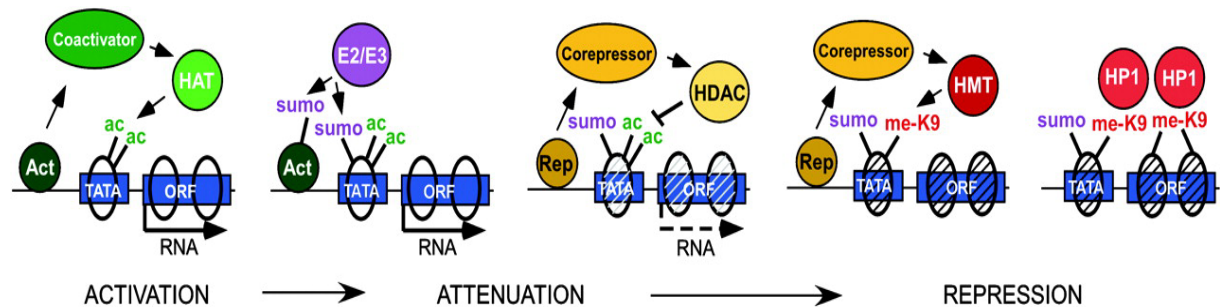
δεν είναι πια διάχυτος αλλά συγκεντρώνεται σε διακριτά σωμάτια με αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας (Sachdev *et al* 2001). Αυτό το γενικό μοντέλο έχει περιγραφεί και για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Ένα άλλο παράδειγμα είναι το Sp3 που όταν οι συνθήκες επιτρέπουν την πρόσδεση του SUMO, ο μεταγραφικός παράγοντας εντοπίζεται σε πυρηνικά σωμάτια και στην περιφέρεια του πυρήνα, ενώ όταν είναι αποσομουλιωμένος και ενεργός εντοπίζεται διάχυτος στον πυρήνα (Ross *et al* 2002, Sapetschnig *et al* 2002). Σε μια λίγο διαφορετική περίπτωση, οι μεταγραφικοί παράγοντες HSF1 και HSF2 σουμουλιώνονται μετά από θερμικό σοκ. Η τροποποίηση αυτή αλλάζει τον πυρηνικό τους εντοπισμό και προκαλεί τη συγκέντρωσή τους σε συγκεκριμένους χώρους μέσα στον πυρήνα, που ενδεχομένως να είναι τα σωμάτια PML. Το αποτέλεσμα από αυτή την τροποποίηση είναι η ενεργοποίηση της ικανότητας πρόσδεσης των HSF1 και HSF2 στο DNA και κατά συνέπεια η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων τους (Goodson *et al* 2001, Hong *et al* 2001).

Το γεγονός ότι η πρόσδεση του SUMO αλλάζει τον εντοπισμό των μεταγραφικών παραγόντων μέσα στον πυρήνα δε σημαίνει ότι δε μπορεί να επηρεάζει και με άμεσο τρόπο τα μεταγραφικά σύμπλοκα. Ένα παράδειγμα είναι η σουμουλίωση του p300, που δεν φαίνεται να αλλάζει τον εντοπισμό του στον πυρήνα αλλά είναι απαραίτητη για την καταστολή της δράσης του, αφού προσφέρει επιφάνεια αλληλεπίδρασης με το HDAC-6 (Girdwood *et al* 2003). Παρόμοιος έχει αναφερθεί να είναι ο μηχανισμός καταστολής του μεταγραφικού παράγοντα Elk-1, ο οποίος σουμουλιώνεται και αλληλεπιδρά με το HDAC-2 (Yang and Sharrocks 2004). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις δεν είναι επιβεβαιωμένο ότι συμβαίνουν πάνω στους ενδογενείς υποκινητές. Δεν αποκλείεται λοιπόν αυτό το μοντέλο να είναι παραλλαγή της απομάκρυνσης των μεταγραφικών παραγόντων από τους υποκινητές, λόγω της σουμουλίωσής τους, και ακόλουθη αλληλεπίδραση με τους συγκατασταλείς στις νέες θέσεις συγκέντρωσής τους.

Η τροποποίηση με SUMO φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγραφή και σε ένα άλλο επίπεδο, αυτό της χρωματίνης. Υπάρχει μία εργασία που δείχνει ότι η ιστόνη H4 σουμουλιώνεται και αυτό έχει ως συνέπεια τη στρατολόγηση της απακετυλάσης HDAC-1 και της πρωτεΐνης HP1, που είναι χαρακτηριστικά στοιχεία μεταγραφικής καταστολής και αποσιώπησης στην ετεροχρωματίνη (Shiio and Eisenman 2003). Παρόλο που τα δεδομένα αυτά δε στηρίζονται σε πειράματα με ενδογενείς υποκινητές αλλά σε τεχνητά πλασμίδια αναφοράς



που εισήλθαν παροδικά σε κύτταρα θηλαστικών, φαίνεται ότι το μονοπάτι της σουμοϋλίωσης έχει κατασταλτικό ρόλο και στην περίπτωση της χρωματίνης (**Εικόνα 8**). Δεν είναι όμως γνωστό αν και πώς η σουμοϋλίωση επηρεάζει τη δομή των νουκλεοσωμάτων *in vivo*. Η διαλεύκανση αυτού του ερωτήματος δεν είναι εύκολη αφού πολλοί και διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι σουμοϋλιωμένοι ταυτόχρονα με τις ιστόνες και ίσως προσδεμένοι στους υποκινητές.



**Εικόνα 8.** Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου ρόλου της τροποποίησης των ιστονών με SUMO στη μεταγραφική καταστολή. (Nathan et al 2003)

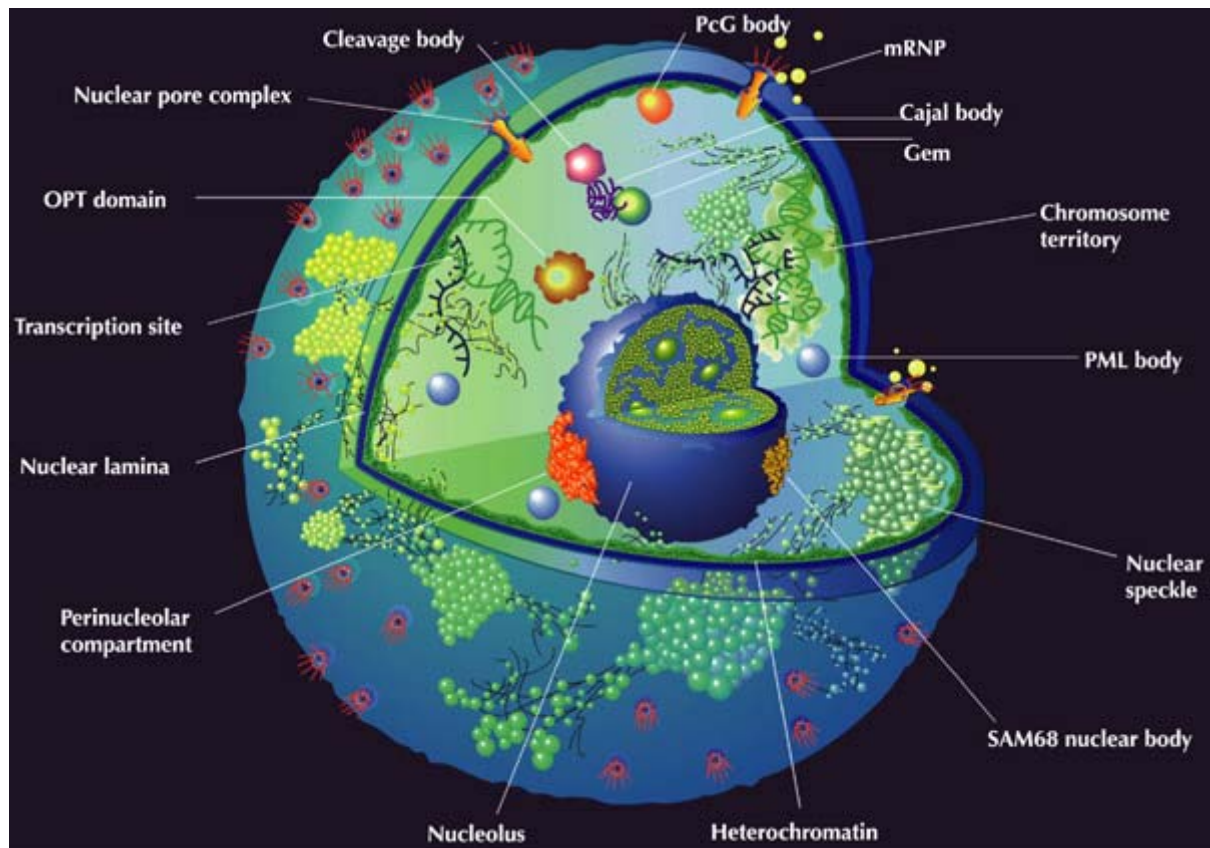
Το SUMO έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε μηχανισμούς αντιγραφής και διόρθωσης του DNA. Ένα παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη PCNA (proliferating cell nuclear antigen) που μπορεί να ουβικουϊτινιλιώνεται και να σουμοϋλιώνεται στο ίδιο κατάλοιπο λυσίνης. Όταν επιτρέπεται η ουβικουϊτινιλίωση, που σε αυτή την περίπτωση δε στοχεύει την πρωτεΐνη PCNA για πρωτεόλυση, είναι δυνατή η δράση της στην επιδιορθωτική μηχανή μετά από πρόκληση βλαβών στο DNA. Όταν αντίθετα η λυσίνη αυτή φέρει SUMO τότε η PCNA δρα στην επιδιόρθωση του DNA κατά την αντιγραφή του (Hoeye et al 2002, Kannouche et al 2004).

## Το περιβάλλον του πυρήνα

Η έκφραση των γονιδίων των ευκαρυωτικών οργανισμών γίνεται μέσα στον πυρήνα. Η αντίληψη του στατικού πυρήνα μέσα στον οποίο οι μεταγραφικοί παράγοντες εντοπίζουν τα γονίδια και τα μεταγράφουν μοιάζει απλοϊκή. Εναλλακτικά και κατ' αναλογία με το διαμερισματοποιημένο κυτταρόπλασμα, η ύπαρξη πολυάριθμων οργανιδίων μέσα στον πυρήνα

σημαίνει ότι οι διάφορες διαδικασίες συμβαίνουν σε συγκεκριμένα διαμερίσματα. Τα δεδομένα που υποστηρίζουν αυτή την αντίληψη προκύπτουν από πειράματα μικροσκοπίας (ηλεκτρονικής και ανοσοφθορισμού) καθώς και από τελευταία πειράματα μικροσκοπίας *in vivo*. Αν λάβει κανείς υπόψη την υψηλή περιεκτικότητα του πυρήνα σε DNA, RNA και πρωτεΐνες τότε το περιβάλλον θα έπρεπε να έχει πολύ υψηλό ιξώδες. Αν αυτό ήταν αλήθεια, τότε η μετακίνηση των πρωτεϊνών μέσα στον πυρήνα θα έπρεπε να είναι περιορισμένη και μηχανισμοί ενεργητικής μεταφοράς θα έπρεπε να λαμβάνουν χώρα ώστε να μεταφέρουν τις πυρηνικές πρωτεΐνες στους προορισμούς τους. Αντίθετα, με πειράματα *in vivo* μικροσκοπίας (Fluorescence Recovery After Photobleaching) φαίνεται ότι πολλές πυρηνικές πρωτεΐνες κινούνται μέσα στον πυρήνα με ρυθμούς διάχυσης (Phair and Misteli 2000, Pederson 2000, Shopland and Lawrence 2000). Τα πειράματα αυτά αφορούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε πολλές διαφορετικές πυρηνικές διεργασίες, όπως μεταγραφική ενεργοποίηση, αναδιοργάνωση της χρωματίνης, διόρθωση του DNA, συρραφή του mRNA. Ο όγκος του πυρήνα που δεν είναι προσιτός, με τη μέθοδο της διάχυσης, στις διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες υπολογίζεται σε λιγότερο από 15% και αυτό καταλαμβάνουν η χρωματίνη και τα διάφορα διαμερίσματα.

Ο ευκαρυωτικός πυρήνας αποτελείται από διακριτά διαμερίσματα, τα οποία διαφέρουν από αυτά του κυτταροπλάσματος γιατί στην πλειοψηφία τους δεν συνδέονται με μεμβράνες και δεν ορίζονται από αυτές (**Εικόνα 9**). Τα περισσότερα είναι δυναμικοί σχηματισμοί, δημιουργούνται αυθόρμητα λόγω αλληλεπίδρασης των συστατικών τους, αποδομούνται κατά τη διαίρεση και ξανασχηματίζονται στα θυγατρικά κύτταρα. (Misteli 2000, Spector 2003, Spector and Gasser 2003). Από την άλλη πλευρά, η χρωματίνη που είναι από τα πιο κύρια συστατικά του πυρήνα και αποτελείται από το DNA και διάφορες πρωτεΐνες, κατά τη μίτωση εμφανίζεται ως διακριτά, συμπυκνμένα χρωμοσώματα ενώ κατά τη μεσόφαση καταλαμβάνει διάφορες περιοχές του πυρήνα και οργανώνεται σε ετεροχρωματίνη (πιο συμπυκνόμενη) και σε ευχρωματίνη (Felsenfeld and Groudine 2003). Η χρωματίνη φαίνεται να βρίσκεται σε αλληλεπίδραση, φυσική καθώς και λειτουργική με ορισμένα από αυτά τα λειτουργικά διαμερίσματα, με τελικό στόχο την ακριβή γονιδιακή ρύθμιση.



**Εικόνα 9.** Σχηματική απεικόνιση τυπικού πυρήνα κυττάρου θηλαστικών όπου φαίνεται η πλειοψηφία των πυρηνικών περιοχών που έχουν ταυτοποιηθεί ή παρατηρηθεί μέχρι τώρα. (Spector 2003)

## Η γενωμική οργάνωση στον πυρήνα της μεσόφασης

Καθένα από τα χρωμοσώματα κατά τη μεσόφαση καταλαμβάνει διακριτές περιοχές μέσα στον πυρήνα (chromosome territories). Η κατανομή των χρωμοσωμάτων δεν είναι καθόλου τυχαία. Αντίθετα, τοποθετούνται σε θέσεις προτίμησης σε σχέση με τα υπόλοιπα χρωμοσώματα, το κέντρο του πυρήνα, την περιφέρειά του και άλλα πυρηνικά πρωτεϊνικά διαμερίσματα. Χρωμοσώματα με λίγα γονίδια συνήθως εντοπίζονται στην περιφέρεια του πυρήνα ενώ χρωμοσώματα πλούσια σε γονίδια βρίσκονται σε πιο κεντρικά σημεία του πυρήνα. Μελέτες μικροσκοπίας έδειξαν ότι κάθε χρωμοσωμική περιοχή είναι εξαιρετικά πορώδης, τη διαπερνούν κανάλια και σχηματίζει χρωματινικές θηλιές. Αυτό που διαφαίνεται από τα πειράματα είναι ότι ακόμη και τα γονίδια της ίδιας χρωμοσωμικής περιοχής έχουν συγκεκριμένη θέση. Οι εν δυνάμει μεταγραφικοί ενεργοί γονιδιακοί τόποι εκτείνονται έξω από τις χρωμοσωμικές περιοχές και σχηματίζουν θηλιές ώστε οι μεταγραφικοί

παράγοντες να έχουν πρόσβαση σε αυτές, ενώ οι μεταγραφικά ανενεργές περιοχές τείνουν προς το εσωτερικό. Κατά συνέπεια κάθε γενετικός τόπος, σε κάθε κυτταρικό τύπο έχει το δικό του ειδικό μικροπεριβάλλον που καθορίζει ή καθορίζεται από τη μεταγραφική του κατάσταση. (Cremer and Cremer 2001, Visser et al 2000, Isogai and Tjian 2003, Gasser 2001, Misteli 2004).

Η χρωματίνη στον πυρήνα διαχωρίζεται σε ετεροχρωματίνη και ευχρωματίνη. Η ετεροχρωματίνη, που είναι πιο συμπυκνωμένη κατά τη μεσόφαση, χαρακτηρίζεται από μεθυλίωση του DNA και από συγκεκριμένες τροποποιήσεις των ιστονών και εντοπίζεται κυρίως στην περιφέρεια του πυρήνα. Υπάρχουν επίσης στοιχεία που δείχνουν ότι η αποσιώπηση διαφόρων γονιδίων που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη συμπίπτει με τη μετατόπισή τους σε περιοχές ετεροχρωματίνης. Αντίθετα πολύ ενεργά γονίδια εντοπίζονται μακριά από αυτές τις περιοχές. (Baxter et al 2002) Αυτό που φαίνεται είναι ότι *cis* περιοχές του DNA, όπως locus control regions, enhancers, insulators, δρουν ώστε να κρατούν τους γενετικούς τόπους σε περιοχές ευχρωματίνης. Από την άλλη πλευρά πολλά ανενεργά γονίδια εντοπίζονται σε περιοχές του πυρήνα που ορίζεται από κεντρομερική ετεροχρωματίνη. Δεν είναι γνωστό αν τοποθετούνται στις περιοχές ετεροχρωματίνης προκειμένου να μείνουν μεταγραφικά ανενεργά ή η στόχευσή τους σε αυτές τις περιοχές είναι συνέπεια της απενεργοποίησής τους (Carro-Fonseca 2002).

## Οι περιοχές μεταγραφής από RNA πολυμεράση II και III

Οι περιοχές μεταγραφής χαρακτηρίζονται από την παρουσία της RNA πολυμεράσης II ή III και με μεθόδους αναλυτικής μικροσκοπίας προσδιορίζονται στις ~10.000 (~8.000 περιοχές RNA pol II και ~2.000 περιοχές RNA pol III) σε ένα τυπικό πυρήνα κυττάρου HeLa. Κάθε μία από αυτές τις περιοχές έχει διάμετρο ~50nm και ορίζεται ως εργοστάσιο μεταγραφής (transcription factory). Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται στην περιφέρεια των περιχρωματινικών ινιδίων (perichromatin fibrils) που αντιστοιχούν στο νεοσυντιθέμενο mRNA καθώς και στην περιφέρεια χρωμοσωμικών περιοχών πλουσίων σε γονίδια. Είναι χαρακτηριστικό ότι κανένα εργοστάσιο μεταγραφής δεν εντοπίζεται στην περιφέρεια του απενεργοποιημένου X χρωμοσώματος. (Spector et al 1991, Iborra et al 1996, Jackson et al 1998)

## Ο πυρηνίσκος

Ο πυρηνίσκος είναι ίσως από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα οργανίδια του πυρήνα. Πρόκειται για το χώρο μεταγραφής από RNA pol I και την παραγωγή των rRNA. Τα rRNA εκτός του ότι παράγονται, τροποποιούνται αλλά και σχηματίζουν σύμπλοκα με τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες στο χώρο του πυρηνίσκου. Τα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών έχουν 1-5 πυρηνίσκους, διαμέτρου 0.5-5 $\mu$ m. Ο σχηματισμός των πυρηνίσκων είναι λειτουργικό αποτέλεσμα της παρουσίας ενεργούς RNA pol I. Σε περίπτωση απενεργοποίησής της οι πυρηνίσκοι δε σχηματίζονται (Carmo-Fonseca et al 2000, Olson et al 2000).

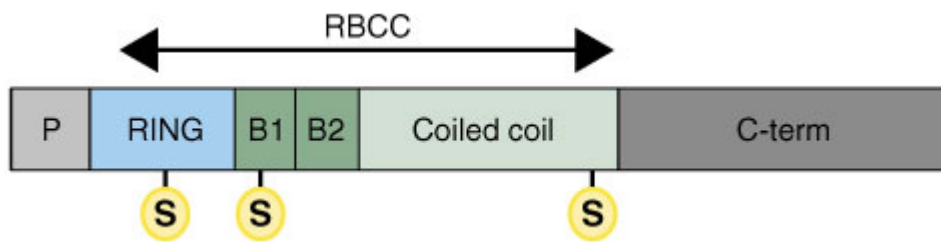
## Τα σωμάτια Cajal

Πρόκειται για σφαιρικά πυρηνικά σωμάτια που αρχικά χαρακτηρίστηκαν από την παρουσία των παραγόντων ιματισμού των pre-mRNA, των snRNPs (small nuclear RiboNucleoProteins). Θεωρούνται ως ο χώρος σχηματισμού, μεταβολισμού και μετά-μεταγραφικής τροποποίησης των snRNPs. Σε πολλές περιπτώσεις βρίσκονται σε γεινίαση ή συμπίπτουν με σωματίδια που περιλαμβάνουν παράγοντες επεξεργασίας και πολύ-αδενυλίωσης των pre-mRNA. Τα σωμάτια Cajal έχουν αναφερθεί να συνδέονται λειτουργικά με συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, όπως είναι τα γονίδια των ιστονών καθώς και τα γονίδια μεταγραφής των snRNA (small nuclear RNA) (Gall 2000).

## Τα σωμάτια PML

Η πρωτεΐνη PML (Promyelotic Leukemia gene product) εκφράζεται σε όλα τα φυσιολογικά κύτταρα θηλαστικών καθώς και σε όλες τις κυτταρικές σειρές που έχουν μελετηθεί. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον επτά ισομορφές, που όλες προκύπτουν από εναλλακτικές συρραφές στο 3' άκρο του μεταγράφου και οι εξειδικευμένες λειτουργίες τους παραμένουν άγνωστες (Jensen et al 2001). Η πρωτεΐνη PML έχει μοτίβα πρόσδεσης ψευδαργύρου, τα RING και B-boxes καθώς και μια έλικα λευκινών (leucine coil) και ο συνδυασμός τους είναι γνωστός ως περιοχή RBCC. Έχει επίσης ένα στοιχείο στόχευσης στον πυρήνα

(NLS) και μία περιοχή πλούσια σε σερίνες/ προλίνες (**Εικόνα 10**). Οι περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου ενδέχεται να εμπλέκονται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις καθώς και στον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης PML. Όλες οι ισομορφές, με εξαίρεση αυτή που έχει κυτταροπλασματικό εντοπισμό, συγκεντρώνονται σε χαρακτηριστικές υποπυρηνικές δομές, που ονομάζονται σωμάτια PML. Υπάρχει και ένα ποσοστό της πρωτεΐνης που είναι νουκλεοπλασματικό (Kastner et al 1992, Borden et al 1995, Bischof et al 2002).



**Εικόνα 10.** Οι δομικές περιοχές της πρωτεΐνης PML. Με κίτρινο S σημειώνονται οι θέσεις τροποποίησης με SUMO-1. (Zhong et al 2000).

Τα σωμάτια PML κυμαίνονται σε αριθμό από 5-30 σε κάθε πυρήνα, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 0.1μm-1μm. Είναι παρόντα σε ολόκληρο τον κυτταρικό κύκλο, εκτός από τη μίτωση που το PML σχηματίζει συσσωματώματα στην περιφέρεια του κυττάρου και ξανασχηματίζονται στη φάση G1 (Koken et al 1995). Είναι προσδεμένα με τον κυτταρικό σκελετό και η ακεραιότητά και η δομή τους δεν επηρεάζεται από την παρουσία DNάσης ή RNάσης. Δεν είναι δομές που περιέχουν DNA ή RNA και αυτό συμφωνεί και με την απουσία RNA πολυμεράσης II και TFIIH από αυτά. Αντίθετα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 50 πρωτεΐνες, ανάμεσα σε αυτές και πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες, που συνδέονται δομικά ή και λειτουργικά με τα σωμάτια PML. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι οι SP100, SUMO-1, Daxx, pRB, p53 που υποδηλώνουν ότι τα σωμάτια PML έχουν κάποιο ρόλο στην επιδιόρθωση και αντιγραφή του DNA, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση (LaMorte et al 1998, Alcaley et al 1998, Zhong et al 1999, Zhong et al 2000, Matera 1999).

Ο ρόλος των σωματίων PML στη μεταγραφή πρέπει να είναι έμμεσος. Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες συγκεντρώνονται εκεί, όπως το CBP, HDAC-1, Sp3, Jun, Fos καθώς και διάφοροι πυρηνικοί υποδοχείς (Hodges et al 1998, Boisvert et al 2000). Ωστόσο τα σωμάτια σχηματίζονται σε γεινίαση και όχι

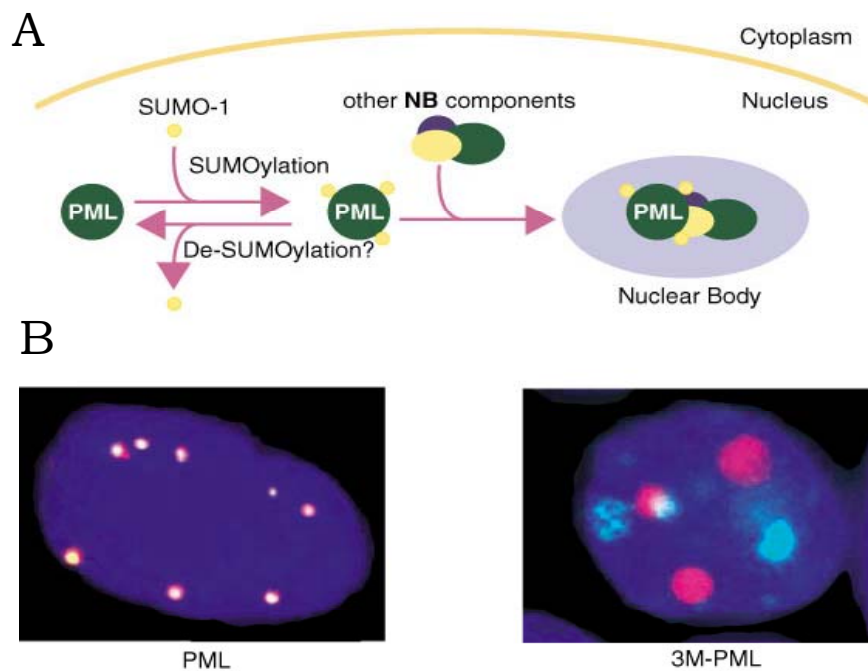
μέσα σε έντονα μεταγραφικά γενωμικές περιοχές και νεοσυντιθέμενο mRNA (Wang et al 2004). Δεν αποτελούν λοιπόν θέσεις μεταγραφικής ενεργότητας, ωστόσο υπάρχουν διάφορες υποθέσεις για το ρόλο τους στη μεταγραφή. Ενδεχομένως να ελέγχουν τη διαθεσιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων στις περιοχές μεταγραφής και να αποτελούν αποθηκευτικούς χώρους για αυτούς. Σύμφωνα με το μοντέλο όταν η συγκέντρωση τους στις θέσεις μεταγραφής ελαττωθεί και υπάρχει το κατάλληλο σήμα ενεργοποίησης, τότε οι μεταγραφικοί παράγοντες απελευθερώνονται από τα σωματίδια PML. Συμπληρωματικά ή ανεξάρτητα με την παραπάνω υπόθεση, τα σωματίδια PML μπορεί να αποτελούν χώρους τροποποιήσεων των μεταγραφικών παραγόντων, αφού πολλά ένζυμα εντοπίζονται σε αυτά. Επίσης μπορεί να αποτελούν χώρους σχηματισμού μεταγραφικών προσυμπλόκων αφού εκεί η τοπική συγκέντρωση πολλών παραγόντων είναι αυξημένη. Σύμφωνα με το υποθετικό μοντέλο δράσης τους, όταν το κατάλληλο σήμα δοθεί τότε τα σύμπλοκα ελευθερώνονται και διατίθενται στους παρακείμενους υποκινητές (Zhong et al 2000).

Η δομή των σωματίων PML εξαρτάται από την παρουσία της πρωτεΐνης PML αλλά και από τη δυνατότητά της να τροποποιηθεί με SUMO-1. Τα μόρια της πρωτεΐνης PML που συγκεντρώνονται στα σωματίδια είναι σουμοϋλιωμένα, ενώ σε συνθήκες απουσίας SUMO, δράσης των πρωτεασών SUMO ή μεταλλαγής των λυσινών του PML που σουμοϋλιώνονται, τα σωματίδια δεν σχηματίζονται (Muller et al 1998, Sternsdorf et al 1997). Στις παραπάνω συνθήκες η πρωτεΐνη PML σχηματίζει συσσωματώματα, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που συγκεντρώνονται φυσιολογικά στα σωματίδια γίνονται νουκλεοπλασματικές ή σχηματίζουν και αυτές άλλα συσσωματώματα (**Εικόνα 11**). Πολλοί από τους μεταγραφικούς παράγοντες που εντοπίζονται στα σωματίδια PML απαιτείται να είναι σουμοϋλιωμένοι ή να αλληλεπιδρούν με τις E3 λιγάσες του SUMO για να συγκρατούνται εκεί. Αυτό δείχνει ότι το μονοπάτι του SUMO σχετίζεται άμεσα με το ρόλο των σωματίων PML στη μεταγραφή.

Η έκφραση του γονιδίου PML δεν είναι ζωτικής σημασίας αφού ποντίκια PML<sup>-/-</sup> είναι βιώσιμα. Ωστόσο προσβάλλονται ευκολότερα από ιούς και σε περιπτώσεις έκθεσης σε καρκινικούς παράγοντες, όπως είναι η ακτινοβολία γ, δεν πεθαίνουν, αντίθετα σχηματίζουν όγκους. Κυτταρικές σειρές PML<sup>-/-</sup> έχουν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης. Από την άλλη μεριά, κυτταρικές σειρές που εκτίθενται σε ογκογόνους παράγοντες όπως είναι οι ιντερφερόνες ή η αντινοβολία γ, εκφράζουν πιο πολύ PML που συγκεντρώνεται σε μεγαλύτερα



και περισσότερα σωμάτια, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να οδηγούνται σε απόπτωση (Wang et al 1998).

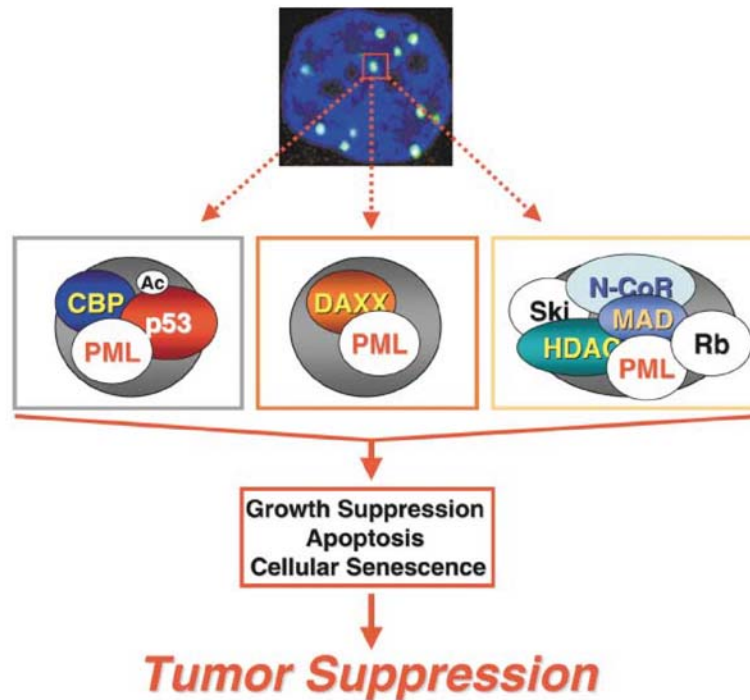


**Εικόνα 11.** (A) Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού σχηματισμού του σωματίου PML με τη στρατολόγηση των υπόλοιπων συστατικών του η οποία ακολουθεί την τροποποίηση της πρωτεΐνης PML με SUMO. (B) Κύτταρα MEFs που είναι PML<sup>-/-</sup> διαμολύνονται παροδικά με WT PML (αριστερά) ή PML με μεταλλαγμένες τις λυσίνες που τροποποιούνται με SUMO (δεξιά). Αριστερά τα σωμάτια PML σχηματίζονται φυσιολογικά (κόκκινη χρώση) και στρατολογούν και την πρωτεΐνη SP100 (πράσινη χρώση) ενώ δεξιά τα σωμάτια PML δεν σχηματίζονται και δεν συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη SP100. (Zhong et al 2000)

Αυτά τα στοιχεία συνηγορούν σε ένα προαποπτωτικό ρόλο των σωματίων PML (**Εικόνα 12**). Η προαποπτωτική τους δράση ίσως να επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του p53. Ενδεχομένως τα σωμάτια να ρυθμίζουν θετικά την ακετυλίωση του p53 από το CBP ή τη φωσφορυλίωσή του από την κινάση HIPK2, αφού και τα δύο ένζυμα εντοπίζονται στα σωμάτια PML, και κατά συνέπεια να επιτρέπεται η πρόσβασή του σε γονίδια-στόχους. Η παρουσία των σωματίων PML είναι επίσης απαραίτητη για την προαποπτωτική δράση του συγκαταστολέα Daxx, που αρχικά ταυτοποιήθηκε ως ενδιάμεσος μεταβιβαστής του αποπτωτικού σήματος από Fas και TNFα. Επιπλέον το PML αλληλεπιδρά με τον ογκοκαταστολέα pRB στα σωμάτια PML και ίσως να προάγει την κατασταλτική δράση του. Στα σωμάτια PML συγκεντρώνονται πολλοί από τους



γνωστούς συγκαταστολείς, όπως N-CoR/SMRT, mSin3 και HDAC-1 και έτσι μπορεί να συμβάλουν στο σχηματισμό ενός κατασταλτικού συμπλόκου για κάποια ογκογονίδια (Salomoni and Pandolfi 2002).

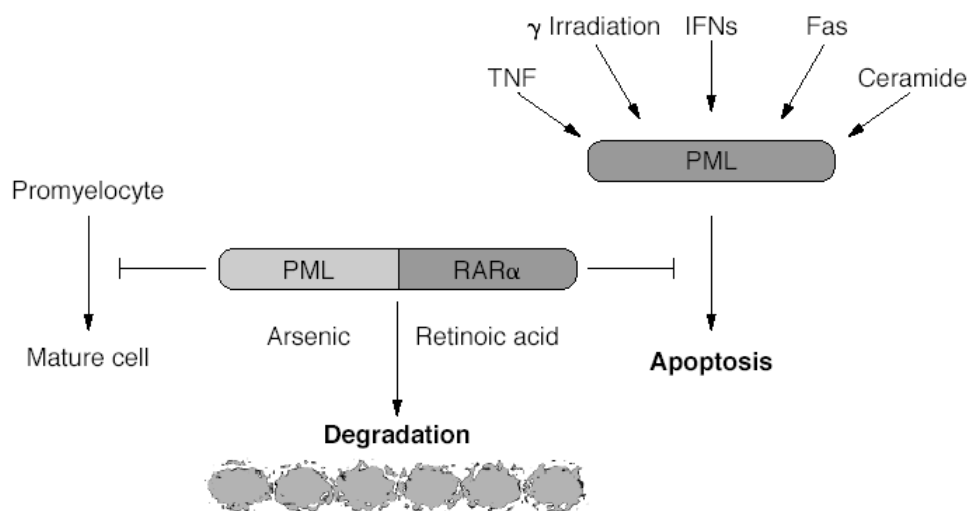


**Εικόνα 12.** Μοντέλα σύμφωνα με τα οποία τα σωματίδια PML ρυθμίζουν τη λειτουργία και τη συγκρότηση μεταγραφικών συμπλόκων που έχουν προαποπτωτικό ρόλο. (Salomoni and Pandolfi)

Το γεγονός ότι η δράση των ιντερφερονών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερης πρωτεΐνης PML και το σχηματισμό μεγαλύτερων σωματίων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα σωματίδια έχουν σημαντικό ρόλο στον αμυντικό μηχανισμό κατά των ιών. Μάλιστα υπάρχουν ιοί που έχουν ως στόχο την καταστροφή των σωματίων, είτε προκαλώντας τη μετατόπιση της πρωτεΐνης PML στο κυτταρόπλασμα, είτε στοχεύοντας τις πρωτεΐνες PML και SP100 για πρωτεόλυση ή αποσυσμύλιωση. Η προσβολή από τέτοιους ιούς (hCMV, HSV-1, Epstein-Barr) μπορεί να οδηγήσει σε ένα καταρράκτη μοριακών γεγονότων με τελικό αποτέλεσμα την ογκογένεση (Lanau et al 1995).

Το γονίδιο PML ταυτοποιήθηκε αρχικά ως σύντηξη με το γονίδιο RARα (Retinoic Acid Receptor α) στους ασθενείς με λευχαιμία τύπου APL (Acute Promyelotic Leukaemia). Η λευχαιμία APL χαρακτηρίζεται από το σταμάτημα

της ανάπτυξης των μυελοκυττάρων στο προμυελοτικό στάδιο. Η σύντηξη είναι αποτέλεσμα της χρωμοσωμικής μετατόπισης t(15;17) από την οποία προκύπτουν δύο υβρίδια γονίδια, τα PML-RAR $\alpha$  και RAR $\alpha$ -PML που εκφράζονται στα λευχαιμικά κύτταρα. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο μεταγραφικός παράγοντας RAR $\alpha$ , που ανήκει στην οικογένεια των ορμονικών υποδοχέων, προσδένει RA (retinoic acid), ετεροδιμερίζεται με τον ορμονικό υποδοχέα RXR $\alpha$  και ενεργοποιεί γονίδια σημαντικά για τη διαφοροποίηση των προμυελοκυττάρων σε μυελοκύτταρα. Η πρωτεΐνη PML-RAR $\alpha$  που δημιουργείται μετά τη χρωμοσωμική μετατόπιση, διατηρεί όλα τα σημαντικά στοιχεία του RAR $\alpha$ , όπως είναι η ικανότητα αλληλεπίδρασης με το RA και η πρόσδεση στο DNA καθώς και την περιοχή RBCC του PML (**Εικόνα 13**).



**Εικόνα 13.** Κυτταρικά αποπτωτικά σήματα (TNF, ακτινοβολία  $\gamma$ , ιντερφερόνες) αυξάνουν τη δράση και τα επίπεδα της πρωτεΐνης PML και οδηγούν στην απόπτωση. Η υβριδική πρωτεΐνη PML-RAR $\alpha$  καταστέλλει την προαποπτωτική δράση της PML καθώς και τη διαφοροποίηση των προμυελοκυττάρων. Επίδραση με αρσενικό ή ρετινοϊκό οξύ οδηγεί στην καταστροφή της υβριδικής πρωτεΐνης. (Matera 1999)

Το μοριακό πρόβλημα στο οποίο πιθανότατα οφείλεται η λευχαιμία APL είναι η καταστροφή των φυσιολογικών σωματίων PML. Η υβριδική πρωτεΐνη PML-RAR $\alpha$  παρότι έχει τις θέσεις σουμοϋλίωσης, δεν σουμοϋλιώνεται *in vivo*, δεν εντοπίζεται στα σωματίδια PML αλλά αντίθετα τα οδηγεί σε εξαφάνιση. Αυτό παρατηρείται ακόμη και όταν υπάρχει ένα ποσοστό φυσιολογικής πρωτεΐνης PML και άρα το υβρίδιο PML-RAR $\alpha$  έχει επικρατούσα αρνητική δράση. Τα

σωμάτια που σχηματίζονται σε αυτή την περίπτωση είναι πολλά και μικρά και δε μπορούν να έχουν τον σημαντικό προαποπτωτικό ρόλο των φυσιολογικών σωματίων PML. Έτσι τα λευχαιμικά κύτταρα APL παρουσιάζουν πλεονέκτημα επιβίωσης και προκαλούν καρκίνο (Melnick and Licht 1999). Η επίδραση με RA ή  $As_2O_3$  στα κύτταρα APL οδηγεί στον σχηματισμό των φυσιολογικών σωματίων PML. Η δράση των δύο χημικών παραγόντων είναι διαφορετική πάνω στην υβριδική πρωτεΐνη, το RA προσδένεται στο RAR $\alpha$  ενώ το  $As_2O_3$  ενεργοποιεί τη σουμοϋλίωση του PML. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις αλλάζει η διαμόρφωσή της υβριδικής πρωτεΐνης γεγονός που μάλλον είναι απαραίτητο για να αναγνωρισθεί από το μηχανισμό πρωτεόλυσης και να αποικοδομηθεί (Duprez et al 1999, Muller et al 1998). Οι φυσιολογικές πρωτεΐνες PML και RAR $\alpha$  που εκφράζονται στα κύτταρα δεν σχηματίζουν ετεροδιμερή με το μη φυσιολογικό υβρίδιο, οπότε δεν αποικοδομούνται αλλά είναι ελεύθερες να δράσουν. Το RAR $\alpha$  ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους και το PML σχηματίζει τα απαραίτητα σωμάτια. Ο προαποπτωτικός ρόλος των σωματίων PML αποκαθίσταται, και έτσι το αποπτωτικό μονοπάτι μπαίνει σε λειτουργία όταν το απαιτούν οι συνθήκες (π.χ. ακτινοβολία  $\gamma$ ).

Η πλειοψηφία των σωματίων PML στον πυρήνα είναι συνδεδεμένα με τον πυρηνικό σκελετό και αυτό τα κάνει να είναι ακίνητα ή σχετικά ακίνητα. Μια ενδιαφέρουσα εργασία έδειξε ότι στα κύτταρα BHK (baby hamster kidney cells) υπάρχουν τρεις πληθυσμοί σωματίων PML. Αυτά που είναι τελείως ακίνητα (~25%), αυτά που κάνουν μικρές και εντοπισμένες κινήσεις (~63%) και αυτά που μετακινούνται πολύ γρήγορα μέσα στον πυρήνα (~12%) και είναι μικρά σε μέγεθος. Ο πληθυσμός των ταχύτατα κινουμένων σωματίων PML εξαρτάται από την διαθεσιμότητα του ATP, που σημαίνει ότι η μετακίνησή τους απαιτεί κάποιο άγνωστο μηχανισμό ενεργητικής μεταφοράς. Τα γρήγορα μετακινούμενα σωμάτια PML εντοπίστηκαν μόνο στα κύτταρα BHK και MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) και όχι στα HeLa, γεγονός που υποδεικνύει ότι απαιτούνται, εκτός από ATP, και ορισμένοι εξειδικευμένοι παράγοντες κάποιων κυτταρικών τύπων (Muratani et al 2002).

Η πρωτεΐνη και τα σωμάτια PML δεν είναι εξελικτικά συντηρημένα και απαντώνται μόνο στα ανώτερα θηλαστικά. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι ποντίκια που δεν φέρουν το γονίδιο PML είναι βιώσιμα και αναπτύσσονται κανονικά. Ωστόσο η πρωτεΐνη PML ανήκει στην οικογένεια RBCC που απαριθμεί ~120 μέλη στους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες σχηματίζουν κυτταροπλασματικές ή πυρηνικές

δομές παρόμοιες με αυτές των σωματίων PML. Ενδεχομένως λοιπόν να υπάρχουν λειτουργικά ομόλογες πρωτεΐνες σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ποιες πρωτεΐνες μπορεί να έχουν αυτό το ρόλο δεν είναι ξεκάθαρο και προηγουμένως απαιτείται να διευκρινιστεί ο λειτουργικός και βιοχημικός ρόλος των σωματίων PML. Μελέτες κλασματοποίησης έχουν δείξει ότι το PML αλληλεπιδρά με τον παράγοντα της μετάφρασης eIF4E, τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Επιπλέον ένα μεγάλο ποσοστό των PML σωματίων απαιτούν για την οργάνωσή τους τον παράγοντα eIF4E. Τα σωματία αυτού του παράγοντα της μετάφρασης μπορεί να αποτελούν αρχαιότερα οργανίδια, που είναι παρόντα στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και ενδεχομένως να έχουν κάποιες από τις λειτουργικές ιδιότητες του σωματίου PML (Cohen et al 2001).

## Οι πυρηνικοί υποδοχείς

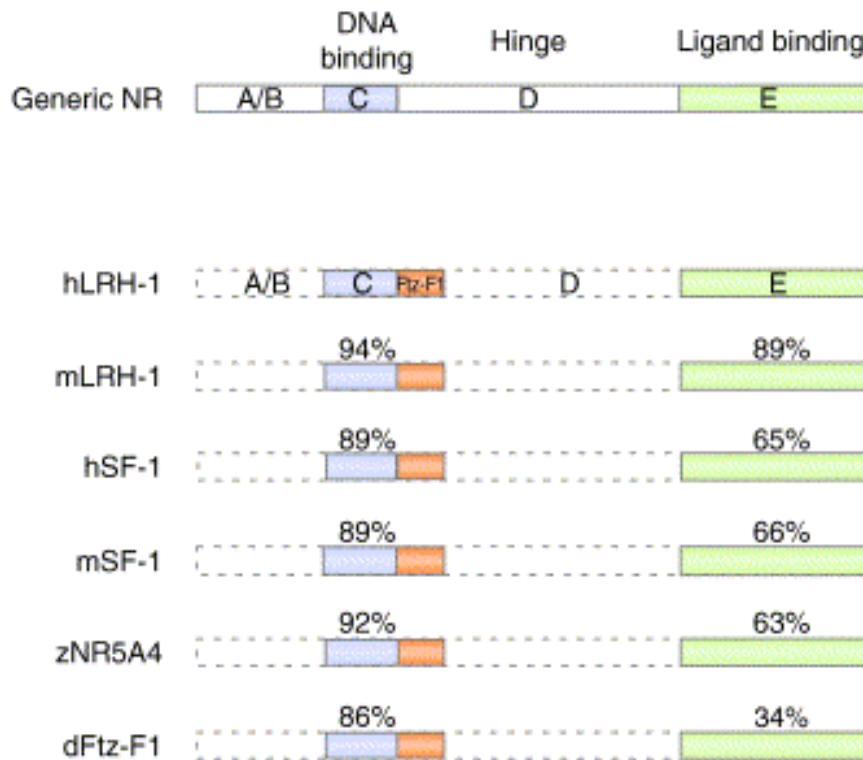
Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων αφού έχουν ταυτοποιηθεί 48 μέλη που εκφράζονται από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων χωρίζεται σε 7 οικογένειες (NR0-NR6) με όλα τα μέλη να έχουν συντηρημένα τα δομικά τους στοιχεία. Διαθέτουν μια περιοχή A/B, με περιορισμένη δυνατότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής που είναι ανεξάρτητη από την πρόσδεση συνδέτη και ονομάζεται AF-1 (Activation Function -1). Έχουν μια πολύ συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD ή C domain) που αποτελείται από δύο δάκτυλους ψευδαργύρου. Επιπλέον διαθέτουν μια περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (LBD ή E domain) καθώς και μία συντηρημένη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές παρουσία συνδέτη και ονομάζεται AF-2 (Activation Function -2). Η περιοχή που συνδέει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA με αυτήν πρόσδεσης του συνδέτη είναι αρκετά ευέλικτη και ονομάζεται περιοχή D (Hinge ή D domain).

Η ενεργότητα πολλών πυρηνικών υποδοχέων εξαρτάται από την πρόσδεση διαφόρων μικρών λιπόφιλων μορίων, όπως είναι οι ορμόνες, τα διάφορα μεταβολικά προϊόντα και οι συνθετικοί συνδέτες. Η πρόσδεση του συνδέτη στον πυρηνικό υποδοχέα επιφέρει μια αλλαγή στη διαμόρφωση της περιοχής AF-2 ώστε αυτή χάνει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο

των συγκαταστολέων (NcoR, SMRT) αλλά είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με τους συνενεργοποιητές της οικογένειας p160 (Src1, TIF-2). Οι συνενεργοποιητές επιτρέπουν την πρόσβαση της βασικής μεταγραφικής μηχανής στο DNA και την έναρξη της μεταγραφής. Συνήθως οι πυρηνικοί υποδοχείς προσδένονται στο DNA ως ομοδιμερή (π.χ. ER) ή ετεροδιμερή με τον πυρηνικό υποδοχέα RXR. Οι πυρηνικοί υποδοχείς για τους οποίους ακόμη δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιος συνδέτης ονομάζονται ορφανοί. Παρόλο που οι πυρηνικοί υποδοχείς παρουσιάζουν μεγάλη συντήρηση στις διάφορες περιοχές τους, έχουν μεγάλη εξειδίκευση όσον αφορά τα γονίδια στόχους και τις διάφορες λειτουργίες τους. (Fayard et al 2004)

### Ο πυρηνικός υποδοχέας LRH-1 (Liver Receptor Homolog -1)

Το LRH-1 (liver receptor homolog -1) ανήκει στην οικογένεια NR5A που έχει 4 χαρακτηρισμένα μέλη. Το LRH-1 ταυτοποιήθηκε ως ομόλογο του δροσοφιλικού Ftz-F1 (*Fushi tarazu factor 1*) και στη συνέχεια βρέθηκαν ομόλογα σε όλα τα σπονδυλωτά (**Εικόνα 14**). Στη βιβλιογραφία βρίσκεται επίσης με τα ονόματα FTF ( $\alpha$ -fetoprotein transcription factor) και CPF (CYP7A1 promoter binding factor) που του αποδόθηκαν με βάση το ρόλο του. Το mRNA που προκύπτει από το ανθρώπινο γονίδιο LRH-1 απαντάται σε δύο ισομορφές, 3.8Kb και 5.2Kb που προκύπτουν από δύο διαφορετικά σήματα πολυαδενυλίωσης. Το μεγαλύτερο υπάρχει στο ενήλικο ήπαρ, ενώ στην ηπατική κυτταρική σειρά HepG2 εντοπίζονται και οι δύο ισομορφές. Τουλάχιστον τρεις διαφορετικές ισομορφές προκύπτουν από εναλλακτική συρραφή, ωστόσο η περισσότερη άφθονη πρωτεΐνη είναι η μεγαλύτερη σε μήκος (541 α.α.). Η έκφρασή του εντοπίζεται σε ιστούς ενδοδερμικής προέλευσης και ελέγχεται άμεσα από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως είναι το GATA, το HNF4, το FXR και το LRH-1, καθώς και έμμεσα από το διαβιβαστή σήματος TNF $\alpha$ . (Nitta et al 1999, Galarneau et al 1996, Li et al 1998)



**Εικόνα 14.** Γενική δομική οργάνωση των πρωτεϊνών της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων καθώς και του LRH-1 και των υπόλοιπων μελών της υποικογένειας NR5A. (Fayard et al 2004)

Τα μέλη της οικογένειας NR5A προσδένονται στο DNA ως μονομερή και έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τους συνενεργοποιητές χωρίς να είναι αναγκαία η πρόσδεση συνδέτη. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η περιοχή LBD αυτής της ομάδας των πυρηνικών υποδοχέων διατηρεί συνεχώς την ενεργοποιητική διαμόρφωση ανεξάρτητα από την παρουσία συνδέτη. Βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση της μεταγραφής από το LRH-1 είναι εφικτή ακόμη και όταν το σχήμα και η διαμόρφωση της κοιλότητας πρόσδεσης συνδέτη καταστραφεί με την αντικατάσταση των αμινοξέων με άλλα που έχουν ογκώδεις πλάγιες αλυσίδες (Sablin et al 2003). Αυτό δε σημαίνει ότι το LRH-1 και οι άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας δε προσδέουν κάποιο συνδέτη, αλλά ότι η πρόσδεση δεν είναι απαραίτητη για τη βασική ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα. Το LRH-1 προσδένει, μέσω της έλικας H12 της περιοχής AF-2, συνενεργοποιητές της οικογένειας p160 (SRC-1 και SRC-3). Η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται μέσω των συντηρημένων μοτίβων LXXLL των συνενεργοποιητών. Η μεταγραφική ενεργότητα του LRH-1 υπόκειται σε έλεγχο με την πρόσδεση συγκαταστολέων, όπως είναι το SMRT (silencing mediator for retinoid and

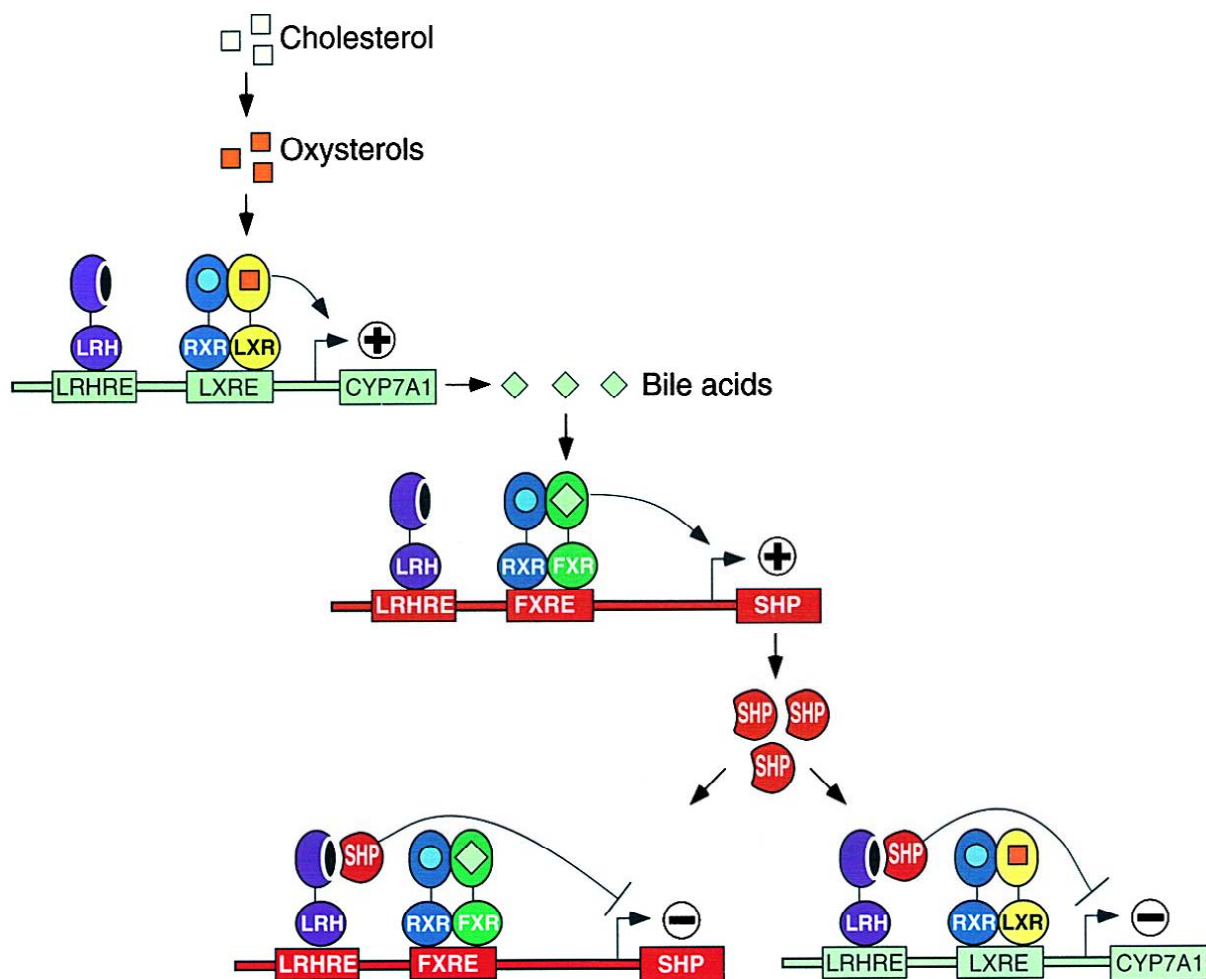
thyroid repressors) και οι απακετυλάσες HDAC2 ή HDAC4 (Perissi et al 2004). Επιπρόσθετα έχει δειχθεί ότι ο πυρηνικός υποδοχέας SHP (small heterodimer partner) που έχει δράση μεταγραφικού συγκαταστολέα, αλληλεπιδρά με την περιοχή AF-2 του LRH-1 και ανταγωνίζεται την πρόσδεση των συνενεργοποιητών (Johansson et al 2000, Lee and Moore 2002, Li et al 2005).

Το γονίδιο LRH-1 εκφράζεται στο ποντίκι από τα πρώτα εμβρυϊκά στάδια και σε όλα τα κύτταρα της βλαστοκύστης και της μορούλας. Στη συνέχεια εντοπίζεται στο κοιλιακό ενδόδερμα κατά τις εμβρυϊκές μέρες E7.5 και E8.5. Από την E9.5 εκφράζεται στα αναπτυσσόμενα ήπαρ και πάγκρεας και λίγο αργότερα στο έντερο. Μόνο μετά την E17.5 το πρότυπο έκφρασης συμπίπτει με αυτό του ενήλικα που είναι το ήπαρ, το εξωκρινές πάγκρεας, οι κρύπτες Lieberkuhn του εντέρου και το επιθήλιο του στομάχου. Η σημαντικότητα του LRH-1 στην ανάπτυξη του εμβρύου φαίνεται από το γεγονός ότι τα ποντίκια LRH-1<sup>-/-</sup> πεθαίνουν κατά την εμβρυϊκή μέρα E6.5 –E7.5 (Rausa et al 1999, Annicotte et al 2003).

Το LRH-1 φαίνεται να ελέγχει την έκφραση της πρωτεΐνης AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) κατά την ανάπτυξη του εμβρύου. Η AFP είναι δείκτης του κοιλιακού ενδοδέρματος και του εμβρυϊκού ήπατος, αφού εκφράζεται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Άλλα γονίδια σημαντικά για την ανάπτυξη του ήπατος, όπως είναι τα HNF1 $\alpha$ , HNF3 $\beta$  και HNF4 $\alpha$  έχουν περιοχές πρόσδεσης του LRH-1 στους υποκινητές τους. Από την άλλη μεριά η έκφραση του LRH-1 ελέγχεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA, που είναι πρώιμοι παράγοντες και σημαντικοί στην οργανογένεση ενδοδερμικής προέλευσης. Το HNF4 $\alpha$  ελέγχει επίσης την έκφραση του LRH-1 σχηματίζοντας έτσι μια λίγο μεταγενέστερη θηλιά ενίσχυσης της έκφρασης του (Pare et al 2001). Το PDX-1, που είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη του παγκρέατος, ενεργοποιεί την έκφραση του LRH-1 κατά τις πρώιμες ημέρες ανάπτυξης του οργάνου, που η έκφρασή τους συμπίπτει. Στη συνέχεια το LRH-1 εκφράζεται στο εξωκρινές πάγκρεας ενώ το PDX-1 περιορίζεται στο ενδοκρινές. Το LRH-1 εκφράζεται και στον αδιαφοροποίητο λιπώδη ιστό χωρίς να είναι διασαφηνισμένος ο ρόλος του.

Στο ενήλικο ποντίκι, το LRH-1 έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση σημαντικών μεταβολικών μονοπατιών. Διάφορα γονίδια-στόχοι του είναι σημαντικά για την ομοιόσταση της χοληστερόλης και των τελικών προϊόντων του καταβολισμού της που είναι τα χολικά οξέα BA (bile acids). Η χοληστερόλη είναι σημαντική για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η βιογένεση των

μεμβρανών, ωστόσο το πλεόνασμα χοληστερόλης προκαλεί προβλήματα στον οργανισμό. Η σύνθεση των χολικών οξέων αποτελεί το βασικό μονοπάτι απομάκρυνσης της χοληστερόλης από τον οργανισμό. Ο καταβολισμός της χοληστερόλης σε χολικά οξέα μπορεί να γίνει μέσω δύο μονοπατιών. Τα ένζυμα CYP7A1 και CYP8B1 είναι σημαντικά για το κλασικό ή ουδέτερο μονοπάτι, ενώ το CYP27A1 είναι το πρώτο ένζυμο στο εναλλακτικό ή όξινο μονοπάτι. Όταν η ποσότητα της χοληστερόλης στα ηπατικά κύτταρα αυξηθεί πάνω από κάποια επίπεδα, τότε ενεργοποιείται το μονοπάτι καταβολισμού της σε χολικά οξέα.



**Εικόνα 15.** Ο μηχανισμός της ενεργοποίησης των γονιδίων των ενζύμων CYP7A1 και CYP8B1 που είναι σημαντικά για τον καταβολισμό της χοληστερόλης σε χολικά οξέα (BA). Όταν η συγκέντρωση των χολικών οξέων αυξηθεί τότε η δράση του LRH-1 καταστέλλεται λόγω της αύξησης των επιπέδων του καταστολέα SHP με σκοπό την αποκατάσταση της ισορροπίας. (Lu et al 2000)



Ένα ενδιαμέσο προϊόν του μονοπατιού είναι οι οξυστερόλες που προσδένονται στον πυρηνικό υποδοχέα LXRα, ο οποίος ετεροδιμερίζεται με το RXRα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του, ένα από τα οποία είναι το CYP7A1. Το LRH-1 σε αυτή την περίπτωση βρίσκεται σε ενεργοποιητικό μεταγραφικό σύμπλοκο και συμβάλει στην ενεργοποίηση των γονιδίων CYP7A1 και CYP8B1. Το αποτέλεσμα είναι να καταβολιστεί η περίσσεια της χοληστερόλης σε χολικά οξέα (**Εικόνα 15**). Από την άλλη μεριά όταν η συγκέντρωση των χολικών οξέων στα ηπατοκύτταρα αυξηθεί, αυτά προσδένονται ως συνδέτες στον πυρηνικό υποδοχέα FXR, ο οποίος ετεροδιμερίζεται με τον RXRα και ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους του, ανάμεσα στα οποία είναι και το SHP. Το LRH-1 επίσης προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου SHP και συμμετέχει στην ενεργοποίησή του. Το SHP είναι ένας συγκαταστολέας, που ανήκει στην οικογένεια των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων που δεν έχουν ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Το SHP ετεροδιμερίζεται με το LRH-1 και μέσω αυτού του μηχανισμού επιτυγχάνεται η καταστολή των γονιδίων CYP7A1 και CYP8B1 καθώς και του ίδιου του SHP (**Εικόνα 15**). Με αυτό τον μηχανισμό τα χολικά οξέα ρυθμίζουν αρνητικά τη σύνθεσή τους. Αυτό το καλά ρυθμιζόμενο μεταβολικό μονοπάτι στηρίζεται στο διπλό ρόλο του LRH-1, από τη μία να ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους απουσία του καταστολέα SHP και από την άλλη να τα καταστέλλει όταν τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού της χοληστερόλης οδηγήσουν σε αυξημένα επίπεδα του καταστολέα SHP (del Castillo-Olivares et al 2004, Goodwin et al 2000, Lu et al 2000, Pare et al 2004).

## Στόχος

Το LRH-1 είναι ένας ορφανός πυρηνικός υποδοχέας που έχει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες. Από τη μελέτη της αμινοξικής του αλληλουχίας βρέθηκε ότι διαθέτει αλληλουχίες που ανήκουν στο συντηρημένο μοτίβο τροποποίησης με SUMO. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να ελεγχθεί αν το LRH-1 αποτελεί στόχο του μονοπατιού προσθήκης SUMO και πώς αυτή η μεταμεταφραστική τροποποίηση επηρεάζει τη μεταγραφική του λειτουργία.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας αντικείμενο μελέτης ήταν ο μηχανισμός μεταγραφικής ενεργοποίησης του HNF1β. Εξετάστηκαν οι αλληλεπιδράσεις του με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς και πώς αυτές επηρεάζουν τη μεταγραφική του ενεργότητα.

# **Κεφάλαιο Α**

**“Ρύθμιση της πρόσβασης  
του LRH-1 στη χρωματίνη  
από την τροποποίησή του  
με SUMO”**

## Αποτελέσματα

### Πρόλογος

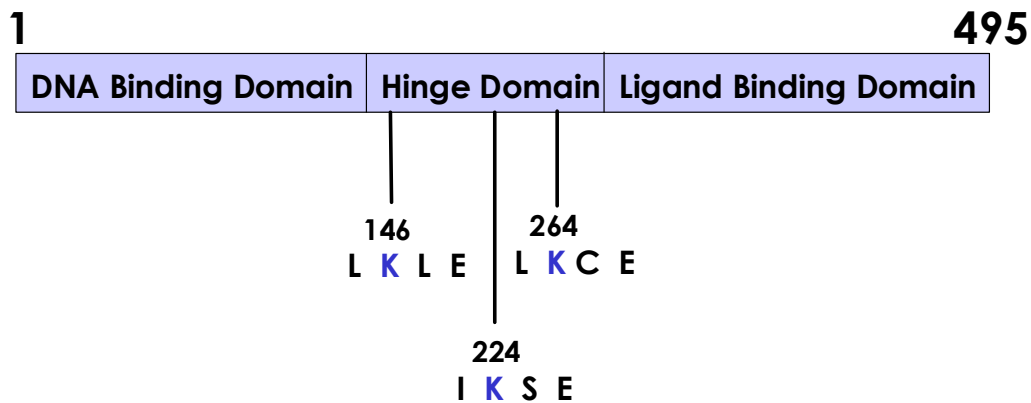
Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των μεταγραφικών παραγόντων έχει δειχθεί ότι αποτελούν ένα γρήγορο και συνήθως αναστρέψιμο τρόπο ρύθμισης της λειτουργίας τους. Η τροποποίηση με SUMO, ένα σφαιρικό πολυπεπτίδιο, φαίνεται ότι συμβαίνει σε ολοένα και αυξανόμενο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων. Το αποτέλεσμα αυτής της προσθήκης συνήθως έχει αρνητική επίδραση στην ενεργότητά τους και σε πολλές περιπτώσεις συνοδεύεται με τη μετατόπισή τους στα σωμάτια PML. Τα σωμάτια PML είναι πυρηνικοί σχηματισμοί που συγκεντρώνουν πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες και ενδεχομένως να έχουν κάποιο ρόλο στη λειτουργία της μεταγραφής. Ωστόσο ο ρόλος της τροποποίησης με SUMO στη στόχευση των μεταγραφικών παραγόντων στα σωμάτια PML και πώς αυτή η μετατόπιση σχετίζεται με τη ρύθμιση της μεταγραφής δεν έχει διευκρινιστεί (Gill 2004, Seeler and Dejean 2003).

Προκειμένου να διευκρινιστεί η σχέση αυτής της τροποποίησης με το ρόλο των σωματίων PML στη μεταγραφή μελετήθηκε ο ρόλος της σουμοϋλίωσης του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα LRH-1. Το LRH-1 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της ανάπτυξης πολλών ιστών και οργάνων ενδοδερμικής προέλευσης. Στον ενήλικα έχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολικό δίκτυο διατήρησης της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Καθώς το LRH-1 διαθέτει πιθανές θέσεις πρόσδεσης του SUMO αποτέλεσε έναν ιδανικό μεταγραφικό παράγοντα ώστε να μελετηθεί ταυτόχρονα ένα νέο επίπεδο ρύθμισης του συγκεκριμένου παράγοντα αλλά και γενικότερα ο ρόλος της σουμοϋλίωσης και των σωματίων PML στη ρύθμιση της μεταγραφής (Fayard et al 2004).

### **Το LRH-1 τροποποιείται *in vivo* και *in vitro* με SUMO**

Ελέγχοντας κανείς την αμινοξική αλληλουχία του LRH-1 διαπιστώνει ότι υπάρχουν τρεις αλληλουχίες που εμπίπτουν στο μοτίβο πρόσδεσης SUMO (ΨΚΧΕ). Οι λυσίνες που εντοπίζονται σε αυτό το τετραπεπτίδιο είναι στις θέσεις 146, 224 και 264 και βρίσκονται όλες στην περιοχή (Hinge) που συνδέει την

περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) και την περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (LBD) (**Εικόνα 16**). Τα τετραπεππίδια αυτά είναι συντηρημένα σε όλες τις ομόλογες πρωτεΐνες και αυτό είναι μια ένδειξη ότι πρόκειται για σημαντικές περιοχές για τη λειτουργία της πρωτεΐνης που πιθανότατα να τροποποιούνται με SUMO.

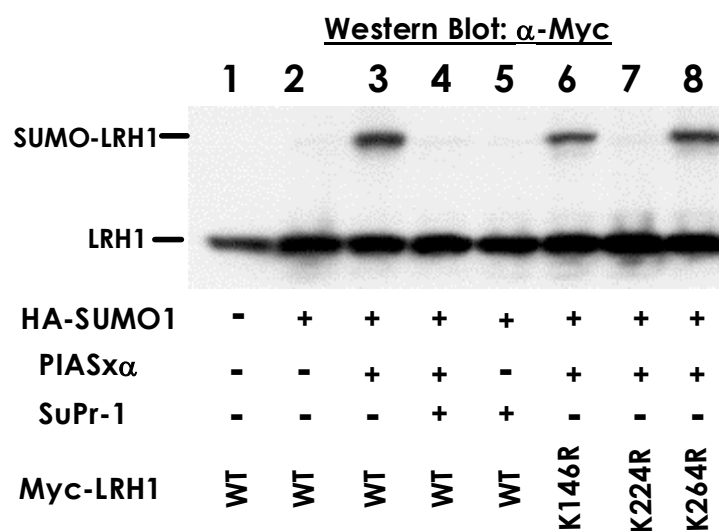


**Εικόνα 16.** Οι δομικές περιοχές του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα LRH-1 και οι θέσεις των 3 λυσινών που εντοπίζονται στο μοτίβο προσθήκης SUMO (ΨKXE).

Προκειμένου να εξετάσουμε αν το LRH-1 τροποποιείται με SUMO *in vivo* χρησιμοποιήσαμε την ετερόλογη κυτταρική σειρά HeLa. Στα κύτταρα αυτά εκφράστηκαν με παροδική διαμόλυνση το myc-LRH-1, το HA-SUMO-1 και η E3 λιγάση PIASα σε όλους τους συνδυασμούς (**Εικόνα 17**). Μόνο στην περίπτωση έκφρασης και των τριών πρωτεϊνών παρατηρείται μια επιπλέον ζώνη myc-LRH-1 μεγαλύτερου μοριακού βάρους (~90kD) με western blot σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (το μη τροποποιημένο LRH-1 είναι ~55kD). Το γεγονός ότι αυτή η ζώνη αποτελεί σουμοϋλιωμένη μορφή του LRH-1 ενισχύεται από το ότι η παρουσία της εξαρτάται από την έκφραση τόσο του SUMO όσο και του PIASα, ενώ εξαφανίζεται όταν ταυτόχρονα με αυτά εκφράζεται η πρωτεάση που απομακρύνει το SUMO, SuPr-1 (**Εικόνα 17**).

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε το συμπέρασμα ότι το LRH-1 τροποποιείται με SUMO έγινε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα myc, που αναγνωρίζει το myc-LRH-1, από εκχυλίσματα κυττάρων που συνεκφράζουν SUMO και PIASα. Μία ζώνη ίδιου μοριακού βάρους (~90kD) προκύπτει σε western blot με αντίσωμα HA που αναγνωρίζει το HA-SUMO-1, μόνο στην περίπτωση που συνεκφράζεται το PIASα. Η ίδια ζώνη παρατηρείται και στο αντίστροφο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα HA και western blot

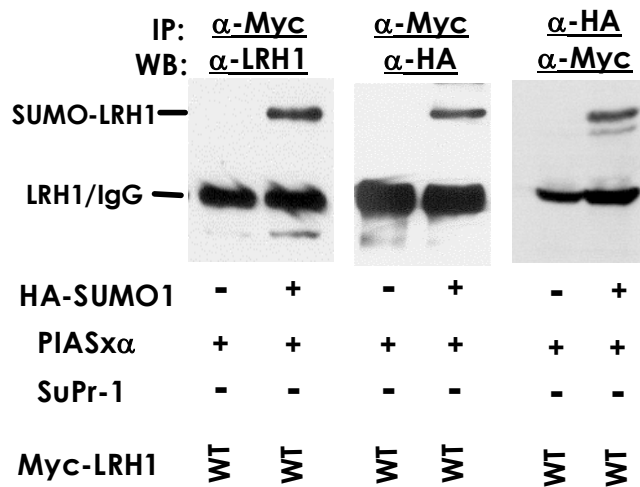
με αντίσωμα myc (**Εικόνα 18**). Προκειμένου να καθοριστεί η λυσίνη ή οι λυσίνες που τροποποιούνται με SUMO εκφράστηκαν στα κύτταρα HeLa πρωτεΐνες LRH-1 που φέρουν σημειακές μεταλλαγές των λυσινών εκείνων που εντοπίζονται στην αλληλουχία προσθήκης SUMO και πιθανά να σουμοϋλιώνονται. Παρουσία SUMO και PIASα εμφανίζεται η ίδια ζώνη μεγαλύτερου μοριακού βάρους στις περιπτώσεις μεταλλαγής των λυσινών 146 και 264 αλλά όχι στην περίπτωση μεταλλαγής της λυσίνης 224 (**Εικόνα 17**). Αυτό σημαίνει ότι η λυσίνη 224 αποτελεί το κύριο κατάλοιπο τροποποίησης με SUMO *in vivo*, στο ετερόλογο σύστημα υπερέκφρασης HeLa.



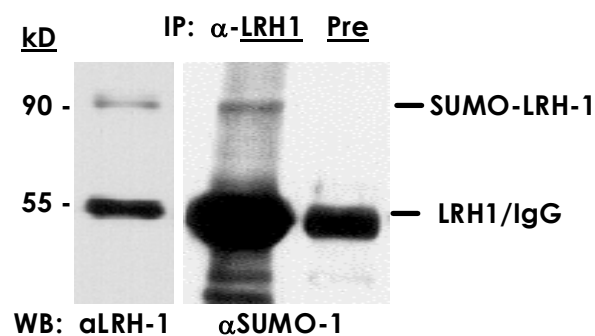
**Εικόνα 17.** Εκχυλίσματα κυττάρων HEK 293 που διαμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς που σημειώνονται, αναλύθηκαν σε western blot με αντίσωμα α-myc ώστε να ανιχνευθεί το τροποποιημένο και μη LRH-1.

Στη συνέχεια και προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η τροποποίηση του LRH-1 από SUMO συμβαίνει και στην ενδογενή πρωτεΐνη χρησιμοποιήσαμε την ηπατική καρκινική κυτταρική σειρά C3A-HepG2 που εκφράζει το LRH-1. Πράγματι, με western blot με ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει το LRH-1 σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα HepG2 ανιχνεύονται δύο ζώνες, μία κύρια ~55kD που αντιστοιχεί στην μη τροποποιημένη μορφή, και μία μεγαλύτερου μοριακού βάρους ~90kD (**Εικόνα 19**). Η ταυτότητα της ζώνης των 90kD, ως τροποποιημένο LRH-1 με SUMO, εξακριβώθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους. Σε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης του LRH-1 από εκχυλίσματα HepG2 που ακολουθείται από western blot με αντίσωμα για SUMO ανιχνεύεται η ζώνη των 90kD (**Εικόνα 19**). Από το πείραμα αυτό συμπεραίνεται ότι η ζώνη αυτή

αποτελεί την τροποποιημένη μορφή του LRH-1 ενώ ταυτόχρονα αποκλείεται η πιθανότητα να είναι κάποια άλλη σουμοϋλιωμένη πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το LRH-1. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η εκχύλιση των πρωτεϊνών πριν την ανοσοκατακρήμνιση γίνεται σε ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες. Επομένως ενδεχόμενες αλληλεπιδράσεις δεν θα μπορούσαν να διατηρηθούν σε 1% SDS που απαιτείται για την εκχύλιση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών. Η ομοιοπολική σύνδεση του SUMO παραμένει στο LRH-1 και έτσι είναι δυνατή η ανίχνευσή της.

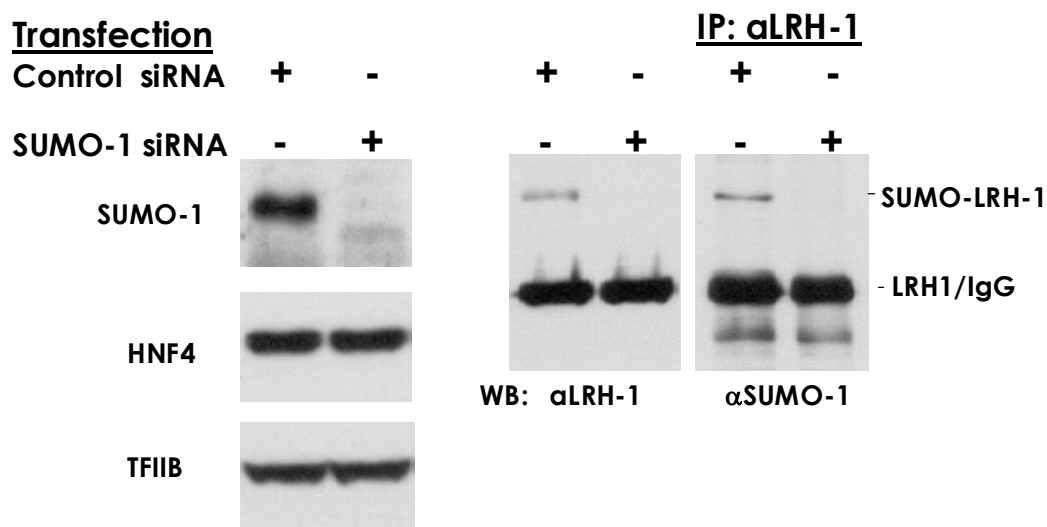


**Εικόνα 18.** Εκχυλίσματα κυττάρων HEK 293 που διαμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς που σημειώνονται, ανοσοκατακρημνίστηκαν με τα αντισώματα α-Myc ή α-HA (IP) και στη συνέχεια αναλύθηκαν με τα αντισώματα α-LRH-1 ή α-HA ή α-Myc (WB) ώστε να ανιχνευθεί το τροποποιημένο και μη LRH-1.



**Εικόνα 19.** Το ενδογενές LRH-1, τροποποιημένο και μη, ανιχνεύθηκε με Western blot σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 (αριστερά). Το τροποποιημένο με SUMO LRH-1 ανιχνεύθηκε μετά από ανοσοκατακρήμνιση από τα ίδια εκχυλίσματα με αντίσωμα α-LRH-1 και Western blot με αντίσωμα SUMO-1 (δεξιά).

Ένα δεύτερο ανεξάρτητο πείραμα που επιβεβαίωσε την ταυτότητα της ζώνης των 90kD ήταν η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων HepG2 με siRNA ειδικό για SUMO-1. Αρχικά ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης του SUMO-1 με western blot σε ολικά εκχυλίσματα με αντίσωμα SUMO-1 καθώς και η ειδικότητά της σε πειράματα ελέγχου τόσο με siRNA ελέγχου όσο και με αντισώματα κατά μη ειδικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια δείχθηκε ότι η ζώνη των 90kD του LRH-1 εξαφανίζεται όταν δεν υπάρχει SUMO-1 στα κύτταρα (**Εικόνα 20**).

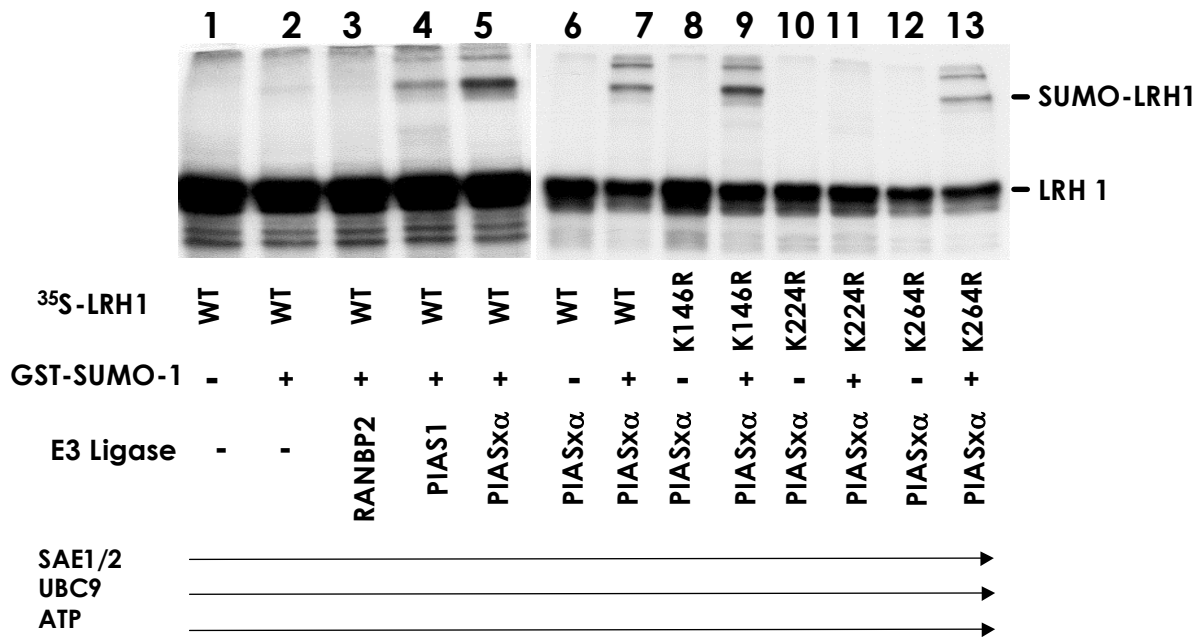


**Εικόνα 20.** Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν παροδικά με τα σημειωμένα siRNA και 72hr μετά παρασκευάστηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Με Western blot αναλύθηκε η έκφραση των SUMO-1, HNF4, TFIIB και LRH-1 χρησιμοποιώντας αντίστοιχα αντισώματα (WB) (αριστερά και μέση). Από τα ίδια εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίστηκε το LRH-1 και αναλύθηκε για την παρουσία της τροποποιημένης μορφής σε Western blot με τη χρήση αντισώματος α-SUMO-1 (δεξιά).

Το επόμενο ερώτημα που τέθηκε ήταν ποιες είναι οι απαιτήσεις για την σουμοϋλίωση του LRH-1 *in vitro*. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ραδιοσημασμένο  $^{35}\text{S}$ -LRH-1 και βακτηριακά εκφρασμένα και καθαρυσμένα τα απαραίτητα ένζυμα E1 (SAE1/2), E2 (Ubc9) και διάφορες λιγασές E3 (RANBP2, PIAS1 και PIASxα) καθώς και GST-SUMO-1 και ATP. Η σουμοϋλίωση του ραδιοσημασμένου LRH-1 ανιχνεύθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία. Η ζώνη μεγαλύτερου μοριακού βάρους υπήρχε μόνο όταν η αντίδραση έγινε παρουσία των λιγασών της οικογένειας PIAS και μόνο όταν



χρησιμοποιήθηκε LRH-1 WT ή με μεταλλαγή στις λυσίνες 146 ή 264 (**Εικόνα 21**). Αντίθετα όταν ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το LRH-1 μεταλλαγμένο στη λυσίνη 224 δεν ανιχνεύθηκε η τροποποιημένη ζώνη. Τα αποτελέσματα από το πείραμα *in vitro* συμφωνούν απόλυτα με αυτά από τα πειράματα *in vivo* σε κύτταρα HeLa.



**Εικόνα 21.** Τροποποίηση του LRH-1 με SUMO-1 *in vitro*. Ραδιοσημασμένο με <sup>35</sup>S και συνθετικό *in vitro* LRH-1 WT ή σημειακά μεταλλάγματα αυτού, επώαστηκαν με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που σημειώνονται και ATP. Τα προϊόντα των αντιδράσεων ανιχνεύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία.

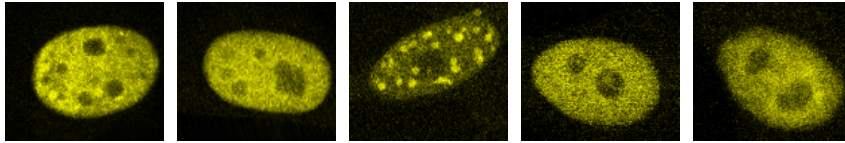
Τα παραπάνω πειράματα δείχνουν ότι το LRH-1 αποτελεί υπόστρωμα για σουμοϋλίωση με κύριο κατάλοιπο τη λυσίνη 224. Απαραίτητη προϋπόθεση για την τροποποίηση είναι η δράση της E3 λιγάσης PIASα. Το SUMO-1 μπορεί να απομακρυνθεί από το LRH-1 με τη δράση της πρωτεάσης SuPr-1.

## Το τροποποιημένο με SUMO LRH-1 τοποθετείται σε διακριτά υποπυρηνικά σωματίδια

Προκειμένου να μελετήσουμε τον υποπυρηνικό εντοπισμό του LRH-1 και πώς αυτός αλλάζει λόγω της τροποποίησης με SUMO εκφράσαμε το LRH-1 ως

σύντηξη με το YFP (Yellow Fluorescent Protein) σε κύτταρα HeLa. Το YFP-LRH-1 παρουσιάζει μία διάχυτη πυρηνική χρώση και μόνο όταν συνεκφράζεται με SUMO-1 και PIAS $\alpha$  ένα μεγάλο μέρος του φθορισμού συγκεντρώνεται σε διακριτά υποπυρηνικά σωμάτια στην πλειοψηφία των κυττάρων που παρατηρήθηκαν (**Εικόνα 22**). Κάτω από αυτές τις συνθήκες περίπου το 50% του YFP-LRH-1 είναι τροποποιημένο με SUMO, όπως ελέγχθηκε με western blot. Όταν ταυτόχρονα με YFP-LRH-1, SUMO-1 και PIAS $\alpha$  συνεκφράστηκε η πρωτεάση SuPr-1 τα χαρακτηριστικά σωμάτια δεν σχηματίστηκαν. Το ίδιο συνέβη επίσης όταν χρησιμοποιήθηκε το σημειακά μεταλλαγμένο YFP-LRH-1 K224R που δεν σουμοϋλιώνεται (**Εικόνα 22**). Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι ο υποπυρηνικός εντοπισμός του LRH-1 αλλάζει κάτω από συνθήκες που επιτρέπουν την τροποποίησή του με SUMO. Σε αυτές τις περιπτώσεις το LRH-1 δεν είναι εξολοκλήρου διάχυτο στον πυρήνα αλλά ένα μεγάλο ποσοστό μετατοπίζεται σε σωμάτια.

YFP-LRH1 wt	+	+	+	+	-
YFP-LRH1 K224R	-	-	-	-	+
SUMO-1	-	+	+	+	+
PIAS $\alpha$	-	-	+	+	+
SuPr-1	-	-	-	+	-

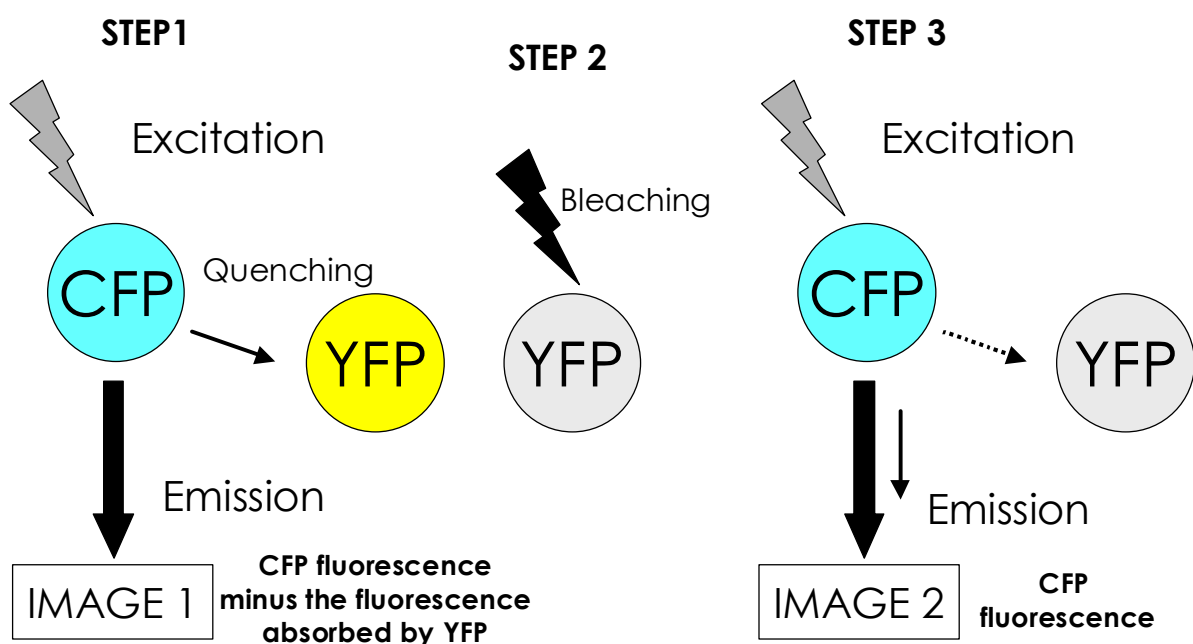
  

  

<u>% of fluorescent cells</u>						
<b>With nuclear dots:</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>85</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	
<b>With diffuse nuclear fluorescence:</b>	<b>98</b>	<b>97</b>	<b>15</b>	<b>98</b>	<b>100</b>	

**Εικόνα 22.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης που αναγράφονται και ο υποπυρηνικός εντοπισμός του YFP-LRH-1 παρατηρήθηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο. Το ποσοστό των κυττάρων στα οποία το YFP-LRH-1 εντοπίζεται σε πυρηνικά σωμάτια σημειώνεται σε κάθε περίπτωση.

Τα χαρακτηριστικά αυτά σωμάτια έχουν αναφερθεί ότι σχηματίζονται και από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που σουμοϋλιώνονται. Ωστόσο δεν υπάρχει πειραματική απόδειξη ότι στα σωμάτια αυτά συγκεντρώνονται αποκλειστικά τα σουμοϋλιωμένα μόρια των μεταγραφικών παραγόντων. Το

ερώτημα αυτό είναι καίριο για τη διαλεύκανση του ρόλου της σουμοϋλίωσης των μεταγραφικών παραγόντων στη ρύθμιση της μεταγραφής. Προκειμένου λοιπόν να απαντηθεί αυτό το ερώτημα πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) after photobleaching χρησιμοποιώντας CFP-SUMO-1 και YFP-LRH-1. Η τεχνική FRET βασίζεται στην ικανότητα της φθορίζουσας πρωτεΐνης υψηλής ενέργειας CFP (Cyan Fluorescent Protein) να μεταφέρει ένα ποσοστό της ενέργειάς της στη χαμηλότερης ενέργειας φθορίζουσα πρωτεΐνη YFP (Yellow Fluorescent Protein). Προκειμένου να είναι δυνατή η μεταφορά της ενέργειας πρέπει οι δύο φθορίζουσες πρωτεΐνες να βρίσκονται σε απόσταση 50-100Å, δηλαδή να αλληλεπιδρούν ή να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες. Γενικά, το μετρήσιμο αποτέλεσμα από αυτή τη μεταφορά ενέργειας είναι η αύξηση του φθορισμού εκπομπής του YFP και η μείωση του φθορισμού εκπομπής του CFP (**Εικόνα 23**).

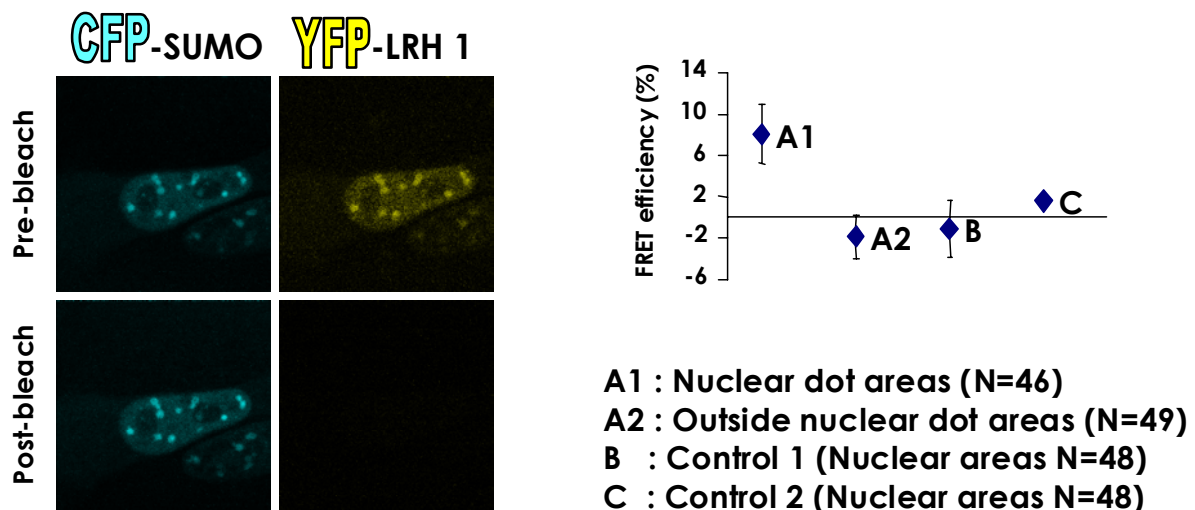


$$\text{FRET} = (\text{Intensity 2} - \text{Intensity 1}) \times 100 / \text{Intensity 2}$$

**Εικόνα 23.** FRET after photobleaching assays. Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών σταδίων που ακολουθούνται για να μετρηθεί η άμεση αλληλεπίδραση δύο πρωτεϊνών με τη μέθοδο FRET. (Kaprova et al 2003)

Αν λοιπόν συμβαίνει FRET, τότε σε περίπτωση καταστροφής του φθορισμού του δέκτη YFP, είναι δυνατόν να μετρηθεί αύξηση στο φθορισμό εκπομπής του

δότη CFP. Πράγματι μετρήθηκε αύξηση του φθορισμού του CFP-SUMO-1 σε ποσοστό ~8% αποκλειστικά στις περιοχές των υποπυρηνικών σωμάτων και όχι εκτός αυτών, όταν καταστράφηκε ο φθορισμός του YFP-LRH-1 με ακτινοβολία (Εικόνα 24). Το ποσοστό της αύξησης εξαρτάται από τη διαμόρφωση που έχουν οι φθορίζουσες πρωτεΐνες στο χώρο και από το πόσο κοντά βρίσκονται. Η σημαντικότητα του ποσοστού της αύξησης φαίνεται από πειράματα αρνητικού ελέγχου που δεν είναι δυνατή η αλληλεπίδραση. Η αύξηση στο φθορισμό του CFP παρατηρείται μόνο όταν ταυτόχρονα με τις πρωτεΐνες CFP-SUMO-1 και YFP-LRH-1 εκφράζεται η λιγάση PIAS $\alpha$ . Αντίθετα όταν αυτή δεν συνεκφράζεται ή όταν χρησιμοποιείται η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη YFP-LRH-1 K224R δεν μετράται FRET στα σωματίδια του CFP-SUMO-1, μετά την καταστροφή του φθορισμού του YFP (Εικόνα 24).



**Εικόνα 24.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης CFP-SUMO-1, YFP-LRH-1 και PIAS $\alpha$ . Εικόνες των CFP και YFP καταγράφηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο πριν και μετά την καταστροφή του φθορισμού του YFP με laser 514nm μέγιστης έντασης. Στο διάγραμμα σημειώνεται το ποσοστό FRET ως η αύξηση του φθορισμού του CFP μετά την καταστροφή του φθορισμού του YFP σε περιοχές που εντοπίζονται πυρηνικά σωματίδια (A1) καθώς και σε αντίστοιχου εμβαδού περιοχές χωρίς πυρηνικά σωματίδια (A2). Στο πείραμα ελέγχου B τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης CFP-SUMO-1, YFP-LRH-1 K224R και PIAS $\alpha$  ενώ στο πείραμα ελέγχου C τα κύτταρα διαμολύνθηκαν μόνο με τους φορείς CFP-SUMO-1, YFP-LRH-1 χωρίς PIAS $\alpha$ .

Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει το συμπέρασμα ότι η πραγματική μοριακή αλληλεπίδραση του SUMO με το LRH-1 συμβαίνει στα υποπυρηνικά σωματίδια που συγκεντρώνονται και οι δύο πρωτεΐνες. Η αλληλεπίδραση που

παρατηρήθηκε με το FRET θα μπορούσε να εξηγηθεί και ως αλληλεπίδραση του LRH-1 με κάποιες άλλες πρωτεΐνες που είναι σουμοϋλιωμένες και συγκεντρώνονται σε αυτά τα σωμάτια. Αυτή η υπόθεση όμως καταρρίπτεται από την απουσία FRET όταν εκφράζεται η πρωτεΐνη LRH-1 K224R ή όταν δεν συνεκφράζεται η λιγάση και έτσι το LRH-1 δεν τροποποιείται. Αυτό σημαίνει ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1, για το οποίο μετρείται FRET, εντοπίζεται αποκλειστικά στα πυρηνικά σωμάτια ενώ το μη τροποποιημένο LRH-1, για το οποίο δεν ανιχνεύεται FRET, βρίσκεται εκτός αυτών. Υπάρχουν λοιπόν δύο πληθυσμοί μορίων LRH-1, τροποποιημένων και μη που εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές στον πυρήνα.

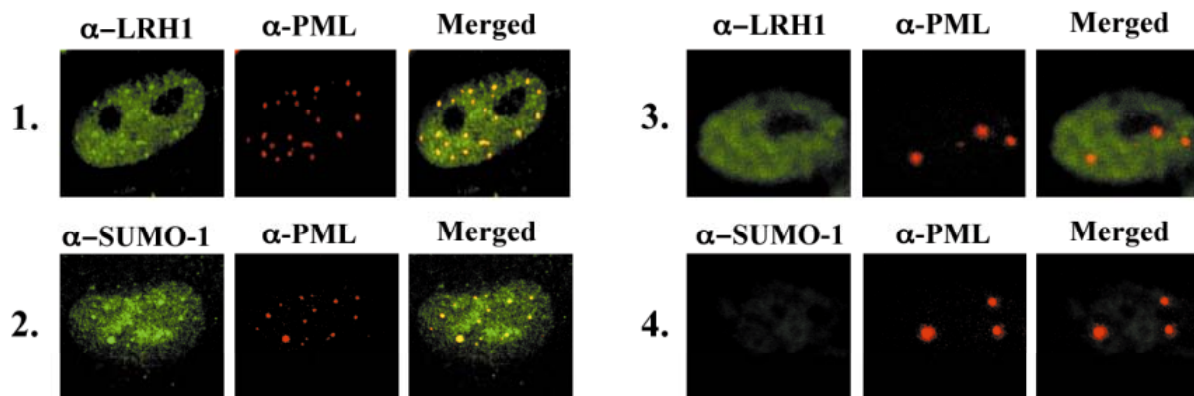
### **Οι περιοχές που εντοπίζεται το τροποποιημένο με SUMO LRH-1 αντιστοιχούν σε σωμάτια PML**

Είναι γνωστό ότι το PML σχηματίζει πυρηνικά σωμάτια τα οποία εξαρτώνται από τη δυνατότητά του να σουμοϋλιωθεί. Στα σωμάτια PML συγκεντρώνονται πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες, διάφορα ένζυμα, όπως ακετυλάσες, απακετυλάσες, E3 λιγάσες σουμοϋλίωσης καθώς και SUMO-1. Ελέγξαμε λοιπόν αν τα σωμάτια που συσσωρεύεται το σουμοϋλιωμένο LRH-1 αντιστοιχούν στα σωμάτια PML.

Αρχικά εξετάσαμε αν το ενδογενές LRH-1 συσσωρεύεται σε παρόμοιους πυρηνικούς σχηματισμούς, πραγματοποιώντας χρώση με το αντίσωμα κατά του LRH-1 στην ηπατική κυτταρική σειρά C3A-HepG2. Το ενδογενές LRH-1 ανιχνεύεται σε ένα μεγάλο ποσοστό διάχυτο στον πυρήνα αλλά και σε μικρά πυρηνικά σωμάτια. Τα πυρηνικά αυτά σωμάτια ταυτίζονται με τα ενδογενή σωμάτια PML, όπως προκύπτει από τη διπλή χρώση με αντισώματα α-LRH-1 και α-PML (**Εικόνα 25**). Τα ενδογενή σωμάτια PML συνεντοπίζονται με SUMO-1, όπως έχει περιγραφεί. Όταν τα κύτταρα C3A-HepG2 διαμολύνθηκαν παροδικά με siRNA ειδικό για SUMO-1, το LRH-1 εξαφανίστηκε από τα πυρηνικά σωμάτια και το ενδογενές PML σχημάτισε 2-4 μεγάλα συσσωματώματα (**Εικόνα 25**).

Ο ενδεχόμενος συσχετισμός της σουμοϋλίωσης του LRH-1 με το συνεντοπισμό του με τα σωμάτια PML αναλύθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού στο ετερόλογο σύστημα HeLa. Το YFP-LRH-1 κάτω από συνθήκες που επιτρέπουν την τροποποίησή του με SUMO, δηλαδή

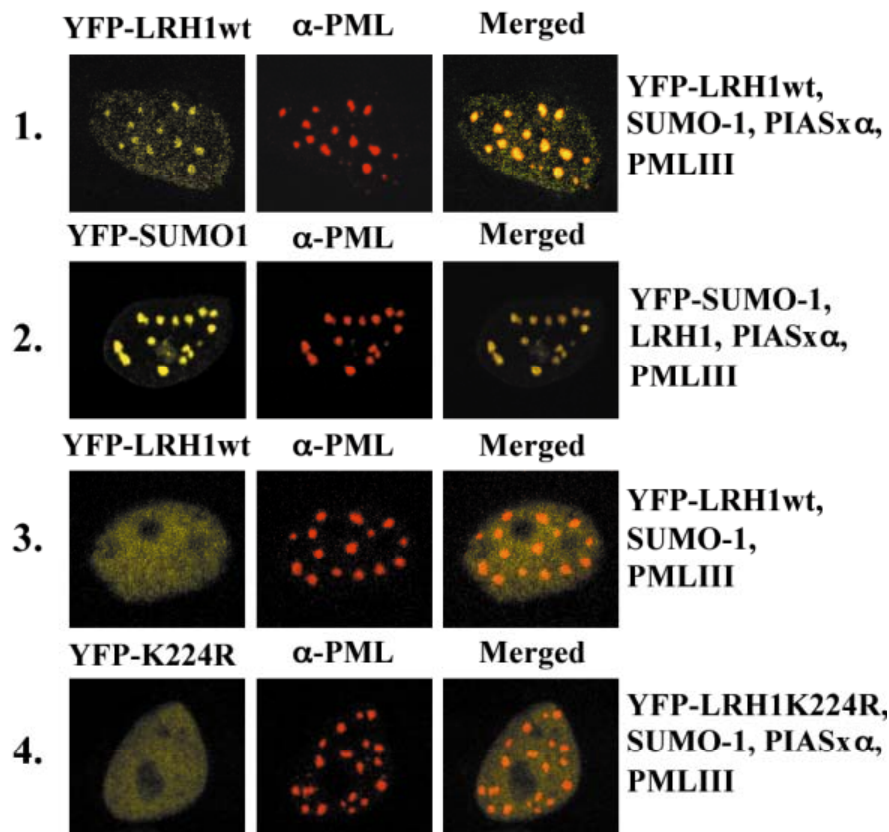
συνέκφραση SUMO-1 και PIAS $\alpha$ , σχηματίζει πυρηνικά σωμάτια, όπως έχει προαναφερθεί.



**Εικόνα 25.** Ο υποπυρηνικός εντοπισμός των ενδογενών LRH-1, SUMO-1 και PML παρατηρήθηκε με χρώση, με τα αντίστοιχα αντισώματα, κυττάρων HepG2 που δεν είχαν διαμολυνθεί (1, 2) ή που είχαν διαμολυνθεί παροδικά με SUMO-1 siRNA (3, 4), στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

Τα σωμάτια αυτά στα οποία συγκεντρώνεται το σουμοϋλιωμένο YFP-LRH-1 συνεντοπίζονται με τα σωμάτια PML, όπως φαίνεται από ταυτόχρονη συνέκφραση του PML και χρώση με αντίσωμα  $\alpha$ -PML (**Εικόνα 26**). Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, παρουσία δηλαδή LRH-1 και PIAS $\alpha$ , το YFP-SUMO-1 συνεντοπίζεται σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό με τα σωμάτια PML. Αντίθετα κάτω από συνθήκες που δεν είναι δυνατή η σουμοϋλίωση του YFP-LRH-1, δηλαδή όταν χρησιμοποιείται το YFP-LRH-1 K224R ή δεν συνεκφράζεται η λιγάση PIAS $\alpha$ , τότε ο φθορισμός του LRH-1 είναι διάχυτος στον πυρήνα και δεν συνεντοπίζεται με τα σωμάτια PML (**Εικόνα 26**).

Η υπερέκφραση της πρωτεάσης SuPr-1 σε κύτταρα HeLa που υπερεκφράζουν YFP-LRH-1, SUMO-1 και PIAS $\alpha$  καταστρέφει τα σωμάτια του YFP-LRH-1 το οποίο εντοπίζεται διάχυτο στον πυρήνα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το YFP-SUMO-1 προφανώς απομακρύνεται από τις πρωτεΐνες που ήταν συνδεδεμένο και μένει διάχυτο και στην περιφέρεια του πυρήνα (**Εικόνα 12**). Το PML από το οποίο απομακρύνεται το SUMO, δε σχηματίζει τα πυρηνικά σωμάτια. Αντίθετα εντοπίζεται σε 2-4 μεγάλα συσσωματώματα, σχηματισμοί που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία να σχηματίζονται με τη δράση της SuPr-1 (Best et al 2002, Duprez et al 1999, Muller et al 2000).

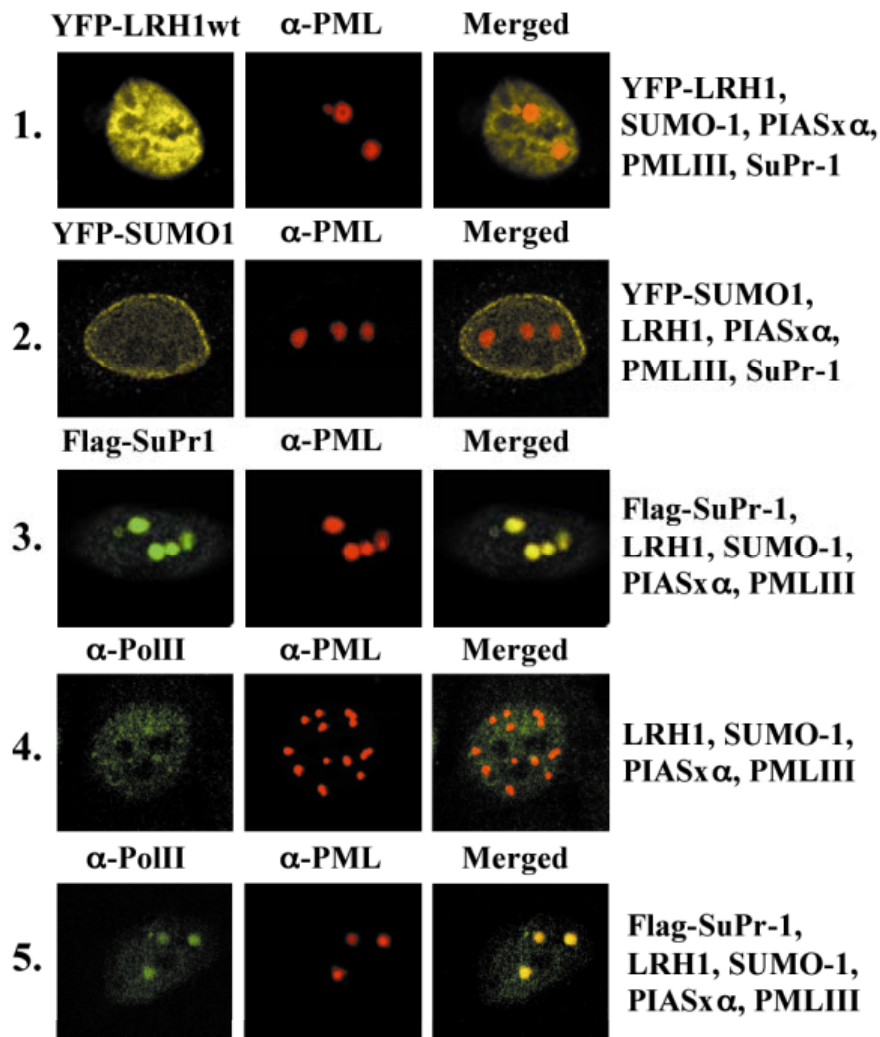


**Εικόνα 26.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης που σημειώνονται δεξιά και με συνεστιακό μικροσκόπιο παρατηρήθηκε ο υποπυρηνικός εντοπισμός του YFP-LRH-1 (αριστερά), με τη χρήση του άμεσου φθορισμού του YFP, καθώς και του PML, με χρώση με αντίσωμα  $\alpha$ -PML (μέση).

Το ενδιαφέρον είναι ότι σε αυτά τα συσσωματώματα συσσωρεύεται η SuPr-1 αλλά και ένα μεγάλο ποσοστό της ενδογενούς RNA pol II (**Εικόνα 27**). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι το μή σουμοϋλιωμένο PML σχηματίζει συσσωματώματα τα οποία είναι κάποιο λειτουργικό ρόλο. Η λειτουργία τους είναι σίγουρα διαφορετική από τα χαρακτηρισμένα σωμάτια PML αφού δεν περιέχουν SUMO ή σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες αλλά ενδεχομένως να αποτελούν θέσεις ενεργούς μεταγραφής, αφού σε αυτά εντοπίζεται η RNA pol II. Η περαιτέρω λειτουργική ανάλυση και ο χαρακτηρισμός του νέου τύπου σωματίων PML παρουσιάζει ενδιαφέρον και απαιτεί επιπλέον πειράματα ανοσοφθορισμού με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες της γενικής μεταγραφικής μηχανής αλλά και πιο ειδικούς, καθώς και χρώση εντοπισμού του νεοσυντιθέμενου mRNA. Η ανάλυση αυτή δεν ήταν στόχος αυτής της εργασίας και για αυτό δεν επεκτάθηκε. Εξάλλου δεν φαίνεται να αποτελεί μέρος του μηχανισμού δράσης της σουμοϋλίωσης-αποσουμοϋλίωσης του LRH-1, αφού η δράση της SuPr-1



δεν προκαλεί τη μετατόπισή του στα συσσωματώματα του PML (**Εικόνα 27**). Αντίθετα το LRH-1 μένει διάχυτο. Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, η δράση της SuPr-1 προκαλεί αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του LRH-1, αλλά αυτό φαίνεται να είναι συνέπεια της αποδέσμευσης του από τα σωματία PML και αύξηση του μη τροποποιημένου LRH-1 και όχι της μετατόπισής του στα παραπάνω συσσωματώματα που είναι πλούσια σε RNA pol II.



**Εικόνα 27.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης που σημειώνονται δεξιά και με συνεστιακό μικροσκόπιο παρατηρήθηκε ο υποκυρηνικός εντοπισμός του YFP-LRH-1 (αριστερά 1), του YFP-SUMO-1 (αριστερά 2), με τη χρήση του άμεσου φθορισμού του YFP. Παρατηρήθηκε επίσης ο εντοπισμός των SuPr-1 (αριστερά 3) και της ενδογενούς RNA pol II (αριστερά 4, 5) με χρώση με αντίστοιχα αντισώματα .



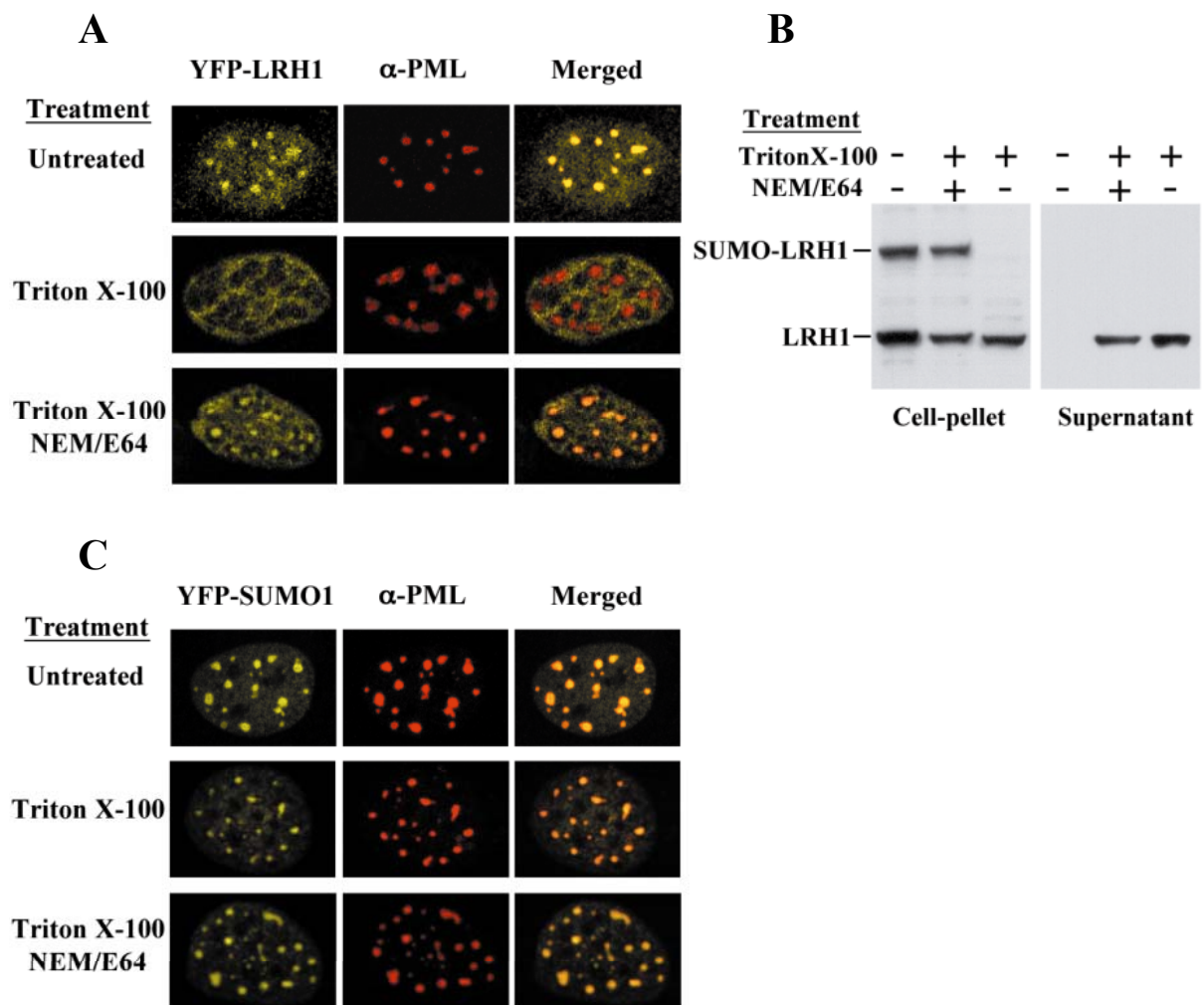
## Το τροποποιημένο με SUMO LRH-1 συνδέεται δυναμικά με τα σωμάτια PML

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η παρατεταμένη δράση της πρωτεάσης SuPr-1 στα κύτταρα προκαλεί την αποσομούλιωση του LRH-1 και την αποδέσμευσή του από τα σωμάτια PML. Στη συνέχεια αναλύθηκε περαιτέρω ο ρόλος της αποσομούλιωσης στην αποδέσμευση του LRH-1 από τα σωμάτια PML. Θέλοντας λοιπόν να εξετάσουμε την υπόθεση ότι τα σωμάτια PML αποτελούν αποθηκευτικούς χώρους για τους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμίζουν τη διαθεσιμότητα τους στους υποκινητές, αναζητήσαμε πειραματικούς τρόπους ώστε να ελαττώσουμε τη συγκέντρωση του πυρηνικού LRH-1 και να προκαλέσουμε την κινητοποίησή του από τα σωμάτια PML.

Χρησιμοποιήσαμε το ετερόλογο σύστημα των κυττάρων HeLa τα οποία διαμολύνθηκαν παροδικά με YFP-LRH-1 ή myc-LRH-1, HA-SUMO-1 ή YFP-SUMO-1, PIAS $\alpha$  και PML. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με 0.5% Triton X-100 για 1 λεπτό. Έπειτα από αυτή την ήπια επώαση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και έγινε χρώση με αντίσωμα  $\alpha$ -PML και παρατήρηση του υποπυρηνικού εντοπισμού του YFP-LRH-1, YFP-SUMO-1 και PML (**Εικόνα 28**). Κάτω από αυτές τις ήπιες συνθήκες διατήρησης ο πυρήνας διατηρεί τη δομή του. Η βιοχημική ανάλυση των κυττάρων έδειξε ότι περίπου το 50% του LRH-1 βγαίνει από τον πυρήνα (Supernatant) ενώ το υπόλοιπο παραμένει στους πυρήνες (Cell-pellet) (**Εικόνα 28B**). Η μικροσκοπική παρατήρηση έδειξε ότι το YFP-LRH-1 που παρέμεινε στους πυρήνες, απομακρύνθηκε από τα σωμάτια PML και συγκεντρώθηκε γύρω από αυτά και στο νουκλεόπλασμα (**Εικόνα 28A**). Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι όταν η συγκέντρωση των πυρηνικών πρωτεϊνών, άρα και του LRH-1 ελαττωθεί, τότε αυτό αποσομουλιώνεται και απομακρύνεται από τα σωμάτια PML. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες το YFP-SUMO-1 και το PML παρέμειναν συγκεντρωμένα σε διακριτά σωμάτια (**Εικόνα 28C**). Αυτά τα σωμάτια είναι λιγότερο συμπαγή όσον αφορά το PML και περιέχουν λιγότερο YFP-SUMO-1. Το SUMO-1 στην περίπτωση αυτή μπορεί να είναι συνδεδεμένο με δομικές πρωτεΐνες των σωματίων PML, όπως είναι το ίδιο το PML, ή να είναι ελεύθερο SUMO που παραμένει στα σωμάτια.

Προκειμένου να έχουμε κάποια ένδειξη για το ρόλο της αποσομούλιωσης στην αποδέσμευση του LRH-1 από τα σωμάτια PML,

πραγματοποιήσαμε την επώαση με το απορρυπαντικό παρουσία των αναστολέων των ισοπεπτιδασών (NEM/E64).



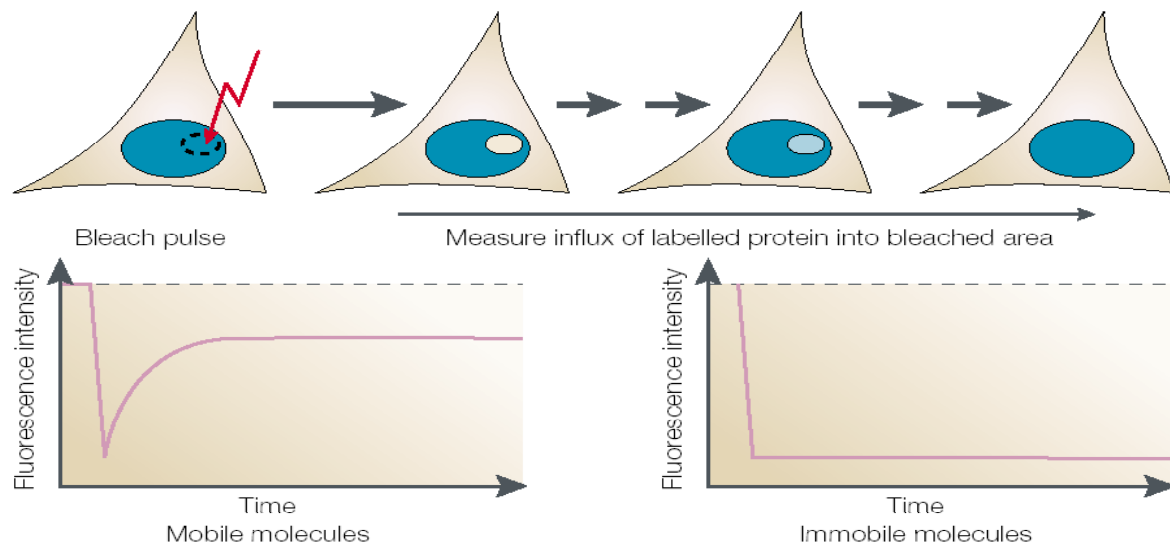
**Εικόνα 28.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης των YFP-LRH-1, HA-SUMO-1, PIAS $\alpha$  και PML (A, B) και με myc-LRH-1, YFP-SUMO-1, PIAS $\alpha$  και PML (C). Τα κύτταρα επώαστηκαν με 0,5% Triton X-100 απουσία ή παρουσία των αναστολέων των ισοπεπτιδασών (NEM/E64). Ο υποπυρηνικός εντοπισμός των YFP-LRH-1, YFP-SUMO-1 και PML εξετάστηκε είτε με τον άμεσο φθορισμό του YFP ή μετά από χρώση με αντίσωμα  $\alpha$ -PML (A, C). Η παρουσία του τροποποιημένου με SUMO LRH-1 στην κυτταρική πελέττα ή στο υπερκείμενο ελέγχθηκε με western blot στα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με αντίσωμα  $\alpha$ -LRH-1 (B).

Οι πρωτεάσες που απομακρύνουν το SUMO από τις πρωτεΐνες στόχους ανήκουν στην ομάδα των ισοπεπτιδασών. Στην περίπτωση αυτή επίσης η επώαση με Triton X-100 είχε ως αποτέλεσμα τη διάχυση ~50% του μη τροποποιημένου LRH-1 από τον πυρήνα, όπως φάνηκε με western blot

(Supernatant) **(Εικόνα 28B)**. Ωστόσο ενδιαφέρουσα ήταν η παρατήρηση ότι το LRH-1 που παραμένει στον πυρήνα και είναι σε ένα μεγάλο ποσοστό σουμοϋλιωμένο, όπως φαίνεται από το western blot (Cell-pellet) συγκεντρώνεται στα σωμάτια PML, όπως φαίνεται από τα πειράματα μικροσκοπίας **(Εικόνα 28A)**. Από αυτό το πείραμα συμπεραίνεται ότι οι ισοπεπτιδάσες, και κατά πάσα πιθανότητα οι πρωτεάσες SUMO είναι υπεύθυνες για την απελευθέρωση του σουμοϋλιωμένου LRH-1 από τα σωμάτια PML. Οι πρωτεάσες αυτές ενδεχομένως να δρουν αποκρινόμενες στην ελάττωση της συγκέντρωσης του νουκλεοπλασματικού LRH-1 γεγονός που συμβαίνει όταν τα κύτταρα επωάζονται με το απορρυπαντικό. Το PML και YFP-SUMO-1 παραμένουν επίσης στα σωμάτια PML τα οποία σε αυτή την περίπτωση είναι συμπαγή **(Εικόνα 28C)**. Το γεγονός ότι τα σωμάτια PML δεν καταστρέφονται με την ενεργοποίηση των πρωτεασών όπως γίνεται όταν εκφράζεται εξωγενώς η SuPr-1, μας κάνει να αναρωτηθούμε αν η αποσουμοϋλίωση και απελευθέρωση του LRH-1 στις δύο περιπτώσεις οφείλεται στον ίδιο μηχανισμό ή σε διαφορετικού τύπου πρωτεάσες. Το πιθανότερο είναι ότι πρωτεάσες της οικογένειας SuPr-1 δρουν και στην περίπτωση της επώασης με Triton X-100 τόσο στο LRH-1 όσο και στο PML. Εξάλλου τα σωμάτια PML φαίνεται να είναι λιγότερο συμπαγή και να περιέχουν λιγότερο SUMO. Ωστόσο η ενεργοποίηση των ενδογενών πρωτεασών για το χρονικό διάστημα του 1 λεπτού δεν επιφέρει τα δραματικά αποτελέσματα της υψηλής έκφρασης της SuPr-1 για μεγάλο χρονικό διάστημα, που είναι η ολοκληρωτική αποσουμοϋλίωση του PML και η καταστροφή των σωματίων. Συνολικά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αποσουμοϋλίωση του LRH-1 είναι η αιτία αποδέσμευσης του από τα σωμάτια PML και ίσως αυτή η ενζυματική ενεργότητα να ελέγχεται από τη συγκέντρωση του νουκλεοπλασματικού LRH-1.

Από τα παραπάνω πειράματα είναι φανερό ότι η σύνδεση του LRH-1 με τα σωμάτια PML είναι μια εξαιρετικά δυναμική διαδικασία που εξαρτάται από τη σουμοϋλίωση- αποσουμοϋλίωσή του. Προκειμένου να εξετάσουμε την κινητική αυτή της δυναμικής τροποποίησης πραγματοποιήσαμε πειράματα FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα HeLa στα οποία συνεκφράστηκαν το YFP-LRH-1 ή myc-LRH-1, το HA-SUMO ή YFP-SUMO-1, το PIAS $\alpha$  και το PML ή GFP-PML. Σε ζωντανά κύτταρα καταστράφηκε ο φθορισμός με laser μέγιστης έντασης, σε περιοχές του πυρήνα  $\sim 1\mu\text{m}^2$  που αντιστοιχούν σε σωμάτια ή σε νουκλεόπλασμα και στη συνέχεια καταγράφηκε η ανάκαμψη του φθορισμού σε χρονικό διάστημα 1

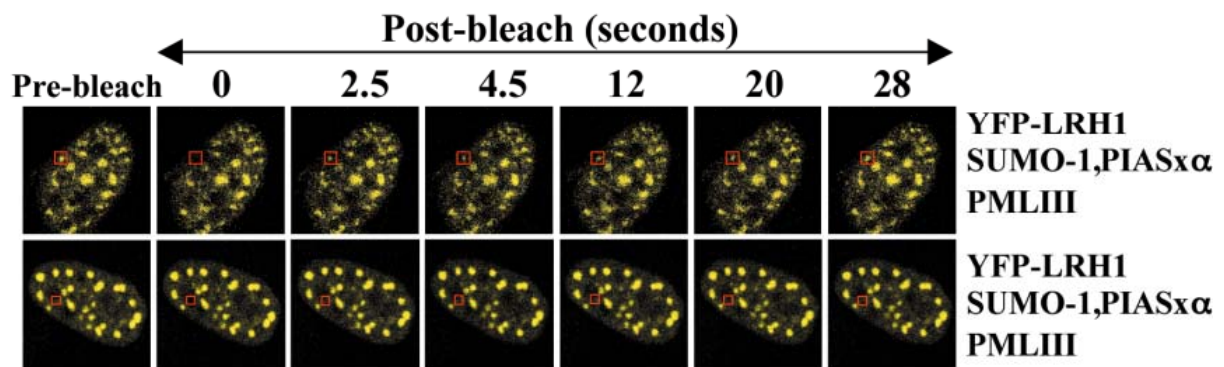
λεπτού. Η ανάκαμψη του φθορισμού σημαίνει σε μοριακό επίπεδο ότι τα μόρια που είναι συνδεδεμένα με την κατεστραμμένη φθορίζουσα πρωτεΐνη, έχουν απομακρυνθεί από το συγκεκριμένο σημείο και έχουν ανταλλάξει με άλλα που έρχονται από κοντινές περιοχές και φέρουν ενεργή φθορίζουσα πρωτεΐνη. Όσο πιο γρήγορα ανακάμψει ο φθορισμός τόσο πιο κινητική είναι η πρωτεΐνη. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να μετρηθεί η κινητικότητα διαφόρων πρωτεϊνών σε διάφορα σημεία του πυρήνα (**Εικόνα 29**).



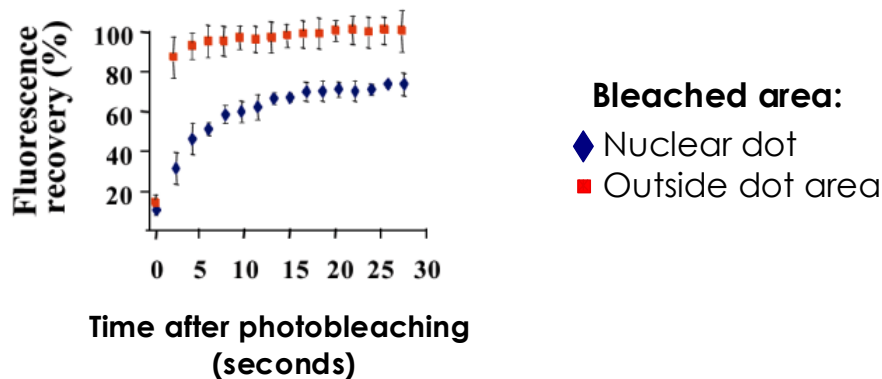
**Εικόνα 29.** Μέτρηση της κινητικότητας μιας πρωτεΐνης σε ένα συγκεκριμένο σημείο στον πυρήνα με τη μέθοδο FRAP. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων κατά τα οποία λαμβάνονται φωτογραφίες και μετρήσεις. Με τα διαγράμματα φαίνεται η ανάκαμψη του φθορισμού που παρουσιάζει μία σχετικά κινούμενη πρωτεΐνη (αριστερά) και μία σχετικά ακίνητη πρωτεΐνη (δεξιά).

Το YFP-LRH-1 που συγκεντρώνεται σε σωμάτια και αντιστοιχεί στο σουμοϋλιωμένο LRH-1, επανακάμπτει σε ποσοστό 75% του αρχικού φθορισμού πριν από την καταστροφή του, σε χρονικό διάστημα 15sec (**Εικόνα 30**). Αυτό σημαίνει ότι στα σωμάτια PML βρίσκονται δύο κλάσματα σουμοϋλιωμένου LRH-1, το ένα που είναι πολύ κινητικό και είναι αυτό που επανακάμπτει και ένα δεύτερο μικρότερου ποσοστού, που είναι σχετικά ακίνητο και δεν επανακάμπτει στο χρονικό πλαίσιο παρακολούθησης. Ο φθορισμός του YFP-LRH-1 που δεν βρίσκεται σε σωμάτια και αντιστοιχεί στο μη τροποποιημένο επανακάμπτει σε ποσοστό σχεδόν 100%, σε 2.5sec (**Εικόνα 30**). Αυτό σημαίνει ότι το νουκλεοπλασματικό LRH-1 κινείται ελεύθερα μέσα στον πυρήνα, με ρυθμούς διάχυσης. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η τροποποίηση του LRH-1 με

SUMO και η σύνδεση του με τα σωματίδια PML είναι μια εξαιρετικά δυναμική διαδικασία. Το γεγονός ότι το YFP-LRH-1 παρουσιάζει διαφορετική κινητικότητα αναλόγως με το αν βρίσκεται εντός ή εκτός των σωματιδίων PML, καθώς και το ότι υπάρχει ένα ποσοστό που είναι σταθερά συνδεδεμένο με τα σωματίδια PML είναι συμβατό με την υπόθεση ότι η σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα με τα σωματίδια PML έχει αποθηκευτικό ρόλο.



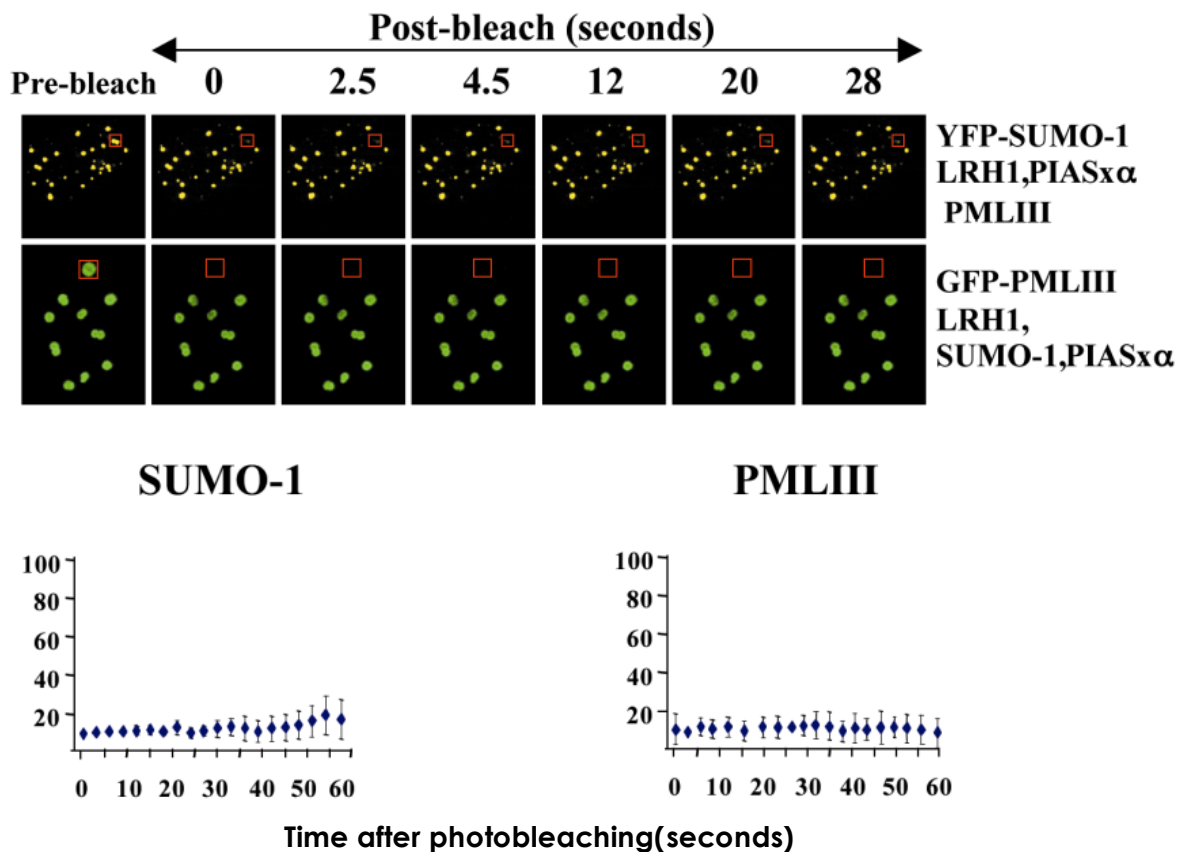
### LRH1



**Εικόνα 30.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης που σημειώνονται δεξιά. Μετά την καταστροφή του φθορισμού του YFP (photobleaching) στις περιοχές που σημειώνονται με κόκκινο πλαίσιο, σε ζωντανά κύτταρα, παρακολουθήθηκε η επανάκτηση του φθορισμού σε αυτά τα σημεία, με διαδοχικές εικόνες κάθε 2,5 sec. Φαίνονται εικόνες από επιλεγμένα χρονικά σημεία. Στο διάγραμμα φαίνεται το ποσοστό ανάκαμψης του φθορισμού σε σχέση με τον αρχικό φθορισμό, κάθε χρονική στιγμή μετά την καταστροφή του.

Σε παρόμοιο πείραμα FRAP, το GFP-PML παρατηρήθηκε να είναι εντελώς ακίνητο, αφού ο φθορισμός του δεν επανέκαμψε στο χρονικό διάστημα παρακολούθησης (**Εικόνα 31**). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με προηγούμενη αναφορά στη βιβλιογραφία καθώς και με το δομικό χαρακτήρα

που έχει η πρωτεΐνη PML για τα πυρηνικά σωμάτια (Boisvert et al 2000). Το πείραμα FRAP για το YFP-SUMO-1 έδειξε ότι αυτό είναι επίσης σταθερά συνδεδεμένο με τα σωμάτια. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στην ομοιοπολική σύνδεση του SUMO με τις δομικές πρωτεΐνες των σωματίων, PML και SP100 (**Εικόνα 31**).



**Εικόνα 31.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης που σημειώνονται δεξιά. Μετά την καταστροφή του φθορισμού του YFP ή GFP (photobleaching) στις περιοχές που σημειώνονται με κόκκινο πλαίσιο, σε ζωντανά κύτταρα, παρακολούθηθηκε η επανάκτηση του φθορισμού σε αυτά τα σημεία, με διαδοχικές εικόνες κάθε 2,5 sec. Φαίνονται εικόνες από επιλεγμένα χρονικά σημεία. Στο διάγραμμα φαίνεται το ποσοστό ανάκαμψης του φθορισμού σε σχέση με τον αρχικό φθορισμό, κάθε χρονική στιγμή μετά την καταστροφή του.

Δεν αποκλείεται να βρίσκεται εκεί ακόμη και ελεύθερο, αποτελώντας τμήμα του μηχανισμού σουμοϋλίωσης, εν αναμονή των πρωτεϊνών-στόχων του. Επιπλέον το γεγονός ότι το SUMO είναι πρωτεΐνη που δεν ανακάμπτει ο φθορισμός της δηλαδή δεν κινείται μέσα στον πυρήνα, υπονοεί ότι γενικά οι σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες, και όχι μόνο το LRH-1, συγκεντρώνονται στα πυρηνικά σωμάτια και δεν κινούνται ελεύθερα στο πυρηνόπλασμα. Η μετακίνησή τους προϋποθέτει

την αποσουμοϋλίωσή τους, παρατηρήσεις που συμφωνούν με τα προηγούμενα αποτελέσματα των πειραμάτων FRET και διάτρηση με Triton X-100.

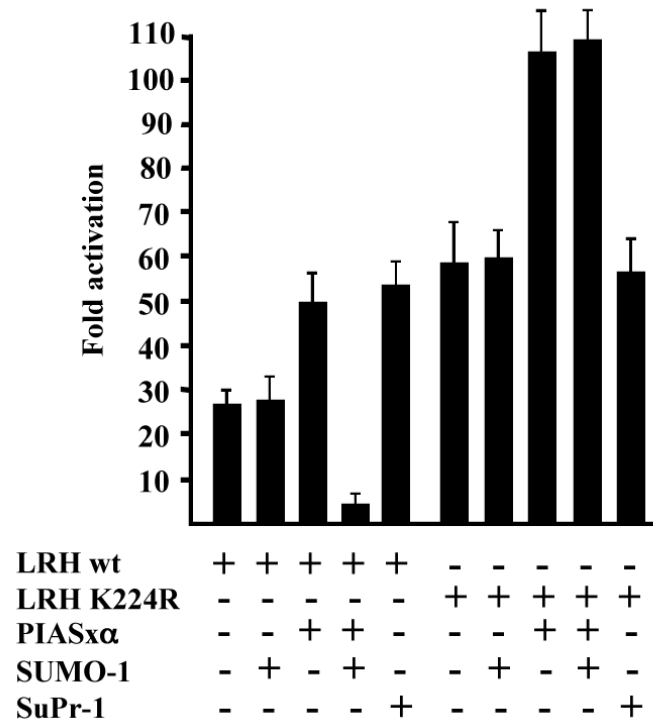
Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση του LRH-1 στα σωμάτια PML είναι μια δυναμική διαδικασία που ελέγχεται από τη γρήγορη σουμοϋλίωση-αποσουμοϋλίωση του. Το μεγαλύτερο ποσοστό του LRH-1 μετακινείται γρήγορα μεταξύ του πυρηνοπλάσματος και των σωματίων PML.

## **Η σουμοϋλίωση ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα του LRH-1, αποκλείοντάς το από τις μεταγραφικά ενεργές περιοχές**

Το LRH-1 υπάρχει στον πυρήνα σε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς, σουμοϋλιωμένο και μη. Ο κάθε πληθυσμός έχει διαφορετικό υποπυρηνικό εντοπισμό και αυτό ενδεχομένως να επηρεάζει τη μεταγραφική του ενεργότητα. Προκειμένου να απαντήσουμε στο ερώτημα αν οι δύο αυτοί πληθυσμοί του LRH-1 διαφοροποιούνται ως προς τη δυνατότητα μεταγραφής, μελετήσαμε το πώς επηρεάζει η σουμοϋλίωση του LRH-1 τη μεταγραφική του ενεργότητα και την πρόσβασή του στα γονίδια στόχους.

Αρχικά το αποτέλεσμα της σουμοϋλίωσης του LRH-1 στη μεταγραφική του ενεργότητα εξετάστηκε με δοκιμασίες παροδικής διαμόλυνσης. Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν η λουσιφεράση κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή SHP, τον οποίο ενεργοποιεί το LRH-1. Όταν αντί για WT LRH-1 εκφράστηκε η πρωτεΐνη LRH-1 K224R που δεν σουμοϋλιώνεται, η μεταγραφική της ενεργότητα ήταν διπλάσια (**Εικόνα 32**). Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε όταν μαζί με το WT LRH-1 εκφράστηκε η πρωτεάση SuPr-1. Όταν το LRH-1 συνεκφράζεται με PIASα και SUMO-1, σε συνθήκες που ένα μεγάλο ποσοστό ανιχνεύεται σουμοϋλιωμένο σε western blot, η μεταγραφική ενεργότητα είναι μειωμένη κατά ~8 φορές (**Εικόνα 32**). Παρόμοια μείωση δεν ανιχνεύθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ως ενεργοποιητής το LRH-1 K224R. Παρόλο που στα πειράματα western blot δεν ήταν δυνατό να ανιχνεύσουμε τη σουμοϋλιωμένη μορφή του LRH-1 όταν εκφράζεται χωρίς PIASα και SUMO-1, το γεγονός ότι υπάρχει αύξηση της ενεργότητας του WT LRH-1 παρουσία SuPr-1 ή της μεταλλαγής K224R μπορεί να σημαίνει ότι ένα ποσοστό σουμοϋλιώνεται από τον ενδογενή μηχανισμό αλλά δεν είναι δυνατό να ανιχνευθεί. Το ποσοστό

αυτό δεν τροποποιείται παρουσία της πρωτεάσης ή της μεταλλαγής και παρουσιάζεται ως αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας. Συνολικά από αυτά τα πειράματα συμπεραίνεται ότι η σουμοϋλίωση του LRH-1 έχει αρνητικό ρόλο στη μεταγραφική του ενεργότητα.



**Εικόνα 32.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν παροδικά με το φορέα αναφοράς SHP-luc που περιέχει το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης υπό το μεταγραφικό έλεγχο του εγγύς υποκινητή (500bp) του γονιδίου SHP καθώς και με τους φορείς έκφρασης που σημειώνονται αριστερά. Η ενεργότητα του υποκινητή μετρείται ως ποσοστό αύξησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης σε σχέση με την ενεργότητα που μετρήθηκε όταν τα κύτταρα διαμολύνθηκαν μόνο με το φορέα αναφοράς.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι η έκφραση του PIASα σε συνδυασμό τόσο με το WT όσο και με το K224R προκαλεί ~2 φορές αύξηση της ενεργότητάς τους. Αυτή η αύξηση είναι ανεξάρτητη από την σουμοϋλίωση του LRH-1 και δείχνει ότι το PIASα έχει συνενεργοποιητικό ρόλο στη μεταγραφική δράση του LRH-1 (**Εικόνα 32**). Η συνενεργοποιητική δράση του PIASα έχει περιγραφεί και για άλλους ενεργοποιητές.

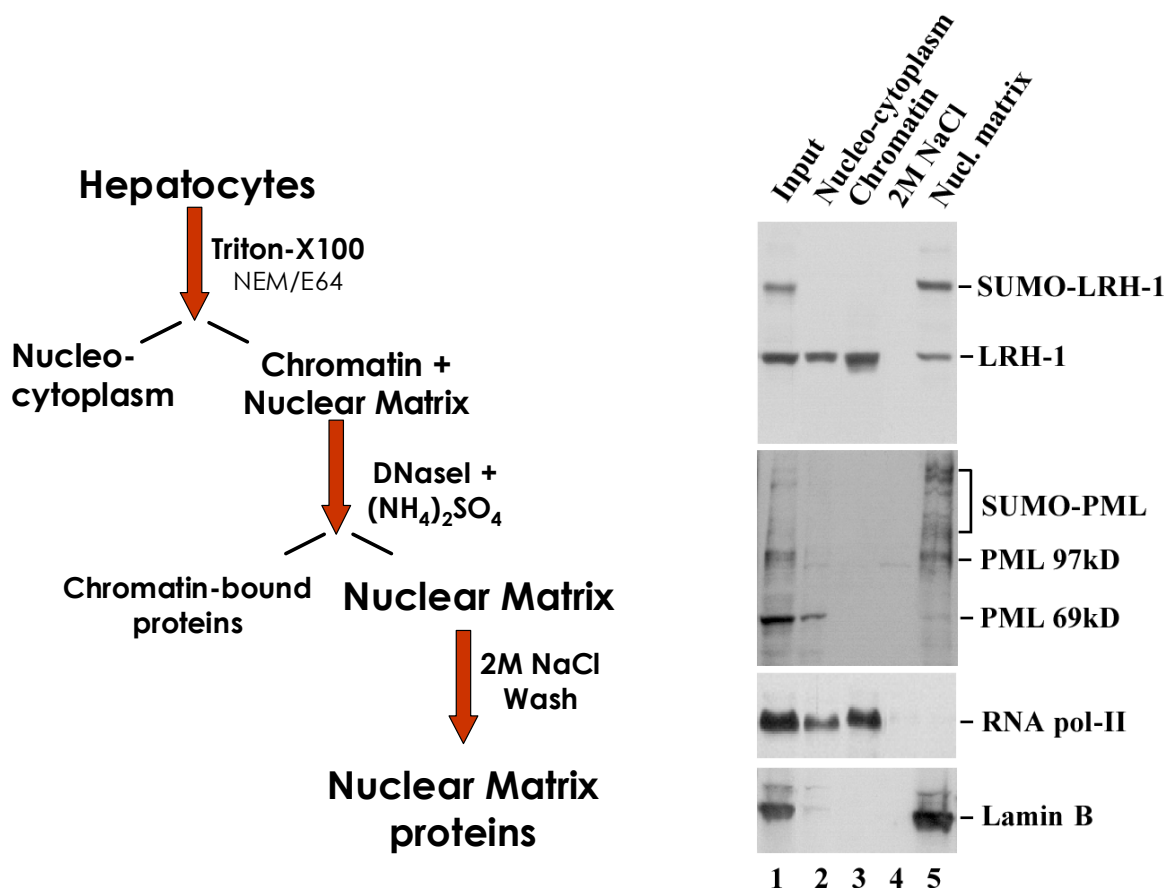
Η κατασταλτική δράση της σουμοϋλίωσης στην ενεργοποίηση της μεταγραφής από το LRH-1 μπορεί να εξηγηθεί με δύο τρόπους. Μπορεί να είναι αποτέλεσμα άμεσης επίδρασης στην ενεργότητα του LRH-1 ή έμμεσης σε άλλους παράγοντες, για παράδειγμα επηρεάζοντας αρνητικά τη δράση



συνενεργοποιητών (π.χ. το p300) ή θετικά την ενεργότητα συγκαταστολέων (π.χ. το HDAC-1). Βέβαια το πιθανότερο είναι η δράση της σουμοϋλίωσης να επηρεάζει απευθείας την ενεργότητα του LRH-1, όπως υποδεικνύεται από τα αποτελέσματα με το LRH-1 K224R του οποίου η ενεργότητα δεν καταστέλλεται από τη δράση των PIASxα και SUMO-1. Σε περίπτωση που η σουμοϋλίωση είχε ως στόχο άλλους παράγοντες της μεταγραφής, η παρουσία των PIASxα και SUMO-1 θα επηρέαζε αρνητικά τόσο τη μεταγραφική ενεργότητα του LRH-1 WT όσο και του LRH-1 K224R. Εναλλακτικά η καταστολή που παρατηρείται στη μεταγραφή του LRH-1 λόγω της σουμοϋλίωσης μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κρατείται ανενεργό στα σωματίδια PML, μακριά από την ενεργή χρωματίνη.

Σε προηγούμενα πειράματα έχουμε διαπιστώσει ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1 εντοπίζεται αποκλειστικά στα σωματίδια PML. Με σκοπό να διευκρινιστεί αν το σουμοϋλιωμένο LRH-1 καθώς και το PML έχουν ή όχι πρόσβαση στους υποκινητές, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαδοχικής κλασματοποίησης των πυρηνικών πρωτεϊνών (He et al 1990, Reyes et al 1997). Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα C3A-HepG2 ώστε να έχουμε αποτελέσματα που αφορούν τις ενδογενείς πρωτεΐνες. Στο πρώτο στάδιο έγινε επώαση με Triton X-100 παρουσία αναστολέων των ισοπεπτιδασών και συλλέχθηκαν όλες οι διαλυτές κυτταροπλασματικές και νουκλεοπλασματικές πρωτεΐνες (nucleocytoplasm) **(Εικόνα 33)**. Πέψη με DnaseI και εκχύλιση με 0.25M ammonium sulfate απελευθερώνει τις πρωτεΐνες που συνδέονται με τη χρωματίνη (chromatin). Στη συνέχεια γίνεται εκχύλιση με 2M NaCl και οι πρωτεΐνες που μένουν αδιάλυτες συνδέονται με τον πυρηνικό σκελετό (nuclear matrix). Ίσες ποσότητες από κάθε κλάσμα αναλύθηκαν με western blot με αντισώματα κατά του LRH-1, PML, RNA pol II και Lamin B **(Εικόνα 33)**. Η RNA pol II εντοπίστηκε κυρίως στο κλάσμα της χρωματίνης και σε μικρότερη ποσότητα στο νουκλεοκυτταροπλασματικό κλάσμα, ενώ η Lamin B που είναι γνωστή δομική πρωτεΐνη του πυρηνικού σκελετού, εντοπίστηκε μόνο στο αντίστοιχα κλάσμα. Οι διάφορες γνωστές ισομορφές του PML εντοπίστηκαν στα κλάσματα που αναμενόταν για την κάθε μία. Η πρωτεΐνη των 69kD είναι κυτταροπλασματική ενώ η ισομορφή των 97kD και οι τροποποιημένες μορφές μεγαλύτερου μοριακού βάρους που αντιστοιχούν στο σουμοϋλιωμένο PML, ανιχνεύθηκαν στο κλάσμα του πυρηνικού σκελετού. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε προέκυψαν καλά χαρακτηρισμένα κλάσματα και μπορούν να βγουν ασφαλή συμπεράσματα για τον εντοπισμό του

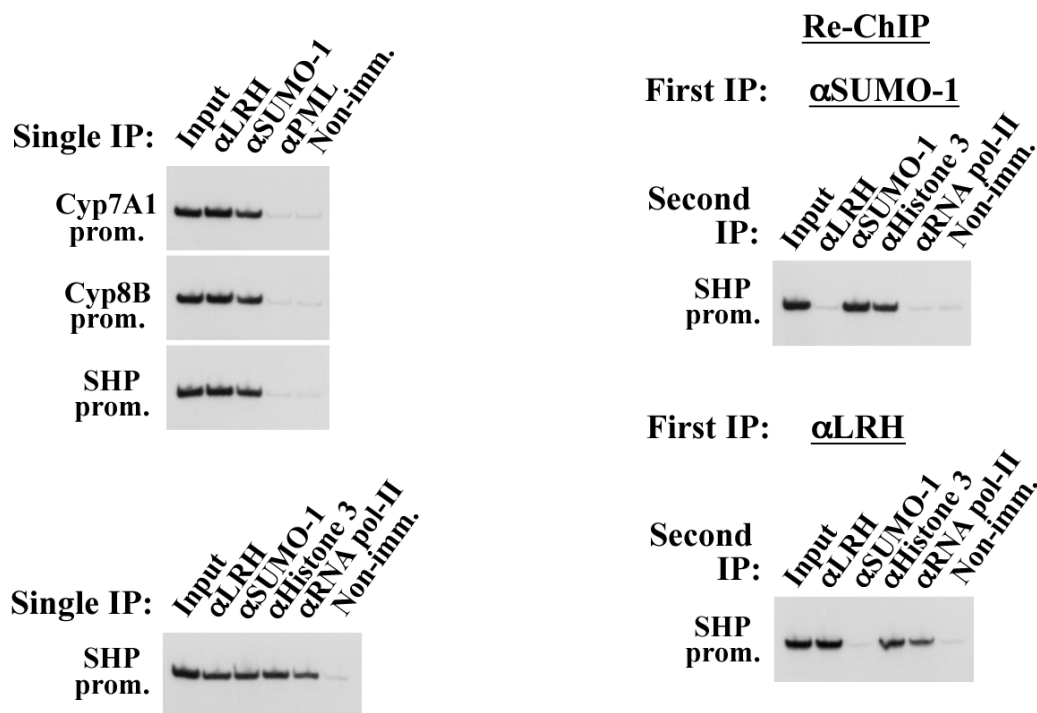
σουμοϋλιωμένου LRH-1. Το μεγαλύτερο ποσοστό του μη τροποποιημένου LRH-1 εντοπίστηκε στο κλάσμα της χρωματίνης και στο νουκλεοκυτταροπλασματικό κλάσμα (**Εικόνα 33**). Το σημαντικό είναι ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1 εντοπίστηκε αποκλειστικά στο κλάσμα του πυρηνικού σκελετού, το οποίο δεν περιέχει καθόλου χρωματίνη και RNA pol II.



**Εικόνα 33.** Κύτταρα HepG2 επώαστηκαν διαδοχικά με Triton X-100, DnaseI, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 2M NaCl και αντίστοιχα πρωτεϊνικά κλάσματα συγκεντρώθηκαν (σχήμα αριστερά). Αντίστοιχες ποσότητες των πρωτεϊνικών κλασμάτων αναλύθηκαν με western blot (δεξιά) και εξετάστηκε η κατανομή των πρωτεϊνών LRH-1, PML, RNA pol II και Lamin B, με τη χρήση των αντίστοιχων αντισωμάτων.

Τα αποτελέσματα από το πείραμα της κλασματοποίησης υποδεικνύουν ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1 δεν έχει πρόσβαση στη χρωματίνη. Με σκοπό να επιβεβαιωθεί αυτό το αποτέλεσμα καθώς και να ελεγχθεί η παρουσία ή η απουσία του σουμοϋλιωμένου LRH-1 σε μεταγραφικά ενεργά γονίδια στόχους του πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Hatzis and Talianidis 2002, Soutoglou and Talianidis 2002). Χρησιμοποιήθηκαν

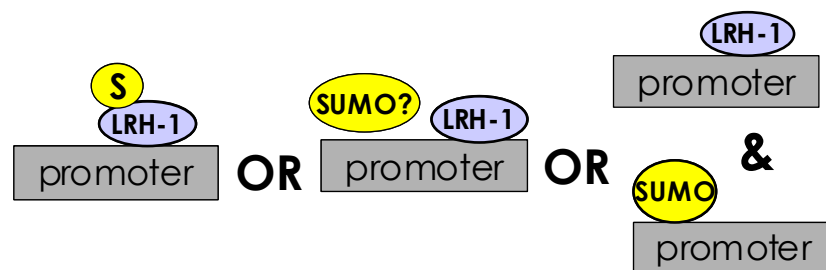
κύτταρα ήπατος ποντικού που μονιμοποιήθηκαν με φορμαλδεΰδη στο φυσικό τους περιβάλλον (Bouliás et al 2005). Η χρωματίνη θρυμματίστηκε σε κομμάτια ~500bp και υποβλήθηκε σε ανοσοκατακρήμνιση με αντισώματα  $\alpha$ -LRH-1,  $\alpha$ -SUMO-1,  $\alpha$ -PML και  $\alpha$ -H3. Στα κομμάτια του DNA που κατακρημνίστηκαν με κάθε ένα από τα παραπάνω αντισώματα ελέγξαμε με PCR αν υπήρχαν τμήματα τριών υποκινητών που ελέγχονται από το LRH-1 (Cyp7A1, Cyp8B και SHP) (Εικόνα 34).



**Εικόνα 34.** Δοκιμασίες ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έγιναν από μονιμοποιημένα κύτταρα ήπατος ποντικού με τα σημειωμένα αντισώματα. Η ανίχνευση της πρόσδεσης των διαφόρων πρωτεϊνών στους υποκινητές Cyp7A1, Cyp8B1 και SHP έγινε με ραδιενεργό PCR και με τη χρήση ειδικών εκκινήτων για αυτούς τους υποκινητές. Τα σύμπλοκα χρωματίνης-πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίστηκαν με  $\alpha$ -SUMO-1 (πάνω δεξιά) ή με  $\alpha$ -LRH-1 (κάτω δεξιά) εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια και υποβλήθηκαν σε μια σειρά από δεύτερες ανοσοκατακρημνίσεις με τα αντισώματα που σημειώνονται. Η ταυτόχρονη πρόσδεση των δύο πρωτεϊνών στον υποκινητή SHP ανιχνεύεται με ραδιενεργό PCR.

Αν με την αντίδραση PCR ανιχνεύσουμε προϊόν σημαίνει ότι η πρωτεΐνη με το αντίσωμα της οποίας κατακρημνίστηκε η χρωματίνη προσδένεται στον υποκινητή. Το LRH-1 ανιχνεύθηκε και στους τρεις υποκινητές που ελέγχθηκαν, όπως ήταν αναμενόμενο. Το PML δεν εντοπίστηκε σε κανένα από τους τρεις υποκινητές ενώ αντίθετα το SUMO-1 βρέθηκε να καταλαμβάνει και τους τρεις

**(Εικόνα 34).** Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να έχουν παραπάνω από μια εξηγήσεις όσον αφορά την πρόσδεση του SUMO στους διάφορους υποκινητές. Η ανίχνευση του SUMO σε αυτούς τους υποκινητές θα μπορούσε να σημαίνει ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1 προσδένεται σε αυτούς. Ωστόσο η ερμηνεία αυτή είναι αντίθετη με το αποτέλεσμα του πειράματος της κλασματοποίησης που έδειξε ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1 δεν εντοπίζεται στη χρωματίνη. Εναλλακτικά θα μπορούσε να εξηγηθεί με την πρόσδεση άλλων σουμοϋλιωμένων παραγόντων ή ιστονών σε αυτούς τους υποκινητές **(Εικόνα 35).**



**Εικόνα 35.** Πιθανές περιπτώσεις που εξηγούν την ταυτόχρονη πρόσδεση LRH-1 και SUMO, στους ίδιους υποκινητές. Στην τρίτη περίπτωση διαφορετικά μόρια υποκινητή καταλαμβάνονται από SUMO και LRH-1.

Προκειμένου λοιπόν να διευκρινιστεί αν το SUMO που βρέθηκε στους υποκινητές προέρχεται από το σουμοϋλιωμένο LRH-1 και αν η παρουσία του σχετίζεται με την ενεργή κατάσταση της μεταγραφής έγιναν διαδοχικές ανοσοκατακρημνίσεις χρωματίνης. Με τις διαδοχικές ανοσοκατακρημνίσεις χρωματίνης είναι δυνατό να καταλάβει κανείς αν δύο πρωτεΐνες προσδένονται την ίδια στιγμή στον ίδιο υποκινητή. Αρχικά ανοσοκατακρημνίστηκε χρωματίνη είτε με αντίσωμα  $\alpha$ -LRH-1 ή  $\alpha$ -SUMO και στη συνέχεια η χρωματίνη αφού εκλούστηκε, υποβλήθηκε σε δεύτερη ανοσοκατακρήμνιση με κάθε ένα από τα αντισώματα  $\alpha$ -SUMO-1,  $\alpha$ -LRH-1,  $\alpha$ -H3 και  $\alpha$ -RNA pol II **(Εικόνα 34)**. Εξετάσαμε ποιοι παράγοντες καταλαμβάνουν ταυτόχρονα τον υποκινητή του γονιδίου SHP. Βρέθηκε ότι όταν ένας πληθυσμός υποκινητών SHP καταλαμβάνεται από SUMO, τόσο το LRH-1 όσο και η RNA pol II δεν προσδένονται. Αντίθετα υπάρχει ένας πληθυσμός υποκινητών SHP που καταλαμβάνεται από LRH-1, RNA pol II και H3 αλλά δεν προσδένει SUMO **(Εικόνα 35)**. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1 δε βρίσκεται πάνω στους υποκινητές, σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι μεταγραφικά ενεργοί υποκινητές, που χαρακτηρίζονται από

την παρουσία της RNA pol II και LRH-1, δε φέρουν SUMO. Ωστόσο υπάρχει ένα ποσοστό υποκινητών SHP που τη συγκεκριμένη στιγμή της χημικής διασύνδεσης είναι ανενεργοί και οι οποίοι δεν έχουν RNA pol II, αλλά έχουν προσδέσει σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες, ιστόνες ή καταστολείς. Με τα πειράματα της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που ουσιαστικά μπορούμε να «φωτογραφίζουμε» τους παράγοντες που καταλαμβάνουν ένα συγκεκριμένο υποκινητή σε μια συγκεκριμένη στιγμή βγαίνει το συμπέρασμα ότι υπάρχουν δύο πληθυσμοί υποκινητών στον ιστό. Αυτοί μπορούν να βρίσκονται είτε σε διαφορετικά αλληλόμορφα ή σε διαφορετικά κύτταρα κάθε δεδομένη στιγμή. Ο ένας πληθυσμός είναι μεταγραφικά ενεργός και για το παράδειγμα του υποκινητή του SHP, καταλαμβάνεται από μη σουμοϋλιωμένο LRH-1 και RNA pol II. Ο δεύτερος πληθυσμός που είναι μεταγραφικά ανενεργός καταλαμβάνεται από μη ταυτοποιημένες σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες, που μπορεί να είναι ιστόνες καθώς και καταστολείς ή συγκαταστολείς.

## Συζήτηση

Το LRH-1 (Liver Receptor Homologue 1) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Προσδένεται στο DNA ως μονομερές και δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιο μόριο ως απαραίτητος συνδέτης για τη δράση του ως μεταγραφικού ενεργοποιητή. Έχει διπλό ρόλο στη μεταγραφή αφού εκτός του ότι συνεργάζεται με ενεργοποιητές, αποτελεί και πλατφόρμα για την πρόσδεση και τη δράση συγκαταστολέων. Εκφράζεται στο κοιλιακό ενδόδερμα κατά τα εμβρυϊκά στάδια και είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και την οργανογένεση. Στους ενήλικες ρυθμίζει την έκφραση σημαντικών ενζύμων για την ομοιόσταση της χοληστερόλης και των χολικών οξέων στο ήπαρ (Fayard et al 2004). Στην εισαγωγή περιγράφηκε αναλυτικά ο ρόλος του και έγινε φανερό ότι είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής σε πολλούς διαφορετικούς τόσο αναπτυξιακούς όσο και μεταβολικούς μηχανισμούς. Είναι σημαντικό να βρεθούν και να αναλυθούν μηχανισμοί που ρυθμίζουν και τροποποιούν την ενεργότητά του.

Στην εργασία αυτή δείχθηκε ότι το LRH-1 τροποποιείται ομοιοπολικά με το πολυπεπτίδιο SUMO-1 και ότι αυτή η μετά-μεταφραστική τροποποίηση επηρεάζει σημαντικά τη δράση του. Το SUMO-1 συνδέεται στην λυσίνη K224 της ενδιάμεσης περιοχής (Hinge) που συνδέει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) και την περιοχή πρόσδεσης συνδέτη (LBD). Η τροποποίηση αυτή είναι αντιστρεπτή και το SUMO-1 απομακρύνεται με τη δράση ειδικών πρωτεασών της οικογένειας SuPr. Η προσθήκη SUMO-1 στο LRH-1 έχει αρνητική επίδραση στη μεταγραφική του ενεργότητα. Αναλύοντας το μηχανισμό αυτής της κατασταλτικής δράσης του SUMO, δείχθηκε ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1 συγκεντρώνεται στα πυρηνικά σωματίδια PML και δε βρίσκεται διάχυτο στον πυρήνα. Σε συμφωνία με το παραπάνω αποτέλεσμα δείχθηκε ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1 δεν εντοπίζεται στη χρωματίνη και δεν προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων του. Η αύξηση της ενεργότητάς του LRH-1 εξαρτάται από τη δράση της SuPr-1 που σε μοριακό επίπεδο προκαλεί την αποδέσμευσή του από τα σωματίδια PML επιτρέποντας την πρόσβασή του στη χρωματίνη.

Μια από τις λειτουργίες που έχει αποδοθεί στα σωματίδια PML είναι η συμμετοχή τους στη ρύθμιση της μεταγραφής καθώς σε αυτά εντοπίζονται πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες. Παρόλο που δεν έχει περιγραφεί κάποιος συγκεκριμένος μηχανισμός δράσης, υπάρχουν ολόένα και περισσότερα

δεδομένα που συνηγορούν σε ένα ρόλο «αποθηκευτικού χώρου» για μεταγραφικούς παράγοντες. Η σύνδεσή τους με τα σωματίδια PML φαίνεται να ρυθμίζεται από τη δυνατότητα τροποποίησής τους με SUMO. Με τον τρόπο αυτό είναι πιθανό να ελέγχεται η διαθεσιμότητα και η προσβασιμότητά πολλών μεταγραφικών παραγόντων στην ενεργή χρωματίνη. Επιπρόσθετα τα σωματίδια PML ίσως αποτελούν χώρους μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων των μεταγραφικών παραγόντων, αφού πολλά ένζυμα εντοπίζονται εκεί, καθώς και περιοχές σχηματισμού μεταγραφικών συμπλοκών, αφού η τοπική συγκέντρωσή τους είναι αυξημένη (Zhong et al 2000b).

Από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας προκύπτουν ενδιαφέροντα συμπεράσματα για τη λειτουργία των σωματίων PML ως αποθηκευτικοί χώροι. Τα πειράματα έδειξαν ότι η σύνδεση του LRH-1 με τα σωματίδια PML είναι δυναμική και εξαρτάται από τη δυνατότητά του να σουμοϋλιωθεί. Το πείραμα επώασης των κυττάρων με Triton X-100 που προκαλεί τεχνητή ελάτπωση της συγκέντρωσης όλων των πυρηνικών πρωτεϊνών αλλά και του LRH-1 που μας ενδιαφέρει, έδειξε ότι η ελάτπωση της συγκέντρωσής του, οδηγεί την αντίδραση προς τη φορά της αποσουμοϋλίωσης και απελευθέρωσης από τα σωματίδια PML. Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να προτείνουμε το εξής μοντέλο. Όταν η τοπική συγκέντρωση του LRH-1 σε μια περιοχή του νουκλεοπλάσματος ελαττωθεί τότε ενεργοποιείται το μονοπάτι αποσουμοϋλίωσης στα γειτονικά σωματίδια PML. Συνέπεια της απομάκρυνσης του SUMO από το LRH-1 είναι η απελευθέρωσή του από τα σωματίδια PML και η διάχυσή του στο νουκλεόπλασμα και στην ενεργή χρωματίνη. Τα ένζυμα του μονοπατιού της σουμοϋλίωσης και αποσουμοϋλίωσης που εντοπίζονται στα σωματίδια PML, ενδεχομένως να έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη παροχή του LRH-1 προς τις περιοχές της ενεργής μεταγραφής. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης αυτών των πρωτεασών που απομακρύνουν το SUMO σε απόκριση της ελάτπωσης της συγκέντρωσης των μεταγραφικών παραγόντων δεν είναι γνωστός. Ωστόσο πειράματα αυτής της εργασίας έδειξαν ότι οι πρωτεάσες έχουν βασικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της ισορροπίας ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς του μεταγραφικού παράγοντα LRH-1, τον έναν που είναι σουμοϋλιωμένος και βρίσκεται στα σωματίδια PML και τον άλλο που είναι αποσουμοϋλιωμένος και ελεύθερος στο πυρηνόπλασμα. Με αυτό τον τρόπο η σουμοϋλίωση και η στόχευση των μεταγραφικών παραγόντων στα σωματίδια PML φαίνεται να ρυθμίζει την νουκλεοπλασματική τους συγκέντρωση και κατ' επέκταση τη διαθεσιμότητά τους στους υποκινητές. Η ρύθμιση της συγκέντρωσης του LRH-1

μέσω του μονοπατιού της σουμουλίωσης πρέπει οπωσδήποτε να γίνεται σε συντονισμό και συνδυασμό με τους ρυθμούς παραγωγής και αποικοδόμησής του.

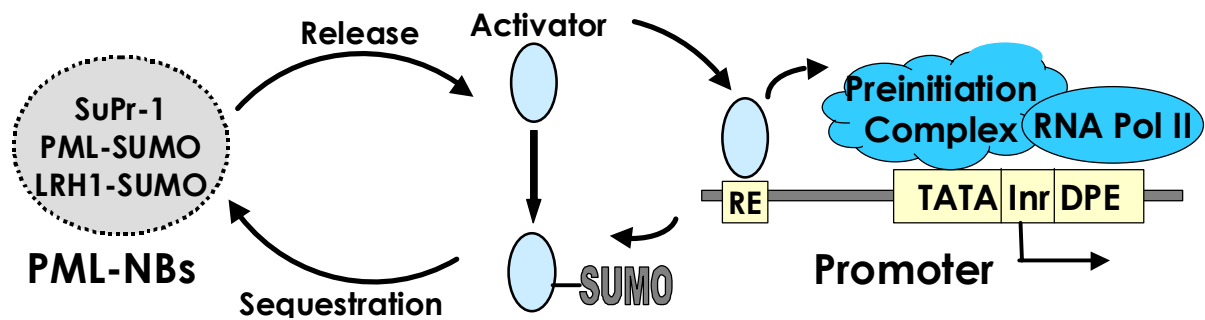
Επιπρόσθετα το πείραμα FRAP δείχνει ότι το σουμουλιωμένο LRH-1 που συγκεντρώνεται στα σωμάτια PML βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία με το μη τροποποιημένο νουκλεοπλασματικό κλάσμα. Το πείραμα επώασης με Triton X-100 έδειξε ότι η κίνηση αυτή συνοδεύεται από αποσουμοϋλίωση-σουμοϋλίωση. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, με πείραμα FRAP δείχθηκε ότι το SUMO (ελεύθερο SUMO ή σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες) συνδέεται σταθερά με τα σωμάτια. Συνολικά με αυτά τα πειράματα αποδεικνύεται η σχέση της σουμοϋλίωσης με τη διατήρηση του μεταγραφικού παράγοντα στα σωμάτια PML και η ανάγκη της απομάκρυνσης του SUMO για την απελευθέρωσή του.

Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη PML σουμοϋλιώνεται και η τροποποίηση αυτή είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των πυρηνικών σωματίων (Best et al 2002, Duprez et al 1999, Muller 1998). Τα σωμάτια PML δεν σχηματίζονται όταν στα κύτταρα εκφράζεται πρωτεΐνη PML που δε μπορεί να σουμοϋλιωθεί, δηλαδή όταν οι λυσίνες που τροποποιούνται είναι μεταλλαγμένες ή όταν υπερεκφράζεται η πρωτεάση που απομακρύνει το SUMO καθώς και όταν το SUMO-1 καταστρέφεται με μετά-μεταγραφική αποσιώπηση. Τα πειράματα έδειξαν ότι σε αυτές τις περιπτώσεις η πρωτεΐνη PML σχηματίζει μεγάλα συσσωματώματα που έχουν διαφορετικό χαρακτήρα από τα πυρηνικά σωμάτια PML, αφού συγκεντρώνουν ένα μεγάλο ποσοστό της RNA pol II. Αυτά τα συσσωματώματα του PML ενδεχομένως να αποτελούν θέσεις ενεργούς μεταγραφής αλλά αυτό μένει να διερευνηθεί περαιτέρω. Ωστόσο ο μηχανισμός ενεργοποίησης του LRH-1 εξαιτίας της δράσης της SuPr-1 δεν περιλαμβάνει μετατόπισή του σε αυτά τα συσσωματώματα. Απλώς η SuPr-1 φαίνεται να αυξάνει τον πληθυσμό του LRH-1 που είναι ελεύθερος να αλληλεπιδράσει με τους υποκινητές των γονιδίων-στόχων του. Η δυνατότητα του PML να σχηματίζει διαφορετικού τύπου σωματίδια μέσα στον πυρήνα σε απόκριση διαφορετικών σηματοδοτικών μηχανισμών, δείχνει πόσο δυναμικοί είναι οι διάφοροι σχηματισμοί στο περιβάλλον του πυρήνα όσον αφορά την τοποθέτηση και τη λειτουργία τους. Με αυτή την παρατήρηση της πλαστικότητας των σωματίων PML συμφωνεί και μια πρόσφατη εργασία που δείχνει το PML να συγκεντρώνεται στους πυρηνίσκους, αποκρινόμενο σε στρεσογόνο σήμα (Bernardi et al 2004).



## Nuclear Matrix

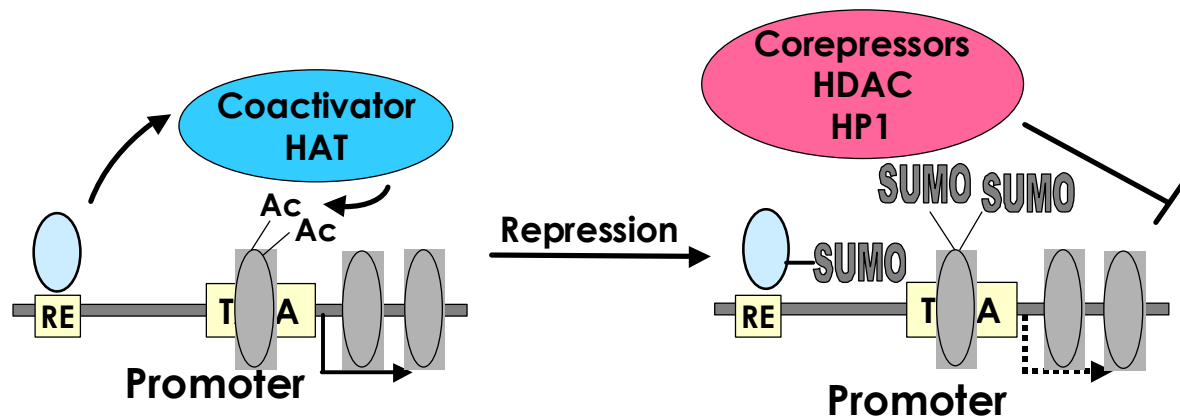
## Active Genomic Loci



**Εικόνα 36.** Μοντέλο δράσης των σωμάτων PML ως αποθηκευτικοί χώροι για τους μεταγραφικούς παράγοντες που σουμοϋλιώνονται και κρατούνται εκεί μακριά από τους μεταγραφικά ενεργούς υποκινητές. Η απομάκρυνση του SUMO απελευθερώνει τους ενεργοποιητές οι οποίοι προσδένονται στους «γειτονικούς» υποκινητές.

Ολοένα και αυξάνει ο αριθμός των αναφορών που δείχνουν διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες να τροποποιούνται με SUMO. Η τροποποίηση αυτή έχει συνήθως αρνητική επίδραση στη μεταγραφική λειτουργία τους (Seeler and Dejean 2003). Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για το μηχανισμό επίδρασης της σουμοϋλίωσης στη μεταγραφή. Είναι πιθανό να ανταγωνίζεται άλλες τροποποιήσεις, όπως είναι η ακετυλίωση και η μεθυλίωση που μπορεί να συμβαίνουν στα ίδια κατάλοιπα λυσίνης, και να έχουν αντίθετο αποτέλεσμα στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα. Επιπρόσθετα, μπορεί η προσθήκη του πεπτιδίου SUMO να διαφοροποιεί την επιφάνεια και την ικανότητα αλληλεπίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα με το DNA, τη βασική μεταγραφική μηχανή και τα μεταγραφικά σύμπλοκα (**Εικόνα 37**). Εναλλακτικά η προσθήκη του SUMO μπορεί να οδηγεί το μεταγραφικό παράγοντα στα σώματα PML, μακριά από τον υποκινητή και τις μεταγραφικά ενεργές χρωματινικές περιοχές (**Εικόνα 36**). Οι παραπάνω προτεινόμενοι μηχανισμοί για τον τρόπο δράσης της σουμοϋλίωσης στη μεταγραφή δεν αποκλείουν αναγκαστικά ο ένας τον άλλο. Η σουμοϋλίωση μπορεί να επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα σε διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες, για παράδειγμα σε άλλους να ευνοεί τις αλληλεπιδράσεις με σύμπλοκα συγκαταστολέων πάνω στους υποκινητές, ενώ άλλους να τους κρατά ανενεργούς στα σώματα PML. Σε αυτό το συμπέρασμα οδηγούν τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης από τα ηπατοκύτταρα. Σε γνωστούς υποκινητές που ελέγχονται από το LRH-1 ανιχνεύθηκαν τόσο SUMO-1 όσο και LRH-1, αλλά ποτέ ταυτόχρονα, στον ίδιο

υποκινητή και την ίδια στιγμή. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι κάθε συγκεκριμένη στιγμή υπάρχουν δύο πληθυσμοί υποκινητών που μπορεί να βρίσκονται σε διαφορετικά αλληλόμορφα ή ηπατοκύτταρα. Οι υποκινητές που είναι μεταγραφικά ενεργοί φέρουν RNA pol II και μη σουμοϋλιωμένο LRH-1, ενώ εκείνοι που είναι ανενεργοί δε φέρουν RNA pol II και LRH-1, αλλά έχουν SUMO.



**Εικόνα 37.** Μοντέλο δράσης των σουμοϋλιωμένων μεταγραφικών παραγόντων και ιστονών στη μεταγραφική καταστολή με την στρατολόγηση συμπλόκων συγκαταστολέων.

Η παρουσία του SUMO στους μεταγραφικά ανενεργούς υποκινητές δείχνει ότι αυτό έχει κάποιο διαφορετικό ρόλο, ανεξάρτητο από το LRH-1 (**Εικόνα 37**). Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με την εργασία που δείχνει ότι οι ιστόνη H4, και σε μικρότερο βαθμό οι ιστόνες H2A, H2B και H3 σουμοϋλιώνονται σε συνθήκες καταστολής, τουλάχιστον σε υποκινητές που εισάγονται στα κύτταρα με παροδική διαμόλυνση, και στρατολογούν HDAC-1 και HP-1 (Shiio and Eisenman 2003). Επίσης υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι σε εκτοπικούς υποκινητές η σουμοϋλίωση, για παράδειγμα του μεταγραφικού παράγοντα Elk-1 στρατολογεί συγκαταστολείς, όπως είναι η HDAC-1, αποτρέποντας το σχηματισμό του προεναρκτηρίου συμπλόκου (Yang and Sharrocks 2004). Τόσο τα δικά μας αποτελέσματα, όσο και της προαναφερθείσας εργασίας δεν αποτελούν άμεσες αποδείξεις για την ύπαρξη σουμοϋλιωμένων νουκλεοσωμάτων στους υποκινητές. Ωστόσο είναι ξεκάθαρο ότι σε μη ενεργούς υποκινητές προσδένονται σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες, ιστόνες ή μεταγραφικοί παράγοντες. Η μεταγραφικά ανενεργή χρωματίνη δε συνδέεται με τα σωμάτια PML, όπως υποδεικνύει η απουσία σήματος από την ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με  $\alpha$ -PML.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι το σουμοϋλιωμένο LRH-1 συγκρατείται μακριά από την ενεργή χρωματίνη και αποθηκεύεται στα σωματίδια PML. Η τροποποίηση αυτή είναι μια πολύ δυναμική διαδικασία και η μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα από την ενεργή χρωματίνη στα σωματίδια PML και το αντίστροφο αποτελεί μηχανισμό ρύθμισης της διαθεσιμότητας του στους υποκινητές (**Εικόνα 36**). Σε αυτό τον μηχανισμό λειτουργίας των σωματίων PML συνηγορούν επίσης τα αποτελέσματα από άλλες αναφορές που περιγράφουν ότι τα σωματίδια PML δεν περιέχουν ενεργή χρωματίνη, ωστόσο εντοπίζονται σε γεινίαση με ενεργά μεταγραφικές γενωμικές περιοχές και νεοσυντιθέμενο mRNA (Wang et al 2004). Με βάση όλες αυτές τις παρατηρήσεις προτείνεται ότι η σουμοϋλίωση αποτελεί ένα λειτουργικό μηχανισμό αποθήκευσης των μεταγραφικών παραγόντων, κοντά στις θέσεις μεταγραφής. Η ρυθμιζόμενη μετακίνηση των μεταγραφικών παραγόντων ανάμεσα σε αυτές τις δύο διαφορετικές τοποθεσίες του πυρήνα ενδέχεται να αποτελεί ένα σημαντικό, επιπλέον επίπεδο ρύθμισης της μεταγραφής.

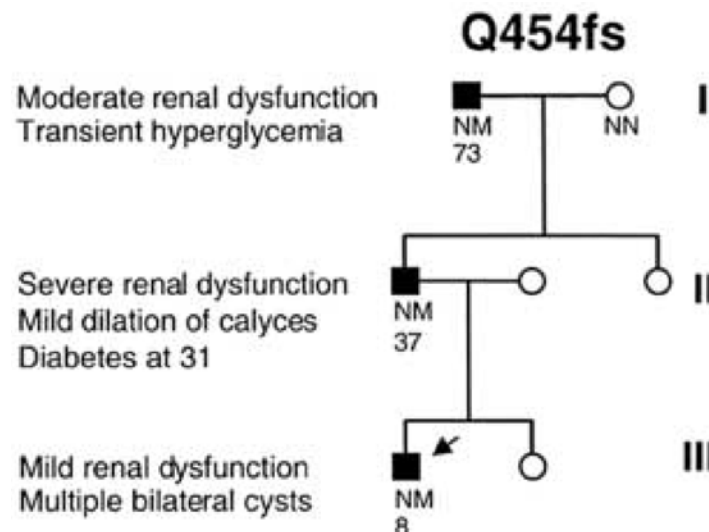
# **Κεφάλαιο Β**

**“Ο μοριακός μηχανισμός  
της ενεργοποίησης της  
μεταγραφής από τον  
HNF1β.”**

## Αποτελέσματα

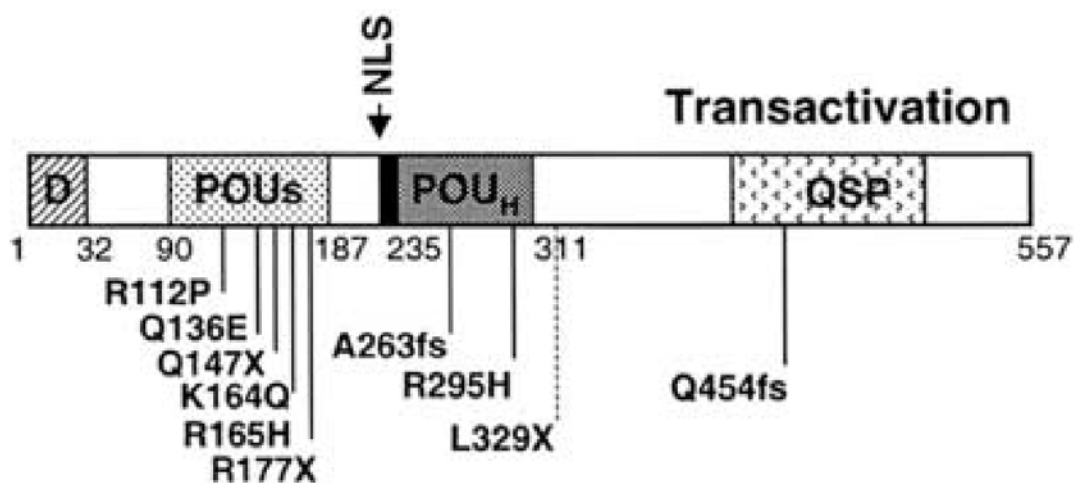
### Πρόλογος

Ο κληρονομικός σακχαρώδης διαβήτης MODY (maturity onset diabetes of the young) οφείλεται σε αυτοσωμικές επικρατούσες μεταλλάξεις γονιδίων που εκφράζονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από τη μη φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης παρουσία γλυκόζης και παρουσιάζεται σε άτομα νεαρής ηλικίας. Οι μεταλλάξεις εντοπίζονται σε πέντε γονίδια που κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF4α, HNF1α, IPF1/PDX1, NeuroD και HNF1β/vHNF1. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες σε φυσιολογικές συνθήκες δημιουργούν ένα ρυθμιστικό δίκτυο στα β κύτταρα του παγκρέατος που είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό της γλυκόζης και την έκκριση ινσουλίνης. Μεταλλάξεις στο γονίδιο HNF1β προκαλούν MODY5 καθώς και ανωμαλίες στην ανάπτυξη των νεφρών, του παγκρέατος και του γενετικού συστήματος (**Εικόνα 38**). Η κλινική εικόνα είναι νεφρική ανεπάρκεια και υπεργλυκαιμία, χωρίς να είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης του HNF1β που οδηγεί σε αυτό το φαινότυπο (Odom et al 2004, Servitja and Ferrer 2004).



**Εικόνα 38.** Γενεαλογικό δέντρο μιας γαλλικής οικογένειας από μέλος της οποίας απομονώθηκε η μεταλλαγή Q454fs του HNF1β (δείχνεται με βέλος). Σημειώνονται τα άτομα που ασθένησαν καθώς και τα συμπτώματα που παρουσίασαν.

Το HNF1β φυσιολογικά εκφράζεται στο κοιλιακό ενδόδερμα σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια καθώς και κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης του ήπατος, των νεφρών, του παγκρέατος και των πνευμόνων. Η σημασία του HNF1β φαίνεται επίσης από το θνησιγόνο εμβρυϊκό φαινότυπο που προκαλεί η απομάκρυνση του γονιδίου από το γένωμα. Τα HNF1β<sup>-/-</sup> ζώα πεθαίνουν στη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης καθώς ο παράγοντας είναι απαραίτητος για τη διαφοροποίηση του σπλαχνικού (visceral) ενδοδέρματος και την έκφραση παραγόντων όπως είναι ο HNF4a1, ο HNF1a και ο HNF3γ (Barbacci et al 1999, Coffinier et al 1999, Cereghini 1996, Cereghini et al 1992).



**Εικόνα 39.** Στο σχήμα φαίνονται οι δομικές περιοχές του HNF1β καθώς και οι μεταλλάξεις που μελετήθηκαν συνολικά στη δημοσίευση μέρος της οποίας ήταν η παρούσα εργασία.

Το HNF1β διαθέτει μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που παρουσιάζει ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή του HNF1a. Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζουν τα ίδια στοιχεία πρόσδεσης στο DNA, μέσω ενός homeodomain μοτίβου πρόσδεσης (POU<sub>S</sub> και POU<sub>H</sub>), αλλά παρουσιάζουν διαφορετική ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής. Επίσης υπάρχει μια περιοχή διμερισμού στο πιο αμινοτελικό τους άκρο η οποία είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ομοδιμερών, ενδεχομένως και ετεροδιμερών ανάμεσα στους παράγοντες HNF1a και HNF1β. Στο καρβοξυτελικό άκρο υπάρχει μια λιγότερη συντηρημένη περιοχή που λειτουργεί ως ενεργοποιητική (**Εικόνα 39**).

Ο HNF1a, που ανήκει στην ίδια οικογένεια με τον HNF1β, επίσης αποτελείται από τρεις λειτουργικά διακριτές περιοχές: την αμινοτελική περιοχή, η

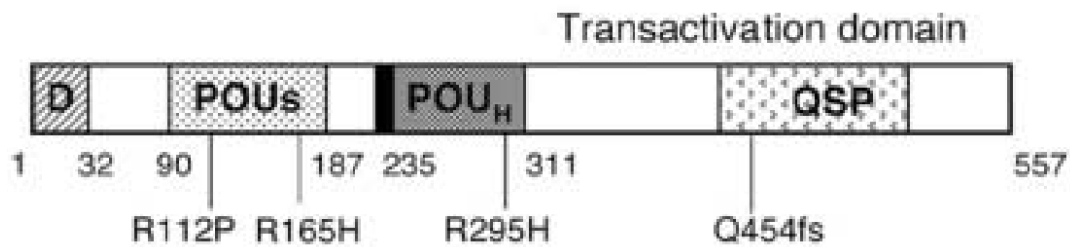
οποία είναι υπεύθυνη για το διμερισμό του μορίου, την περιοχή homeobox, με την οποία προσδένεται στο DNA, και την καρβοξυτελική περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική του ενεργότητα (Cereghini, 1996). Οι καρβοξυτελική περιοχή του μορίου αλληλεπιδρά με διάφορους συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως οι P/CAF, SRC1 και RAC3, ενώ η αμινοτελική περιοχή αλληλεπιδρά με τον συνενεργοποιητή CBP. Η συνεργατική πρόσδεση των ακετυλοτρανσφερασών CBP και P/CAF στον HNF1α και η συνδυαστική τους δράση είναι σημαντική για τη μεταγραφική του ενεργότητα. (Soutoglou et al 2000, Soutoglou et al 2001). Αντίθετα με το HNF1α για το οποίο είναι πολλά γνωστά όσον αφορά τη δομή, τη λειτουργία και τις αλληλεπιδράσεις του, το HNF1β δεν είναι καλά χαρακτηρισμένο και εξάγονται συμπεράσματα κυρίως λόγω της ομολογίας του με το HNF1α (Chi et al 2002).

Με σκοπό να αναλυθεί η λειτουργία του HNF1β ως μεταγραφικού ενεργοποιητή χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένες μεταλλαγές του γονιδίου που εντοπίζονται σε διάφορα σημεία της πρωτεΐνης και προκαλούν MODY5 (**Εικόνα 39**). Η μελέτη αυτή έγινε σε συνεργασία με το εργαστήριο της Dr S. Cereghini. Στο εργαστήριο αυτό αναλύθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός, η ικανότητα πρόσδεσης στο DNA και η ενεργότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών HNF1β καθώς και η δυνατότητα παρεμπόδισης της ενεργότητας του φυσιολογικού αλληλομόρφου. Στο εργαστήριό μας ελέγξαμε τη φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση των μεταλλαγμένων μορίων με τους συνενεργοποιητές CBP και P/CAF καθώς και με την απακετυλάση ιστονών HDAC1.

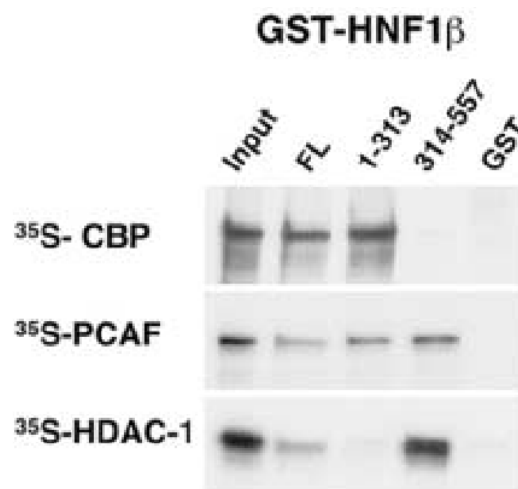
## **Αλληλεπίδραση του HNF1β με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς της μεταγραφής**

Οι συνενεργοποιητές που έχουν ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς ενεργοποιητές που προσδένονται στο DNA. Η στρατολόγηση των ενζύμων στον υποκινητή επιφέρει αλλαγές στη νουκλεοσωμική του δομή και επηρεάζει την ικανότητα των ενεργοποιητών να σχηματίσουν ενεργά προεναρκτήρια σύμπλοκα της μεταγραφής. Αντίθετα η αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων με απακετυλάσες συντελεί στην καταστολή της μεταγραφής, δημιουργώντας ένα νουκλεοσωμικό περιβάλλον ακατάλληλο για την πρόσδεση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων και της RNA pol II (Lemon and Tjian 2000). Με

σκοπό να μελετήσουμε τις αλληλεπιδράσεις του HNF1β με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς, χρησιμοποιήσαμε ως εργαλείο τα μεταλλάγματα εκείνα του HNF1β που έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται στο DNA αλλά παρουσιάζουν πρόβλημα στη μεταγραφική ενεργοποίηση σε δοκιμασίες παροδικής διαμόλυνσης (**Εικόνα 40**). Καθώς τα μεταλλάγματα αυτά διατηρούν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA είναι πιθανό να παρουσιάζουν ελαττωματική αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές ή συγκαταστολείς.



**Εικόνα 40.** Στο σχήμα σημειώνονται τα φυσικά μεταλλάγματα MODY5 του HNF1β που μελετήθηκαν ως προς τις αλληλεπιδράσεις τους με τους συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς.

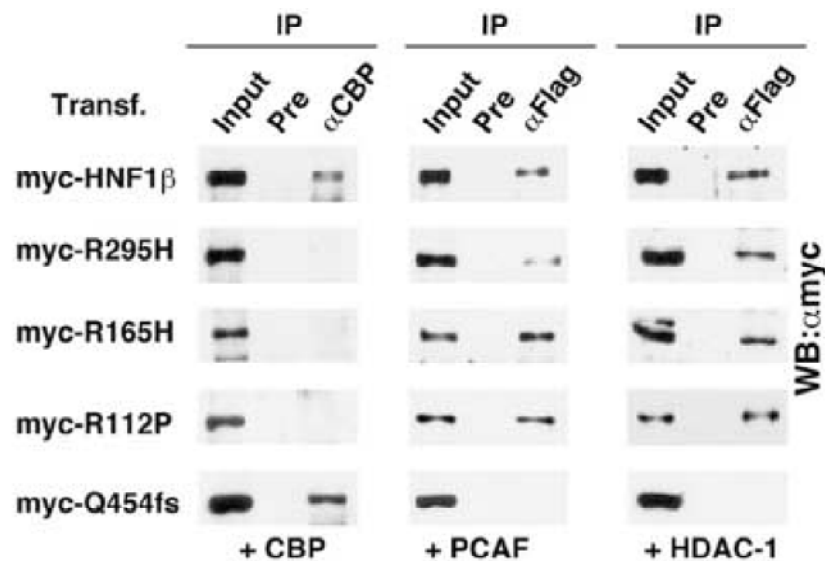


**Εικόνα 41.** Αλληλεπίδραση *in vitro* των βακτηριακά εκφρασμένων και καθαρισμένων υβριδικών πρωτεϊνών GST-HNF1β (full length), GST-HNF1β (1-313) και GST-HNF1β (314-557) με τις ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες <sup>35</sup>S-CBP, <sup>35</sup>S-PCAF και <sup>35</sup>S-HDAC-1. Η ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων έγινε μετά από ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία.

Αρχικά ελέγχθηκε αν η φυσιολογική πρωτεΐνη αλληλεπιδρά απευθείας με τους συνενεργοποιητές CBP και PCAF και τον συγκαταστολέα HDAC1. Με



πειράματα *in vitro* GST pull-down ελέγχθηκε αν το GST-HNF1β καθώς και τα τμήματα του HNF1β GST-HNF1β(1-313) και GST-HNF1β(314-557) αλληλεπιδρούν με ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες CBP, PCAF και HDAC-1 (**Εικόνα 41**). Πράγματι φάνηκε ότι το HNF1β αλληλεπιδρά και με τους τρεις αυτούς παράγοντες και πιο συγκεκριμένα το CBP αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο, το HDAC1 με το καρβοξυτελικό άκρο ενώ το PCAF το ίδιο καλά και με τις δύο περιοχές της πρωτεΐνης.



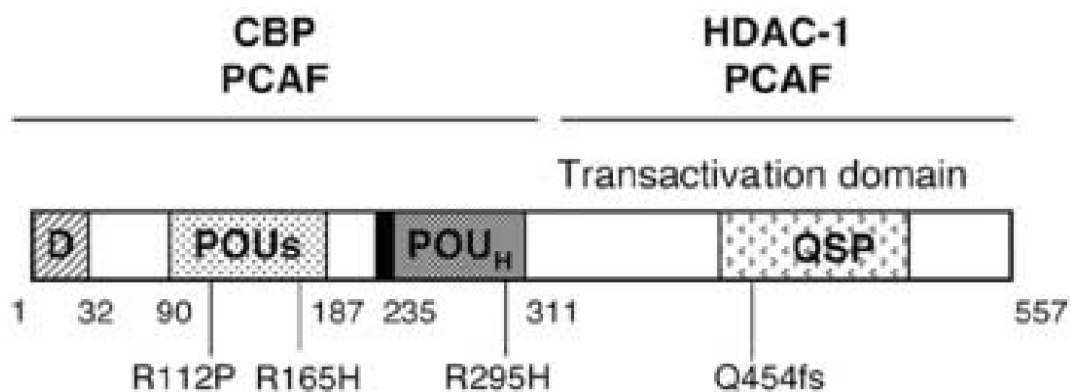
	CBP	PCAF	HDAC-1
R112P	-	+	+
R165H	-	+	+
R295H	-	+	+
Q454fs	+	-	-

**Εικόνα 42.** Κύτταρα Cos-1 διαμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης των myc-HNF1β (WT και σημειακές μεταλλαγές αυτού), CBP, FLAG-PCAF και FLAG-HDAC-1 όπως σημειώνονται αριστερά και κάτω από την εικόνα. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν ανοσοκατακρημνίστηκαν με ορρό ελέγχου (pre) ή με τα αντισώματα α-CBP ή α-FLAG. Οι αλληλεπιδράσεις ελέγχθηκαν με western blot με αντίσωμα α-myc. Στον πίνακα συνοψίζονται τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών HNF1β με τα CBP, PCAF και HDAC-1.

Στη συνέχεια, στο ετερόλογο σύστημα των κυττάρων Cos-1 εκφράστηκε το φυσιολογικό myc-HNF1β με κάθε έναν από τους τρεις παράγοντες CBP, FLAG-PCAF και FLAG-HDAC-1 με σκοπό να ελεγχθούν οι αλληλεπιδράσεις *in*

νίνο. Πράγματι με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και western blot επιβεβαιώθηκε ότι το HNF1β αλληλεπιδρά και με τους τρεις παραπάνω παράγοντες (**Εικόνα 42**). Με παρόμοια πειράματα μελετήθηκε η δυνατότητα αλληλεπίδρασης τεσσάρων μεταλλαγμένων HNF1β με τους CBP, FLAG-PCAF και FLAG-HDAC-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τρεις σημειακές μεταλλαγές (R295H, R165H και R112P) που εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο αλληλεπιδρούν με τους PCAF και HDAC-1 αλλά όχι με το CBP. Αντίθετα η μεταλλαγή αλλαγής πλαισίου Q454fs που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο αλληλεπιδρά με το CBP αλλά όχι με το PCAF και το HDAC-1 (**Εικόνα 42**).

Τα προβλήματα που παρουσιάζουν τα διάφορα μεταλλάγματα στις αλληλεπιδράσεις τους συμφωνούν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων *in vitro*, καθώς μεταλλαγές του HNF1β στο αμινοτελικό άκρο επηρεάζουν την αλληλεπίδραση με CBP και αντίστοιχα η μεταλλαγή στο καρβοξυτελικό άκρο επηρεάζει αρνητικά την αλληλεπίδραση με HDAC-1. Το PCAF, που δείχθηκε να αλληλεπιδρά *in vitro* και με τις δύο περιοχές του HNF1β, δεν είναι ικανό να αλληλεπιδράσει με το Q454fs. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί η μεταλλαγή αλλαγής πλαισίου στο καρβοξυτελικό τμήμα επηρεάζει τη διαμόρφωση ολόκληρης της πρωτεΐνης και έτσι δεν επιτρέπεται ούτε η αλληλεπίδραση του PCAF με το φυσιολογικό αμινοτελικό τμήμα (**Εικόνα 43**).



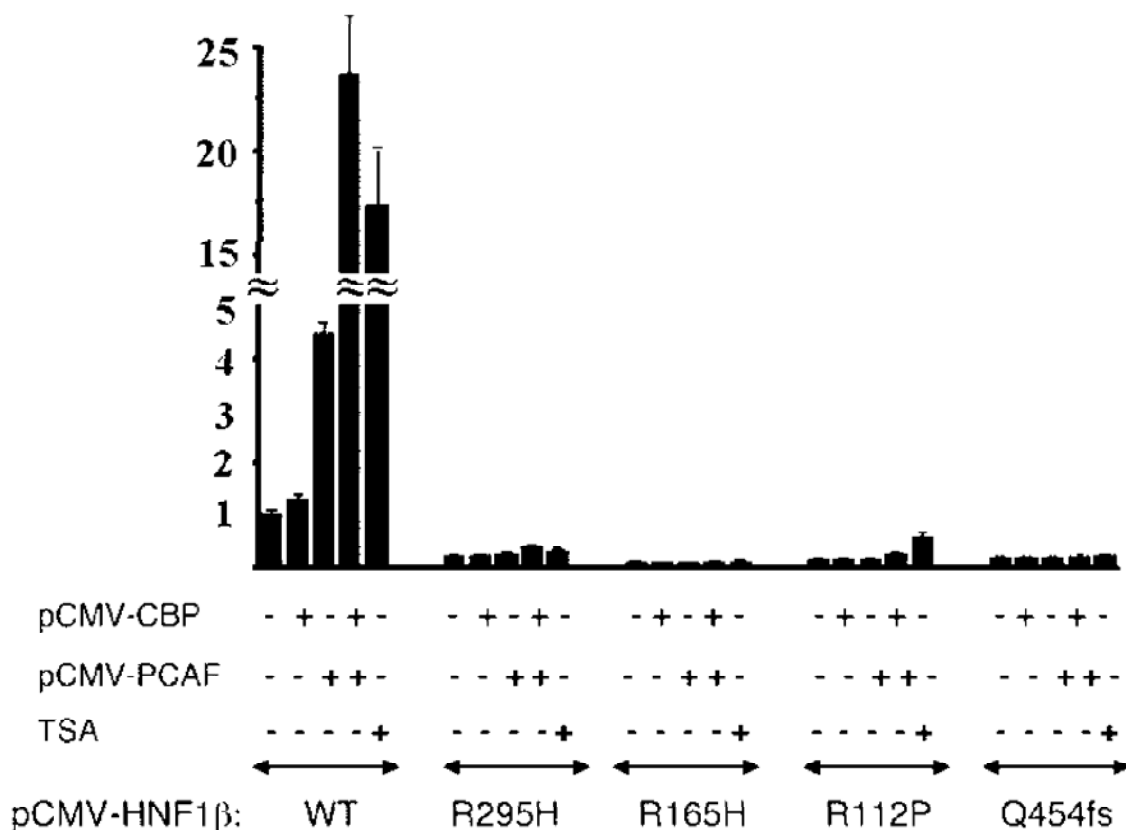
**Εικόνα 43.** Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών του HNF1β και με ποιες από αυτές αλληλεπιδρούν τα CBP, PCAF και HDAC-1, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων αλληλεπίδρασης *in vitro* και *in vivo*.

## Λειτουργικές συνέπειες των αλληλεπιδράσεων του HNF1β με τους συνενεργοποιητές και τους συγκαταστολείς

Στη συνέχεια αναλύθηκε η λειτουργική σημασία των αλληλεπιδράσεων και οι συνέπειες των μεταλλαγών του HNF1β στη μεταγραφική του ενεργότητα. Έγιναν δοκιμασίες παροδικής διαμόλυνσης σε κύτταρα NIH3T3 που δεν εκφράζουν ενδογενώς HNF1β αλλά εκφράζουν σε μικρές ποσότητες τους συνενεργοποιητές CBP και PCAF. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε μια κυτταρική σειρά NIH3T3 που έχει ενσωματωμένο στο γένωμα γονίδιο αναφοράς που ελέγχεται από τρεις θέσεις πρόσδεσης του HNF1β, το 3 x AlbPE-TK-CAT (Soutoglou et al 2000b). Το πλεονέκτημα αυτού του υποκινητή που βρίσκεται στο γένωμα είναι ότι έχει αντίστοιχη χρωματινική δομή με τους υποκινητές που βρίσκονται σε ευχρωματικές περιοχές. Η συνέκφραση του WT HNF1β με το CBP πολύ λίγο αύξησε την ενεργότητα του υποκινητή ενώ η παρουσία του PCAF αύξησε τη μεταγραφή 4.5 φορές επιπλέον. Η ταυτόχρονη έκφραση και των δύο συνενεργοποιητών οδήγησαν στην αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή από το HNF1β κατά 24 φορές. Αυτό σημαίνει ότι υψηλή ενεργοποίηση από τον HNF1β επιτυγχάνεται με τη συνεργατική δράση των CBP και PCAF. Παρομοίως η προσθήκη TSA στα κύτταρα, που είναι αναστολέας απακετυλασών οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή κατά 17 φορές, πιθανότατα με τη συνεργατική δράση των ενδογενών συνενεργοποιητών **(Εικόνα 44)**. Αυτό σημαίνει ότι η ενεργότητα που παρατηρείται με την υπερέκφραση μόνο του HNF1β αντιστοιχεί σε μία κατασταλαμμένη κατάσταση, ενδεχομένως λόγω της αλληλεπίδρασής του με την ενδογενή HDAC-1. Με τον ίδιο τρόπο ελέγχθηκαν τα μεταλλάγματα του HNF1β που έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται στο DNA. Οι ενεργότητες που μετρήθηκαν από την έκφραση των μεταλλαγών R112P, R165H, R295H και Q454fs ήταν 14, 9, 21 και 18% του φυσιολογικού HNF1β, αντίστοιχα **(Εικόνα 44)**. Η έκφραση των συνενεργοποιητών λίγο επηρέασε τη μεταγραφική ενεργότητα καθώς για να υπάρξει πλήρης ενεργοποίηση απαιτείται η συνεργασία και των δύο, που σε κάθε περίπτωση μεταλλαγής δεν είναι εφικτή. Επίσης η παρουσία του TSA δεν οδήγησε στην αποκαταστολή του υποκινητή παρόλο που κάποιες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το HDAC-1, πιθανώς γιατί δεν μπορεί να επιτευχθεί η ενεργοποίηση μέσω των συνενεργοποιητών.

Με τα πειράματα αυτά δείχθηκε ότι οι συγκεκριμένες μεταλλαγές που παρατηρούνται σε ασθενείς με MODY5, παρόλο που δεν παρουσιάζουν

πρόβλημα στην πρόσδεσή τους στους υποκινητές, δεν έχουν τη σωστή δομή ώστε να σχηματίσουν τις απαραίτητες αλληλεπιδράσεις με τους συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς. Από την ανάλυση αυτή φάνηκε επίσης ότι για την πλήρη ενεργότητα του φυσιολογικού HNF1β απαιτείται η συνεργατική δράση των CBP και PCAF και η αποκαταστολή από την απακετυλάση HDAC-1. Ο μηχανισμός παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με αυτόν της ενεργοποίησης από το HNF1α, παρόλο που στο καρβοξυτελικό τμήμα οι δύο ενεργοποιητές έχουν σημαντικές διαφορές.



**Εικόνα 44.** Κύτταρα NIH3T3 που φέρουν ενσωματωμένο στο γένωμά τους γονίδιο αναφοράς που ρυθμίζεται από θέσεις πρόσδεσης του HNF1β, διαμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης CBP, PCAF, HNF1β (WT και mutants) και επώαστηκαν με TSA με τους συνδυασμούς που σημειώνονται. Η ενεργότητα του υποκινητή υπολογίζεται ως ποσοστό αύξησης σε σχέση με την ενεργότητα που μετρείται όταν εκφράζεται μόνο το HNF1β (WT).

## Συζήτηση

Τα παραπάνω ερωτήματα και αποτελέσματα αποτέλεσαν τμήμα μιας εργασίας με αντικείμενο μελέτης τα λειτουργικά προβλήματα μεταλλαγών του HNF1β που ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς με MODY5. Μελετήθηκαν πρωτεΐνες HNF1β που παρουσιάζουν σημειακές μεταλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA καθώς και πρωτεΐνες από τις οποίες λείπουν ολόκληρες λειτουργικές περιοχές λόγω μεταλλαγών αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης και πρόωρης λήξης της μετάφρασης. Στη συνέχεια θα περιγραφούν τα λειτουργικά προβλήματα των μεταλλαγών που μελετήθηκαν συνολικά σε αυτή την εργασία, τόσο από το εργαστήριο της S. Cereghini όσο και από το δικό μας και θα συζητηθούν τα συμπεράσματα που εξάγονται για τη λειτουργία του HNF1β ως μεταγραφικού ενεργοποιητή (Barbacci et al 2004).

Από τους συνεργάτες μας μελετήθηκαν αρχικά οι μεταλλαγές Q147X και R177X που οδηγούν στο σχηματισμό πεπτιδίου HNF1β που περιλαμβάνει την περιοχή διμερισμού καθώς και το τμήμα POU<sub>5</sub> της περιοχής πρόσδεσης στο DNA (**Εικόνα 39**). Αυτές οι ελλειπτικές πρωτεΐνες δεν έχουν σωστό πυρηνικό εντοπισμό και παραμένουν στο κυτταρόπλασμα όταν υπερεκφράζονται εκτοπικά. Σε πειράματα *in vitro* τα πεπτίδια αυτά διμερίζονται με τη πρωτεΐνη WT, ωστόσο δεν είναι ικανά να παρεμποδίσουν τον πυρηνικό εντοπισμό της. Τα ετεροδιμερή R177X/HNF1β είναι ικανά να προσδεθούν στο DNA, σε αντίθεση με τα Q147X/HNF1β που σημαίνει ότι η γλουταμίνη Q147 είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στο DNA. Ωστόσο με αυτά τα πειράματα δεν βγήκαν συμπεράσματα για το λόγο που οι συγκεκριμένες μεταλλαγές δημιουργούν το φαινότυπο της ασθένειας καθώς στις δοκιμασίες παροδικής διαμόλυνσης είχαν ήπιες αρνητικές συνέπειες στη μεταγραφή. Το πιθανότερο είναι ότι τα μικρού μήκους mRNA που παράγονται να υπόκεινται σε κατάτμηση πριν καν συντεθεί πρωτεΐνη λόγω του ότι λειτουργεί ένας μηχανισμός αναγνώρισης ατελών mRNA που αναγνωρίζει ότι λείπει η ένωση των δύο τελευταίων εξονίων (nonsense mediated mRNA decay) και το πρόβλημα που δημιουργείται *in vivo* είναι η απλοανεπάρκεια του WT HNF1β (Le Hir et al 2003). Αυτή η υπόθεση δεν μπορεί προς το παρόν να ελεγχθεί διότι δεν υπάρχουν διαθέσιμοι ιστοί από ασθενείς.

Οι υπόλοιπες μεταλλαγές που ελέγχθηκαν από το εργαστήριο της S. Cereghini είναι οι πέντε σημειακές μεταλλαγές Q136E, K164Q, R112P, R165H και R295H στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA και η μεταλλαγή αλλαγής πλαισίου

Q454fs στο καρβοξυτελικό άκρο (**Εικόνα 39**). Ο μηχανισμός καταστροφής ατελών mRNA δεν αποτελεί το λειτουργικό πρόβλημα των συγκεκριμένων μεταλλαγών γιατί φτιάχνονται ολόκληρες πρωτεΐνες HNF1β. Οι πέντε σημειακές μεταλλαγές είναι σε κατάλοιπα που είναι διατηρημένα στα HNF1β όλων των σπονδυλωτών και με εξαίρεση το R112 είναι συντηρημένα και στο HNF1α. Με βάση τη δομή του HNF1α οι τέσσερις από αυτές εντοπίζονται στην περιοχή POU<sub>s</sub> και είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό των σημαντικών αλληλεπιδράσεων με το DNA (Chi et al 2002). Μεταλλαγές σε αυτές ενδεχομένως να επηρεάζουν την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA. Πράγματι οι πρωτεΐνες HNF1β που φέρουν τις μεταλλαγές Q136E και K164Q δεν προσδένονται στο DNA. Αντίθετα οι μεταλλαγές R112P, R165H, R295H και Q454fs δεν παρουσιάζουν τέτοιο πρόβλημα.

Οι σημειακές αυτές μεταλλαγές παρόλο που δεν παρουσιάζουν πρόβλημα πρόσδεσης στο DNA και έχουν ακέραιη την καρβοξυτελική περιοχή που έχει ενεργοποιητικό ρόλο, έχουν μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα. Αυτό σημαίνει ότι οι σημειακές αυτές μεταλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA επηρεάζουν τη δυνατότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης του HNF1β, πιθανότατα αλλάζοντας κάποιες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που απαιτούνται για τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Αρχικά ελέγξαμε αν κάποιοι γνωστοί μεταγραφικοί ενεργοποιητές, όπως είναι το CBP και PCAF και η απακετυλάση HDAC-1, αλληλεπιδρούν με το HNF1β και ποιες περιοχές του ευθύνονται για αυτό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι τρεις παράγοντες αλληλεπιδρούν *in vivo* με το HNF1β και για τη μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα απαιτείται η συνεργατική δράση των CBP και PCAF. Οι σημειακές μεταλλαγές παρουσιάζουν πρόβλημα στην αλληλεπίδρασή τους είτε με τον ένα είτε με τον άλλο συνενεργοποιητή και έτσι εξηγείται και το πρόβλημα στη μεταγραφική ενεργοποίηση, που απαιτεί τη συνεργατική δράση και των δύο. Η ενεργότητα των μεταλλαγών αυτών δεν αυξάνεται ούτε με τη δράση του αναστολέα των απακετυλασών TSA, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της πρωτεΐνης WT. Αυτό συμβαίνει γιατί για να υπάρξει μεταγραφή εκτός από την απενεργοποίηση των απακετυλασών απαιτείται η συνεργατική δράση των συνενεργοποιητών. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι παρόλο που η αλληλεπίδραση με το DNA και η αλληλεπίδραση με CBP και PCAF γίνεται μέσω της ίδιας αμινοτελικής περιοχής του HNF1β, η πρόσδεση στο DNA δεν παρουσιάζει πρόβλημα ενώ η αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές δεν είναι δυνατή. Αυτό δείχνει ότι η

πρόσδεση στο DNA και η αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές είναι διαφορετικές λειτουργίες της ίδιας πρωτεϊνικής περιοχής.

Τα παραπάνω αποτελέσματα για το μηχανισμό ενεργοποίησης του HNF1β συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη που αφορά τη μεταγραφική ενεργοποίηση από το HNF1α και δείχνει ότι απαιτείται η συνεργατική δράση των CBP και PCAF. Το HNF1α υπόκειται σε αρνητική ρύθμιση με τη συνεργασία των συγκαταστολέων NcoR και HDAC-1. Οι δύο μεταγραφικοί ενεργοποιητές HNF1α και HNF1β, παρόλο που δεν παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία στο καρβοξυτελικό άκρο που περιλαμβάνει την ενεργοποιητική περιοχή, εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στις περιοχές αλληλεπίδρασης με τους συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς. Φαίνεται ότι χρησιμοποιούν παρόμοιο μηχανισμό μεταγραφικής ενεργοποίησης που περιλαμβάνει την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Soutoglou et al 2001).

Η παρατήρηση ότι η WT πρωτεΐνη HNF1β έχει δραματικά αυξημένη ενεργότητα παρουσία του αναστολέα των απακετυλασών ή με την υπερέκφραση των συνενεργοποιητών CBP και PCAF, δείχνει ότι το HNF1β στα κύτταρα βρίσκεται σε σύμπλοκα καταστολής. Η ενεργοποίησή του μπορεί να επιτευχθεί είτε με την απενεργοποίηση των απακετυλασών ή με τη στρατολόγηση των συνενεργοποιητών. Το γεγονός ότι το TSA αύξησε την ενεργότητα του WT HNF1β δείχνει ότι η χρήση εξειδικευμένων αναστολέων των απακετυλασών μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματική θεραπεία για κάποιους ασθενείς με MODY5, που φέρουν ένα αλληλόμορφο WT αλλά έχουν πρόβλημα λόγω απλοανεπάρκειας.

Τα πειράματα με τη μεταλλαγή αλλαγής πλαισίου Q454fs υπέδειξαν κάποιο σημαντικό ενδεχομένως ρόλο της περιοχής QSP που καταστρέφεται στην περίπτωση της μεταλλαγής. Η μεταλλαγή αυτή ενώ δεν παρουσιάζει πρόβλημα στην πρόσδεση στο DNA, δεν έχει μεταγραφική ενεργότητα. Αντίθετα με το HNF1α που διαθέτει δύο περιοχές ενεργοποίησης στο καρβοξυτελικό άκρο, το HNF1β μάλλον διαθέτει μια περιοχή ενεργοποίησης, σημαντικά κατάλοιπα της οποίας βρίσκονται στην περιοχή QSP.

Οι μεταλλαγές που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα όσον αφορά τους φαινοτύπους γεγονός που δείχνει και το ευρύ φάσμα δράσης του HNF1β κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αλλά και στην ενήλικη ζωή. Εξάλλου οι φαινότυποι των ασθενών με MODY5 έχουν εκτός από γενετικά αίτια και περιβαλλοντικά. Χρησιμοποιώντας ως εργαλεία αυτές τις φυσικές μεταλλαγές του HNF1β μελετήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν διάφορες

---

λειτουργικές περιοχές του μεταγραφικού παράγοντα. Επιπλέον εντοπίστηκαν ως λειτουργικά προβλήματα των μεταλλαγών, όχι μόνο η πρόσδεση στο DNA αλλά και η αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές.



# **Υλικά & Μέθοδοι**

## Υλικά και Μέθοδοι

### Πλασμιδιακές κατασκευές

Τα πλασμίδια pCMV-myc-LRH-1 και pEYFP-LRH-1 κατασκευάστηκαν με κλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του ανθρώπινου γονιδίου LRH-1 στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pCMV-myc (Invitrogen) και pEYFP (Clontech), αντίστοιχα. Τα πλασμίδια pMT-HA-SUMO-1, pECFP-SUMO-1, pEYFP-SUMO-1 κατασκευάστηκαν με κλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του ανθρώπινου γονιδίου SUMO-1, παραλείποντας τα 4 τελευταία κωδικόνια, στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pMT-HA, pEYFP και pECFP (Clontech), αντίστοιχα. Το πλασμίδιο pCMV-Flag-SuPr-1 κατασκευάστηκε με κλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του γονιδίου SuPr-1 στο φορέα έκφρασης pCMV-Flag. Το πλασμίδιο SHP-luc κατασκευάστηκε με κλωνοποίηση 500bp της 5' ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου SHP μπροστά από το γονίδιο αναφοράς firefly luciferase, στο φορέα κλωνοποίησης pGL3 basic (Promega).

Οι πλασμιδιακές κατασκευές GST-SUMO-1, GST-Ubc9, GST-PIAS $\alpha$  και pCMV-Flag-PIAS $\alpha$  ήταν προσφορά των N. Kotaja και J. Palvimo. Τα πλασμίδια GST-SAE1/2 και GST-RANBP ήταν προσφορές των R. Hay και F. Melchior, αντίστοιχα. Τα πλασμίδια pSG-PML-III και GFP-PML-III ήταν προσφορά του H. Will.

Τα πλασμίδια pCMV-myc-HNF1 $\beta$  (WT και mutants) κατασκευάστηκαν με υποκλωνοποίηση των αντίστοιχων κωδικών περιοχών από τον φορέα pCB6 στο φορέα έκφρασης pCMV-myc (Invitrogen). Τα πλασμίδια στο φορέα pCB6 που περιείχαν το HNF1 $\beta$  και τα μεταλλαγμένα παράγωγά του κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο της S. Cereghini. Τα πλασμίδια GST-HNF1 $\beta$  (full length), GST-HNF1 $\beta$  (1-313) και GST-HNF1 $\beta$  (314-557) κατασκευάστηκαν με κλωνοποίηση ολόκληρης της κωδικής περιοχής του HNF1 $\beta$  ή περιοχών που αντιστοιχούν στις αμινοξικές περιοχές 1-313 ή 314-557 στο φορέα έκφρασης pGEX4T1. Τα πλασμίδια pCMV-CBP, pCMV-Flag-PCAF και pCMV-Flag-HDAC-1 έχουν περιγραφεί στις δημοσιεύσεις Soutoglou et al 2000b, Soutoglou et al 2001).

## Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση

Η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση εκτελέστηκε με το GeneEditor kit (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

## Κυτταροκαλλιέργειες και παροδική διαμόλυνση

Οι κυτταρικές σειρές (HepG2, HeLa, HEK293, COS-1 και NIH3T3) που χρησιμοποιήθηκαν διατηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) συμπληρωμένο με απενεργοποιημένο με θέρμανση 10% βόειο εμβρυϊκό ορρό (foetal calf serum). Η κυτταρική σειρά NIH3T3 που περιέχει σταθερά ενσωματωμένο στο γένωμα το γονίδιο αναφοράς CAT ελεγχόμενο από θέσεις πρόσδεσης του HNF1β, 3xAlbPE-TK-CAT έχει περιγραφεί στο Ktistaki and Talianidis 1997.

Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων στα βιοχημικά πειράματα (Western blot, ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών και δοκιμασίες γονιδίων αναφοράς) έγιναν με τη μέθοδο συγκατακρήμισης calcium phosphate-DNA, όπως περιγράφεται στα Kritis et al 1993 και Ktistaki et al 1995. Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων για τα πειράματα μικροσκοπίας έγινε με το jetPEI kit (PolyPlus) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η μετά-μεταγραφική καταστολή του SUMO-1 στα κύτταρα HepG2 έγινε με παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με δίκλινα μικρά RNA (siRNA) που στόχευαν στην αποικοδόμηση του ανθρώπινου SUMO-1 RNA ή με δίκλινα μικρά RNA τυχαίας αλληλουχίας. Τα siRNA αγοράστηκαν από την Santa Cruz Biotechnology. Η παροδική διαμόλυνση έγινε με 100nM siRNAs χρησιμοποιώντας το jetSI-ENDO kit (PolyPlus). Η βιοχημική ή μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων έγινε 72hr μετά την παροδική διαμόλυνση.

## Βιοχημική ανάλυση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών

### Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα

Τα ολικά εκχυλίσματα κυττάρων για την ανάλυση πρωτεϊνών τροποποιημένων με SUMO παρασκευάστηκαν από κύτταρα HEK293 ή HepG2. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με 1xPBS [KCl 0.2gr/lit, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2gr/lit, NaCl 8gr/lit, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15gr/lit (pH 7.4)] και αποκολλήθηκαν μηχανικά από το τριβλείο. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 1min/13.000rpm και το ίζημα επαναδιαλύθηκε στο διάλυμα λύσης [1.72% SDS, 50mM Tris-HCl (pH 6.7), 10% glycerol, 0.33% NP-40, 0.33% sodium deoxycolate, 10mM NEM, 1mM PMSF, 10μg/ml E64, 2μg/ml aprotinin]. Μετά από ήπιο ηχοβολισμό και φυγοκέντρηση τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με western blot ή υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση.

### Ανοσοκατακρήμνιση

Προκειμένου τα παραπάνω ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών να υποβληθούν σε ανοσοκατακρήμνιση αραιώθηκαν 17x με διάλυμα που περιέχει 50mM HEPES (pH7.9), 5% glycerol, 0.1% NP-40, 150mM NaCl, 0.1mM EDTA, 10mM NEM, 1mM PMSF, 2μg/ml aprotinin, 10μg/ml E64. Τα αραιωμένα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επώαστηκαν με σφαιρίδια Protein A-sepharose (Rosche) (~1ml εκχύλισμα/ 50μl σφαιρίδια) για 1hr/4°C (preclearing step). Φυγοκεντρήθηκαν για 5 min/4°C/14.000rpm (απομάκρυνση των σφαιριδίων) και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf σωληνάκι. Προστέθηκε το αντίσωμα (10μg) και επώαστηκε αναδεύοντας για 10min/4°C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 50μl σφαιριδίων Protein A Sepharose και η ανοσοκατακρήμνιση έγινε αναδεύοντας 5hr/4°C. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν 4x με Wash buffer [50 mM Hepes (pH 7.9), 5% glycerol, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.1% NP40, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF] και προστέθηκε ίσος όγκος 2X SDS loading buffer. Ακολούθησε ανάλυση με western blot.

## Απομόνωση πρωτεϊνών πυρηνικού σκελετού

Κύτταρα HepG2 ξεπλύθηκαν 3x με 1x PBS, φυγοκεντρήθηκαν και επώαστηκαν με διάλυμα CSK [10mM PIPES (pH 6.8), 300mM sucrose, 100mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 10mM NEM, 1mM PMSF, 2μg/ml aprotinin, 10μg/ml E64, protease inhibitor cocktail (Roche)] για 3min/4°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 3min/5.000rpm/4°C και το υπερκείμενο (διαλυτές νουκλεοκυτταροπλασματικές πρωτεΐνες) διαχωρίστηκε από την πελέττα. Η πελέττα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα CSK που περιείχε 1mg/ml RNase-free DNaseI και επώαστηκε 15min/37°C. Μετά την επώαση, στο δείγμα προστέθηκε ammonium sulfate τελικής συγκέντρωσης 0.25M και φυγοκεντρήθηκε για 3min/5.000rpm. Το υπερκείμενο (χρωματινικές πρωτεΐνες) διαχωρίστηκε από την πελέττα και ακολούθησε πλύση με 2M NaCl. Το αδιάλυτο κλάσμα αποτελεί τον πυρηνικό σκελετό και επαναδιαλύθηκε σε αντίστοιχο όγκο 2x SDS buffer. Ανάλογες ποσότητες πρωτεϊνών κάθε κλάσματος αναλύθηκαν με western blot.

## Πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και ανοσο-συγκρατήση πρωτεϊνών

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης του HNF1β με μεταγραφικούς συν-παράγοντες ήταν COS-1. Τα κύτταρα, αφού ξεπλύθηκαν, συλλέχθηκαν σε 1x PBS και φυγοκεντρήθηκαν 5min/1.000rpm επαναδιαλύθηκαν σε 5V Buffer A [25mM HEPES (pH 7.9), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0.1% NP40, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 10μg/ml aprotinin]. Τα κύτταρα παρέμειναν 10min/4°C και ακολούθησε ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση 5min/2.000rpm/4°C. Η πελέττα που αποτελεί σε ένα μεγάλο ποσοστό αδιάρρηκτους πυρήνες, επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο Buffer A. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος NLB 800 [25mM HEPES (pH7.9), 10% glycerol, 0.8M KCl, 0.2mM EDTA, 0.1%NP40, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 10μg/ml aprotinin]. Το δείγμα αναδεύτηκε 30min/4°C και φυγοκεντρήθηκε 30min/14.000rpm/4°C. Το υπερκείμενο που αποτελεί το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, αραιώθηκε 3x με Extract dilution Buffer [25mM HEPES (pH7.9), 2mM EDTA, 0.1% NP40, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 10μg/ml aprotinin]. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στο εξής είναι ίδια με την ανοσοκατακρήμιση σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών που περιγράφηκε παραπάνω. Το Wash Buffer σε

αυτή την περίπτωση ήταν 25 mM HEPES (pH 7.9), 1% glycerol, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.1% NP40, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF.

## **Μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης**

Τα κύτταρα αφού ξεπλύθηκαν και συλλέχθηκαν σε 1x PBS επαναδιαλύθηκαν σε κατάλληλη ποσότητα 250 mM Tris pH 7.5. Ακολούθησαν 3 κύκλοι ταχείας ψύξης (-80°C) και απόψυξης (37°C) των δειγμάτων και φυγοκέντρηση για την συλλογή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στο υπερκείμενο. Στην κατάλληλη ποσότητα ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος προστέθηκαν 3 μl 100x Mg buffer (100 mM MgCl<sub>2</sub>, 5M 2-mercaptoethanol, 1M KCl), 66 μl διαλύματος ONPG (4mg/ml ONPG σε διάλυμα sodium phosphate) και διάλυμα sodium phosphate [0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.3)] μέχρι τα 300 μl. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση κίτρινου χρώματος, οπότε η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 500 μl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων έγινε στα 420 nm.

## **Μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου luciferase (luc assays)**

Η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου luciferase έγινε με τη χρησιμοποίηση του luciferase assay kit (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

## **Μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου chloramphenicol acetyltransferase (CAT assay)**

Στην κατάλληλη ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος προστέθηκαν 4 μl <sup>14</sup>C chloramphenicol και 250mM Tris pH 7.5 μέχρι τα 95 μl και 5 μl 20 mM acetyl-coenzyme A. Τα δείγματα επωάστηκαν για 1hr/37C και η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 1ml ethyl acetate και ανάδευση. Μετά από φυγοκέντρηση μεταφέρθηκαν 800 μl από την υπερκείμενη φάση σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολούθησε στέγνωμα των δειγμάτων υπό κενό. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 15 μl ethyl acetate και μονιμοποιήθηκε σε πλάκα

TLC (thin layer chromatography plate). Οι διάφορες ακετυλιωμένες μορφές της χλωραμφενικόλης διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε διάλυμα χλωροφομίου:μεθανόλης 95:5. Η πλάκα κατόπιν εκτέθηκε σε φωτογραφική πλάκα και η μέτρηση των δειγμάτων έγινε σε Phosphorimager Storm 840 της Molecular Dynamics.

### **Αντίδραση *in vitro* SUMOylation**

Οι αντιδράσεις προσθήκης SUMO-1 πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας 1μl συντεθειμένης *in vitro* και ραδιοσημασμένης <sup>35</sup>S πρωτεΐνης LRH-1 (WT ή mutant). Η σύνθεση και ραδιασήμανση των πρωτεϊνών έγινε με το TNT kit (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αντίδραση σε κάποιες περιπτώσεις (όπως περιγράφεται στις ενδείξεις τις εικόνας) έγινε παρουσία 50ng GST-SUMO-1, 25ng GST-SAE1/2, 25ng GST-UBC9, 1μg GST-RanBP2 ή GST-PIAS-1 ή GST-PIASχα. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 15μl σε διάλυμα που περιείχε 50mM Tris-HCl (pH 8), 4mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT και 2mM ATP. Η επώαση έγινε 1hr/30°C και σταμάτησε με 5μl 4x SDS buffer. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS PAGE) και αυτοραδιογραφία.

### ***In vitro* αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών (GST-pull downs)**

Οι αντιδράσεις αλληλεπίδρασης έγιναν με τη χρησιμοποίηση 4μl συντεθειμένης *in vitro* και ραδιοσημασμένης <sup>35</sup>S πρωτεΐνης και 2μg από κάθε πρωτεΐνη που είναι σε σύντηξη με GST. Η GST πρωτεΐνη προσδέθηκε σε σφαιρίδια Glutathione Sepharose τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί με 0.5% BSA/1xPBS. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν 3x με 1xPBS και ακολούθησε αντίδραση αλληλεπίδρασης για 5hr/4°C με ανακίνηση με την προσθήκη της ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης στο διάλυμα αλληλεπίδρασης [100mM KCl, 20mM Hepes (pH 7.9), 0.1%NP-40, 5mM MgCl<sub>2</sub> 0.2% BSA, 10% glycerol, 0.1mM PMSF, 10μg/ml aprotinin]. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν 4x με το Wash buffer [100mM KCl, 20mM Hepes (pH 7.9), 0.1% NP-40, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM PMSF, 10μg/ml aprotinin] και επαναδιαλύθηκαν σε 20μl SDS loading

buffer. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

## Τεχνικές Μικροσκοπίας

### Ανοσοφθορισμός

Κύτταρα HeLa ή HepG2 καλλιεργήθηκαν σε γυάλινες αντικειμενοφόρους καλυμμένες με poly-D-lysine. Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν παροδικά με κατάλληλους φορείς έκφρασης 24hr ή 36hr μετά τη διαμόλυνση, ξεπλύθηκαν 3x με 1x PBS και είτε μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε χρώση με αντισώματα ή πειράματα FRET ή χρησιμοποιήθηκαν ζωντανά για πειράματα FRAP.

Η μονιμοποίηση έγινε με 2% formaldehyde σε 1x PBS για 10min και ακολούθησε 3x ξέπλυμα με 1x PBS και επώαση με 0.1% Triton X-100/1x PBS/1% BSA για 10min, ξέπλυμα 3x με 1x PBS/1% BSA και επώαση με 1x PBS/1% BSA για 30min. Ακολούθησε επώαση με τα αντισώματα σε κατάλληλες αραιώσεις σε διάλυμα 1x PBS/1% BSA. Τα πρωτεύοντα αντισώματα επώαστηκαν για 45min ενώ τα δευτερεύοντα για 30min. Ενδιάμεσα και στο τέλος έγιναν 4x πλύσεις /15min με 1x PBS/1% BSA και τελικά μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρους με 5μl Mowiol (Sigma). Όταν έγινε διπλή χρώση τότε έγινε η επώαση πρώτα με τα δύο πρωτεύοντα αντισώματα διαδοχικά, με ενδιάμεσα ξεπλύματα και ακολούθησε η επώαση με τα δύο δευτερεύοντα αντισώματα (όταν αυτό ήταν απαραίτητο), και πάλι διαδοχικά. Όλες οι επωάσεις και τα ξεπλύματα έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου.

Η παρατήρηση έγινε στο συνεστιακό μικροσκόπιο Zeiss AxioScope 2 Plus με εξοπλισμό Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning system και το Lasersharp-2000 imaging software. Τα δευτερεύοντα αντισώματα AlexaFluor488 (πράσινη χρώση) και το GFP (Green Fluorescent Protein) ενεργοποιήθηκαν με το argon laser 488nm και ο φθορισμός εκπομπής συγκρατήθηκε από το φίλτρο 515/30. Τα δευτερεύοντα αντισώματα AlexaFluor568 και το PML-TRITC ενεργοποιήθηκαν το helium laser 555nm και ο φθορισμός εκπομπής συγκρατήθηκε από το φίλτρο 570LP.



## FRET after photobleaching assays

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για FRET μονιμοποιήθηκαν με 2% formaldehyde όπως περιγράφηκε παραπάνω, και αφού ξεπλύθηκαν ακολούθησε μονιμοποίηση με Mowiol. Για την τεχνική του FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) χρησιμοποιήθηκαν οι φθορίζουσες πρωτεΐνες CFP (Cyan Fluorescent Protein) και YFP (Yellow Fluorescent Protein) σε σύντηξη με τις πρωτεΐνες που μας ενδιέφεραν να ελεγχθούν για άμεση αλληλεπίδραση. Το FRET βασίζεται στην ικανότητα του YFP να απορροφά μέρος του φθορισμού εκπομπής του CFP όταν οι δύο πρωτεΐνες είναι σε απόσταση 50Å. Αρχικά παίρνουμε μια εικόνα από το φθορισμού το CFP, στη συνέχεια καταστρέφουμε εντελώς το YFP, με πολύ υψηλή ενεργότητα από το αντίστοιχο laser και τέλος παίρνουμε μια δεύτερη εικόνα φθορισμού του CFP που θα είναι ενισχυμένη, αν υπάρχει αλληλεπίδραση καθώς το YFP θα χάσει την ικανότητα απορρόφησης φθορισμού. Οι εικόνες του CFP λαμβάνονται με ενεργοποίηση από argon laser 457-nm και ο φθορισμός εκπομπής συγκεντρώνεται από το φίλτρο 488/10 band-pass. Η παρατήρηση του YFP γίνεται με ενεργοποίηση από argon laser 514-nm και ο φθορισμός εκπομπής συλλέγεται από φίλτρο 570LP. Η καταστροφή της ικανότητας ενεργοποίησης (photobleaching) γίνεται με το argon laser 514-nm σε μέγιστη ένταση για 1min. Η μέτρηση της έντασης του φθορισμού του CFP, πριν και μετά την καταστροφή του YFP, έγινε με το NIH Image-J software. Η μέτρηση του FRET υπολογίστηκε ως το ποσοστό αύξησης της έντασης του φθορισμού του CFP, μετά την καταστροφή του YFP.

$$\text{FRET} = (\text{Intensity 2} - \text{Intensity 1}) \times 100 / \text{Intensity 2}$$

Η αξιοπιστία του πειράματος επιβεβαιώθηκε με αντίστοιχες μετρήσεις σε περιοχές ή κύτταρα που δεν έγινε η καταστροφή του YFP ή σε συνθήκες που δεν αναμένεται αλληλεπίδραση. Το FRET σε αυτές τις περιπτώσεις μετρήθηκε μηδενικό.

## FRAP assays

Το FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) πραγματοποιήθηκε με ζωντανά κύτταρα. Τα κύτταρα που βρίσκονταν προσκολλημένα στη γυάλινη αντικειμενοφόρο τοποθετήθηκαν ανάποδα σε PBS και το πείραμα έγινε στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Το FRAP είναι μια τεχνική

που επιτρέπει τη μέτρηση της κινητικότητας μιας πρωτεΐνης σε κάποιο συγκεκριμένο σημείο του κυττάρου. Η πρωτεΐνη βρίσκεται σε σύντηξη με μια φθορίζουσα πρωτεΐνη (YFP, GFP), η οποία καταστρέφεται ολικά σε ένα συγκεκριμένο σημείο. Η κινητικότητα μετριέται ως το ποσοστό ανάκαμψης του φθορισμού στο σημείο αυτό από πρωτεΐνες που βρίσκονται σε παρακείμενες περιοχές. Το YFP ενεργοποιείται με το argon laser 514-nm και ο φθορισμός εκπομπής συλλέγεται με το φίλτρο 545/40 band-emission. Το GFP ενεργοποιείται με το argon laser 488-nm και ο φθορισμός εκπομπής συλλέγεται με το φίλτρο 515/30 band-emission. Αφού πάρθηκε η αρχική εικόνα φθορισμού, στη συνέχεια καταστράφηκε ο φθορισμός σε μια περιοχή ~1μm<sup>2</sup> ακτινοβολώντας με το κατάλληλο laser με ένταση 50-60% για 2sec. Στη συνέχεια πάρθηκαν διαδοχικές εικόνες για τη χρονική περίοδο 60sec. Ο φθορισμός της συγκεκριμένης επιφάνειας που καταστράφηκε μετρήθηκε με το κατάλληλο software του συνεστιακού μικροσκοπίου.

### *In situ* permeabilization

Τα κύτταρα αφού ξεπλύθηκαν με PBS επώαστηκαν με διάλυμα CSK [10mM PIPES (pH 6.8), 300mM sucrose, 100mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA] που περιείχε 0.5% Triton X-100. Η επώαση έγινε για 1min σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάποιες περιπτώσεις προστέθηκαν αναστολείς ισοπεπτιδασών (10mM NEM, 10μg/ml E64). Ακολούθησε μονιμοποίηση με 2% formaldehyde σε 1x PBS, χρώση με αντισώματα και παρακολούθηση όπως περιγράφηκε παραπάνω. Με επώαση με τα ίδια διαλύματα, στις ίδιες συνθήκες και ακόλουθη φυγοκέντρηση για 5min/5.000rpm προέκυψαν τα κλάσματα υπερκείμενο (sup) και πελέττα (pel). Η αντίδραση σε αυτήν την περίπτωση σταμάτησε με την προσθήκη Lysis buffer μετά τη φυγοκέντρηση.

### **Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης**

Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έγιναν χρησιμοποιώντας ήπαρ ποντικών αγρίου τύπου. Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν και με τη βοήθεια καθετήρα το ήπαρ ξεπλύθηκε με 1x PBS, μονιμοποιήθηκε με 1% formaldehyde και η αντίδραση μονιμοποίησης των

πρωτεϊνών στο DNA τερματίστηκε με 0.125 M glycine. Κάθε ένα από τα παραπάνω στάδια διήρκησε για 10min. Το ήπαρ ομογενοποιήθηκε σε διάλυμα Sucrose A [0.32M sucrose, 15mM HEPES (pH 7.9), 60mM KCl, 2mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5% BSA, 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 0.5mM aprotinin]. Το δείγμα διηθήθηκε από γάζα και ακολούθησε δεύτερη ομογενοποίηση. Στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα που περιέχει διάλυμα Sucrose B (ίδιο με A με τη διαφορά ότι δεν έχει BSA και περιέχει 30% sucrose) κατά τρόπο τέτοιο ώστε να δημιουργηθούν δύο φάσεις διαφορετικής πυκνότητας sucrose. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 15 min/4°C/3.000rpm και η πελέττα που σχηματίζεται αποτελεί τους μονιμοποιημένους πυρήνες. Η πελέττα επαναδιαλύθηκε σε 10ml Buffer Nuc (15mM HEPES, pH7.5, 60mM KCl, 15mM NaCl, 0.34mM sucrose, 0.15mM mercaptoethanol) και ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση 5min/4°C/1.000rpm ώστε να ξεπλυθούν οι πυρήνες. Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε 10ml Sonication Buffer [50 mM HEPES (pH 7.9), 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% sodium deoxycholate, 0,1% SDS και αναστολείς πρωτεασών]. Το DNA διασπάστηκε με υπέρηχους σε τμήματα μέσου μήκους 200-1000 bp και κατόπιν τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για την κατακρήμνιση και απομάκρυνση του αδιάλυτου κλάσματος και επώαστηκαν με protein G Sepharose παρουσία 2 μg με υπέρηχους διασπασμένου λ DNA και 1 mg bovine serum albumin/ml για 1hr/4°C, προκειμένου να μειωθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις (preclearing). Κατάλληλη ποσότητα καθαρισμένης χρωματινής ανοσοκατακρήμνιστηκε με την κατάλληλη ποσότητα αντισώματος και τα ανοσοσύμπλοκα συλλέχθηκαν με προσρόφηση σε protein G-Sepharose με επώαση O/N στους 4°C. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν δύο φορές με sonication buffer, δύο φορές με sonication buffer που περιείχε 500mM NaCl, δύο φορές με 20mM Tris pH 8.0-1mM EDTA-250mM LiCl-0,5% NP-40-0,5% sodium deoxycholate και δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA. Τα ανοσοσύμπλοκα ελευθερώθηκαν από την κολώνα με επώαση σε 50mM Tris pH 8.0-1 mM EDTA-1% SDS για 10min/65°C, προσαρμόστηκε η συγκέντρωσή τους σε NaCl στα 200mM και ακολούθησε η επώασή τους στους 65°C για 5 ώρες ώστε να καταστραφούν οι συνδέσεις πρωτεϊνών-DNA (cross-links). Τα δείγματα κατόπιν επώαστηκαν με 10μg RNase A και 20μg proteinase K/ml, εκχειλίστηκαν με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιστηκαν με αιθανόλη.

Στα πειράματα που ακολούθησε δεύτερη ανοσοκατακρήμνιση, αφού τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν τα ανοσοσύμπλοκα ελευθερώθηκαν από τα σφαιρίδια

με επώαση με 10mM DTT για 30min/37°C. Αφού το δείγμα αραιώθηκε 50x με Sonication buffer ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ανοσοκατακρήμνισης.

Η ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών στα δείγματα έγινε με ραδιενεργά PCR παρουσία 10  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP, των οποίων τα προϊόντα αναλύθηκαν σε μη αποδιατακτικά (native) πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 5%. Οι αντιδράσεις πολυμερισμού έγιναν σε τελικό όγκο 50 $\mu$ l, σε διάλυμα που περιείχε 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.5, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, 0,1mM dNTP, 0,5M betaine, 0,4 $\mu$ M από κάθε εκκινήτη και τυπικά το 1/50 του DNA που είχε προκύψει από την ανοσοκατακρήμνιση. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες:

94°C/3min, [94°C/30sec, 60-65°C/1min, 72°C/1min] x 20-30 cycles, 72°C/5min.

## Αντισώματα

Τα αντισώματα anti-SUMO-1 (FL-101), anti-myc (9E10 και A-14), anti-HA (Y-11), anti-PML και anti-Cy3-labelled PML (PG-M3) ήταν από τη Santa Cruz Biotechnology. Το anti-Pol-II (8WG16) ήταν από τη Covance, το anti-histone 3 (ab8580) ήταν από την Abcam και τα anti-Flag (M2) και anti-Lamin B ήταν από τη Sigma. Το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-LRH-1 παράχθηκε με ανοσοποίηση κουνελιών New Zealand White με αντιγόνο βακτηριακά εκφρασμένη ανθρώπινη πρωτεΐνη LRH-1. Τα δευτερεύοντα αντισώματα anti-mouse και anti-rabbit immunoglobulin G ήταν συνδεδεμένα με horseradish peroxidase στα western blot και ήταν από την εταιρία Jackson Laboratories. Τα δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού ήταν anti-mouse ή anti-rabbit AlexaFluor568 και AlexaFluor488 και ήταν από τη Molecular Probes.

# Βιβλιογραφία

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 *Suppl 4*, 16477-16484.

Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K., and Pelicci, P. G. (1998). The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 18, 1084-1093.

Annicotte, J. S., Fayard, E., Swift, G. H., Selander, L., Edlund, H., Tanaka, T., Kodama, T., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2003). Pancreatic-duodenal homeobox 1 regulates expression of liver receptor homolog 1 during pancreas development. *Mol Cell Biol* 23, 6713-6724.

Barbacci, E., Chalkiadaki, A., Masdeu, C., Haumaitre, C., Lokmane, L., Loirat, C., Cloarec, S., Talianidis, I., Bellanne-Chantelot, C., and Cereghini, S. (2004). HNF1beta/TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum Mol Genet* 13, 3139-3149.

Barbacci, E., Reber, M., Ott, M. O., Breillat, C., Huetz, F., and Cereghini, S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 126, 4795-4805.

Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8, 1243-1254.

Baxter, J., Merkschlager, M., and Fisher, A. G. (2002). Nuclear organisation and gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 14, 372-376.

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-286.

Becker, P. B., and Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71, 247-273.

Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E., and Sauer, F. (2002). Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* *419*, 857-862.

Bernardi, R., Scaglioni, P. P., Bergmann, S., Horn, H. F., Vousden, K. H., and Pandolfi, P. P. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* *6*, 665-672.

Best, J. L., Ganiatsas, S., Agarwal, S., Changou, A., Salomoni, P., Shirihai, O., Meluh, P. B., Pandolfi, P. P., and Zon, L. I. (2002). SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol Cell* *10*, 843-855.

Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P. G., and Dejean, A. (2002). Deconstructing PML-induced premature senescence. *Embo J* *21*, 3358-3369.

Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H., and Owerbach, D. (2004). A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* *279*, 27233-27238.

Boisvert, F. M., Hendzel, M. J., and Bazett-Jones, D. P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol* *148*, 283-292.

Borden, K. L., Boddy, M. N., Lally, J., O'Reilly, N. J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E., and Freemont, P. S. (1995). The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *Embo J* *14*, 1532-1541.

Boulias, K., Katrakili, N., Bamberg, K., Underhill, P., Greenfield, A., and Talianidis, I. (2005). Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. *Embo J* *24*, 2624-2633.

Carmo-Fonseca, M. (2002). The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. *Cell* *108*, 513-521.

Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., and Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* *2*, E107-112.

Cereghini, S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *Faseb J* *10*, 267-282.

Cereghini, S., Ott, M. O., Power, S., and Maury, M. (1992). Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development* 116, 783-797.

Chakrabarti, S. R., Sood, R., Nandi, S., and Nucifora, G. (2000). Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13281-13285.

Chi, Y. I., Frantz, J. D., Oh, B. C., Hansen, L., Dhe-Paganon, S., and Shoelson, S. E. (2002). Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1alpha. *Mol Cell* 10, 1129-1137.

Coffinier, C., Thepot, D., Babinet, C., Yaniv, M., and Barra, J. (1999). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* 126, 4785-4794.

Cohen, N., Sharma, M., Kentsis, A., Perez, J. M., Strudwick, S., and Borden, K. L. (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *Embo J* 20, 4547-4559.

Cosma, M. P. (2002). Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 10, 227-236.

Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2, 292-301.

del Castillo-Olivares, A., Campos, J. A., Pandak, W. M., and Gil, G. (2004). The role of alpha1-fetoprotein transcription factor/LRH-1 in bile acid biosynthesis: a known nuclear receptor activator that can act as a suppressor of bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 279, 16813-16821.

Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I kappa Balpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2, 233-239.

Dobrev, G., Dambacher, J., and Grosschedl, R. (2003). SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. *Genes Dev* 17, 3048-3061.



Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., Solomon, E., de The, H., Hay, R. T., and Freemont, P. S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3), 381-393.

Emerson, B. M. (2002). Specificity of gene regulation. *Cell* 109, 267-270.

Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R., and Dobner, T. (2001). SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11312-11317.

Fayard, E., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2004). LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* 14, 250-260.

Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.

Freiman, R. N., and Tjian, R. (2003). Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell* 112, 11-17.

Galarneau, L., Pare, J. F., Allard, D., Hamel, D., Levesque, L., Tugwood, J. D., Green, S., and Belanger, L. (1996). The alpha1-fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the Drosophila FTZ-F1 family. *Mol Cell Biol* 16, 3853-3865.

Gall, J. G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 273-300.

Gasser, S. M. (2001). Positions of potential: nuclear organization and gene expression. *Cell* 104, 639-642.

Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18, 2046-2059.

Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11, 1043-1054.

Goll, M. G., and Bestor, T. H. (2002). Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes Dev* 16, 1739-1742.

Gong, L., Millas, S., Maul, G. G., and Yeh, E. T. (2000). Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem* 275, 3355-3359.

Goodson, M. L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Park-Sarge, O. K., and Sarge, K. D. (2001). Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem* 276, 18513-18518.

Goodwin, B., Jones, S. A., Price, R. R., Watson, M. A., McKee, D. D., Moore, L. B., Galardi, C., Wilson, J. G., Lewis, M. C., Roth, M. E., *et al.* (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6, 517-526.

Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr Opin Genet Dev* 9, 132-139.

Hatzis, P., and Talianidis, I. (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell* 10, 1467-1477.

He, D. C., Nickerson, J. A., and Penman, S. (1990). Core filaments of the nuclear matrix. *J Cell Biol* 110, 569-580.

Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107, 5-8.

Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D., and Freemont, P. S. (1998). Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet* 63, 297-304.

Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.

Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Mayhew, C. N., Goodson, M. L., Park-Sarge, O. K., and Sarge, K. D. (2001). Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276, 40263-40267.

Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1996). Active RNA polymerases are localized within discrete transcription 'factories' in human nuclei. *J Cell Sci* 109 (Pt 6), 1427-1436.

Isogai, Y., and Tjian, R. (2003). Targeting genes and transcription factors to segregated nuclear compartments. *Curr Opin Cell Biol* 15, 296-303.

Jackson, D. A., Iborra, F. J., Manders, E. M., and Cook, P. R. (1998). Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Mol Biol Cell* 9, 1523-1536.

Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P. S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.

Jenuwein, T. (2002). Molecular biology. An RNA-guided pathway for the epigenome. *Science* 297, 2215-2218.

Johansson, L., Bavner, A., Thomsen, J. S., Farnegardh, M., Gustafsson, J. A., and Treuter, E. (2000). The orphan nuclear receptor SHP utilizes conserved LXXLL-related motifs for interactions with ligand-activated estrogen receptors. *Mol Cell Biol* 20, 1124-1133.

Johnson, E. S., and Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-744.

Joseph, J., Tan, S. H., Karpova, T. S., McNally, J. G., and Dasso, M. (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol* 156, 595-602.

Kagey, M. H., Melhuish, T. A., and Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, 127-137.

Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8, 713-718.

Kannouche, P. L., Wing, J., and Lehmann, A. R. (2004). Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* 14, 491-500.

Karpova, T. S., Baumann, C. T., He, L., Wu, X., Grammer, A., Lipsky, P., Hager, G. L., and McNally, J. G. (2003). Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc* 209, 56-70.

Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette-Egly, C., Gaub, M. P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R., and Chambon, P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *Embo J* 11, 629-642.

Kim, K. I., Baek, S. H., Jeon, Y. J., Nishimori, S., Suzuki, T., Uchida, S., Shimbara, N., Saitoh, H., Tanaka, K., and Chung, C. H. (2000). A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J Biol Chem* 275, 14102-14106.

Kirsh, O., Seeler, J. S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., and Dejean, A. (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J* 21, 2682-2691.

Koken, M. H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M. K., Sobczak-Thepot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F., and de The, H. (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 10, 1315-1324.

Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.

Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2002). PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22, 5222-5234.

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

Ktistaki, E., Ktistakis, N. T., Papadogeorgaki, E., and 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 U S A* 92, 9876-9880.

Ktistaki, E., and Talianidis, I. (1997). Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 277, 109-112.

Lachner, M., O'Sullivan, R. J., and Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* 116, 2117-2124.

LaMorte, V. J., Dyck, J. A., Ochs, R. L., and Evans, R. M. (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4991-4996.

Lavau, C., Marchio, A., Fagioli, M., Jansen, J., Falini, B., Lebon, P., Grosveld, F., Pandolfi, P. P., Pelicci, P. G., and Dejean, A. (1995). The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene* 11, 871-876.

Le Hir, H., Nott, A., and Moore, M. J. (2003). How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci* 28, 215-220.

Lee, Y. K., and Moore, D. D. (2002). Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner. *J Biol Chem* 277, 2463-2467.

Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14, 2551-2569.

Li, M., Xie, Y. H., Kong, Y. Y., Wu, X., Zhu, L., and Wang, Y. (1998). Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus. *J Biol Chem* 273, 29022-29031.

Li, Y., Choi, M., Suino, K., Kovach, A., Daugherty, J., Kliewer, S. A., and Xu, H. E. (2005). Structural and biochemical basis for selective repression of the orphan nuclear receptor liver receptor homolog 1 by small heterodimer partner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9505-9510.

Lu, T. T., Makishima, M., Repa, J. J., Schoonjans, K., Kerr, T. A., Auwerx, J., and Mangelsdorf, D. J. (2000). Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6, 507-515.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.

Matera, A. G. (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* 9, 302-309.

Matunis, M. J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135, 1457-1470.

Melnick, A., and Licht, J. D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-3215.

Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D., and Hess, J. L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10, 1107-1117.

Misteli, T. (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* 291, 843-847.

Misteli, T. (2004). Spatial positioning; a new dimension in genome function. *Cell* 119, 153-156.

Miyauchi, Y., Yogosawa, S., Honda, R., Nishida, T., and Yasuda, H. (2002). Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem* 277, 50131-50136.

Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J. S., Haupt, Y., and Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275, 13321-13329.

Muller, S., Matunis, M. J., and Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* 17, 61-70.

Muratani, M., Gerlich, D., Janicki, S. M., Gebhard, M., Eils, R., and Spector, D. L. (2002). Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat Cell Biol* 4, 106-110.

Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C. M., and Canaani, E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 10, 1119-1128.

Nathan, D., Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2003). Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13118-13120.

Nitta, M., Ku, S., Brown, C., Okamoto, A. Y., and Shan, B. (1999). CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6660-6665.

Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., *et al.* (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303, 1378-1381.

Olson, M. O., Dundr, M., and Szebeni, A. (2000). The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol* 10, 189-196.

Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 10, 2657-2683.

Pare, J. F., Malenfant, D., Courtemanche, C., Jacob-Wagner, M., Roy, S., Allard, D., and Belanger, L. (2004). The fetoprotein transcription factor (FTF) gene is essential to embryogenesis and cholesterol homeostasis and is regulated by a DR4 element. *J Biol Chem* 279, 21206-21216.

Pare, J. F., Roy, S., Galarneau, L., and Belanger, L. (2001). The mouse fetoprotein transcription factor (FTF) gene promoter is regulated by three GATA elements with tandem E box and Nkx motifs, and FTF in turn activates the Hnf3beta, Hnf4alpha, and Hnf1alpha gene promoters. *J Biol Chem* 276, 13136-13144.

Pederson, T. (2000). Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium. *Nat Cell Biol* 2, E73-74.

Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C. K., Rose, D. W., and Rosenfeld, M. G. (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116, 511-526.

Phair, R. D., and Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404, 604-609.

Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-120.

Rausa, F. M., Galarnau, L., Belanger, L., and Costa, R. H. (1999). The nuclear receptor fetoprotein transcription factor is coexpressed with its target gene HNF-3beta in the developing murine liver, intestine and pancreas. *Mech Dev* 89, 185-188.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12, 162-169.

Reyes, J. C., Muchardt, C., and Yaniv, M. (1997). Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J Cell Biol* 137, 263-274.

Rodriguez, M. S., Dargemont, C., and Hay, R. T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276, 12654-12659.

Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., and Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10, 831-842.

Sablin, E. P., Krylova, I. N., Fletterick, R. J., and Ingraham, H. A. (2003). Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol Cell* 11, 1575-1585.

Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088-3103.

Saitoh, H., and Hinchey, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275, 6252-6258.

Salomoni, P., and Pandolfi, P. P. (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108, 165-170.



Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., and Suske, G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J* 21, 5206-5215.

Schmidt, D., and Muller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2872-2877.

Seeler, J. S., and Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 690-699.

Servitja, J. M., and Ferrer, J. (2004). Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia* 47, 597-613.

Shiio, Y., and Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13225-13230.

Shopland, L. S., and Lawrence, J. B. (2000). Seeking common ground in nuclear complexity. *J Cell Biol* 150, F1-4.

Soutoglou, E., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell* 5, 745-751.

Soutoglou, E., Papafotiou, G., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins. *J Biol Chem* 275, 12515-12520.

Soutoglou, E., and Talianidis, I. (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* 295, 1901-1904.

Soutoglou, E., Violette, B., Vaxillaire, M., Yaniv, M., Pontoglio, M., and Talianidis, I. (2001). Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *Embo J* 20, 1984-1992.

Spector, D. L. (2003). The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* 72, 573-608.

Spector, D. L., Fu, X. D., and Maniatis, T. (1991). Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *Embo J* 10, 3467-3481.

Spector, D. L., and Gasser, S. M. (2003). A molecular dissection of nuclear function. Conference on the dynamic nucleus: questions and implications. *EMBO Rep* 4, 18-23.

Sternsdorf, T., Jensen, K., and Will, H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* 139, 1621-1634.

Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

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

Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., and Shinkai, Y. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev* 16, 1779-1791.

Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., and Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276, 35368-35374.

Visser, A. E., Jaunin, F., Fakan, S., and Aten, J. A. (2000). High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci* 113 (Pt 14), 2585-2593.

Wang, J., Shiels, C., Sasieni, P., Wu, P. J., Islam, S. A., Freemont, P. S., and Sheer, D. (2004). Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J Cell Biol* 164, 515-526.

Yang, S. H., and Sharrocks, A. D. (2004). SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* 13, 611-617.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15, 2343-2360.

Zhong, S., Hu, P., Ye, T. Z., Stan, R., Ellis, N. A., and Pandolfi, P. P. (1999). A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene* 18, 7941-7947.

---

Zhong, S., Salomoni, P., and Pandolfi, P. P. (2000). The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2, E85-90.

Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., and Pandolfi, P. P. (2000). Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* 191, 631-640.

# ***HNF1*β/*TCF2* mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment**

Elena Barbacci<sup>1</sup>, Angeliki Chalkiadaki<sup>2</sup>, Christelle Masdeu<sup>1</sup>, Cécile Haumaitre<sup>1</sup>, Ludmilla Lokmane<sup>1</sup>, Chantal Loirat<sup>3</sup>, Sylvie Cloarec<sup>4</sup>, Iannis Talianidis<sup>2</sup>, Christine Bellanne-Chantelot<sup>5</sup> and Silvia Cereghini<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Biologie du Développement, UMR 7622, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, 9 quai St Bernard, 75005 Paris, France, <sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH 1527, Vassilika Vouton, 711 10 Herakleion, Crete, Greece, <sup>3</sup>Hôpital Robert-Debré, Service de Néphrologie, 48 bd Serrurier, 75019 Paris, France, <sup>4</sup>Hôpital de Tours, Centre Hospitalier Universitaire, 49 bd Beranger, 37044 Tours Cedex, France and <sup>5</sup>Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France

Received August 2, 2004; Revised and Accepted October 13, 2004

**Mutations in the *HNF1*β gene, encoding the dimeric POU-homeodomain transcription factor HNF1β (*TCF2* or *vHNF1*), cause various phenotypes including maturity onset diabetes of the young 5 (*MODY5*), and abnormalities in kidney, pancreas and genital tract development. To gain insight into the molecular mechanisms underlying these phenotypes and into the structure of HNF1β, we functionally characterized eight disease-causing mutations predicted to produce protein truncations, amino acids substitutions or frameshift deletions in different domains of the protein. Truncated mutations, retaining the dimerization domain, displayed defective nuclear localization and weak dominant-negative activity when co-expressed with the wild-type protein. A frameshift mutation located within the C-terminal QSP-rich domain partially reduced transcriptional activity, whereas selective deletion of this domain abolished transactivation. All five missense mutations, which concern POU-specific and homeodomain residues, were correctly expressed and localized to the nucleus. Although having different effects on DNA-binding capacity, which ranged from complete loss to a mild reduction, these mutations exhibited a severe reduction in their transactivation capacity. The transcriptional impairment of those mutants, whose DNA-binding activity was weakly or not affected, correlated with the loss of association with one of the histone-acetyltransferases CBP or PCAF. In contrast to wild-type HNF1β, whose transactivation potential depends on the synergistic action of CBP and PCAF, the activity of these mutants was not increased by the synergistic action of these two coactivators or by treatment with the specific histone-deacetylase inhibitor TSA. Our findings suggest that the complex syndrome associated with *HNF1*β-*MODY5* mutations arise from either defective DNA-binding or transactivation function through impaired coactivator recruitment.**

## **INTRODUCTION**

Maturity onset diabetes of the young (*MODY*) is a genetically heterogeneous form of non-insulin dependent diabetes mellitus characterized by early onset, autosomal dominant inheritance and abnormal glucose stimulated insulin secretion. Heterozygous mutations in genes encoding five cell-specific transcription factors are associated with different *MODY* subtypes, *HNF4*α (*MODY1*), *HNF1*α, (*MODY3*), insulin promoter factor (*IPF1/PDX1*; *MODY4*), *HNF1*β/*vHNF1*

(*MODY5*) and *NeuroD1* (*MODY6*). These transcription factors have been proposed to form an integrated regulatory network in β-cells, which is involved in glucose metabolism and insulin secretion (1) (reviewed in 2). Yet, the precise mechanism and the affected target genes leading to the *MODY* phenotype are largely unknown.

Two of these *MODY* genes, *HNF1*α and *HNF1*β, belong to a distinct subclass of the homeodomain family. They share a highly conserved DNA-binding domain composed of an atypical POU-specific (POU<sub>s</sub>) and POU homeodomain

\*To whom correspondence should be addressed at: Biologie du Développement, UMR 7622, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, 9 quai St Bernard, Bâtiment C, case 24, 75252 Paris Cedex 05, France. Tel: +33 144272155; Fax: +33 144273497; Email: silvia.cereghini@sny.jussieu.fr

(POU<sub>H</sub>) and a more divergent C-terminal transactivation domain. Members of this family are also characterized by a highly conserved dimerization domain located at the first 32 amino acids. Because of these structural properties, HNF1 $\alpha$  and HNF1 $\beta$  display similar DNA-binding sequence specificity and bind as homodimers (3,4) (reviewed in 5). The structural and functional properties of HNF1 $\alpha$ , including interactions with coactivator proteins have been extensively studied (6–10). In contrast, the molecular properties of HNF1 $\beta$  remain essentially uncharacterized and mainly inferred to its homology to HNF1 $\alpha$ .

A distinctive feature of the *HNF1 $\beta$*  mutations identified is their association with severe non-diabetic renal defects and genital malformations, indicating that this transcription factor plays a critical role in normal development of kidney and Müllerian/Wolffian duct derivatives (11–15) (reviewed in 16,17). However, the molecular mechanisms by which heterozygous mutations in this gene cause a broad spectrum of clinical symptoms are largely unknown. Targeted disruption of the *HNF1 $\beta$*  gene in mice results in early embryonic death (18,19), precluding an analysis of its role at later stages of development. Remarkably, mice heterozygous for a *HNF1 $\beta$*  null allele have apparent normal kidney structure and function and show no signs of diabetes or abnormal glucose tolerance (S. Cereghini, unpublished data). The majority of *MODY5* mutations initially identified are predicted to cause either truncations at early codons or an internal deletion within the POU<sub>S</sub> domain and therefore lack part of the DNA-binding domain. *In vitro* studies on the functional properties of some of these mutations suggested that the clinical phenotypes may be related to either loss of function or dominant-negative mechanisms (11,20). In contrast, two mutations (P328L329delCCTCT and S36F) exhibited a gain-of-function phenotype (21,22). More recently, four mutations at the splice donor site of exon 2 (14,23–25) and several novel missense mutations, mainly located in the DNA-binding domain, have been reported (12,24,26,27).

To obtain a more comprehensive picture of HNF1 $\beta$  function and of the impairment caused by the mutations of this gene, we have analyzed the functional role of selected *MODY5*-mutations located in different domains of the protein. These include five missense mutations (24), two non-sense mutations in the POU<sub>S</sub> domain and one frameshift mutation in the C-terminal transactivation domain. We investigated their intracellular localization, DNA-binding and transactivation activities, as well as the possibility that these mutations could interfere with the function of the protein encoded by the wild-type allele. These analyses uncover the involvement of diverse mechanisms: some mutations, which affect DNA-binding, possess a weak dominant-negative activity, whereas others, with intact or partially decreased DNA-binding activity, impair primarily the transactivation potential of the protein. In addition, we demonstrate that HNF1 $\beta$  physically interacts with the histone-acetyltransferases CREB-binding protein (CBP) and the p300/CBP-associated factor PCAF and with the histone-de-acetylase HDAC-1. We provide evidence that the transactivation potential of HNF1 $\beta$  depends on the synergistic action of CBP and PCAF and that the impaired transactivation function of some *HNF1 $\beta$*  mutations could be related to a defective interaction with these coactivator proteins.

## RESULTS

### Selected mutations in the *HNF1 $\beta$* gene

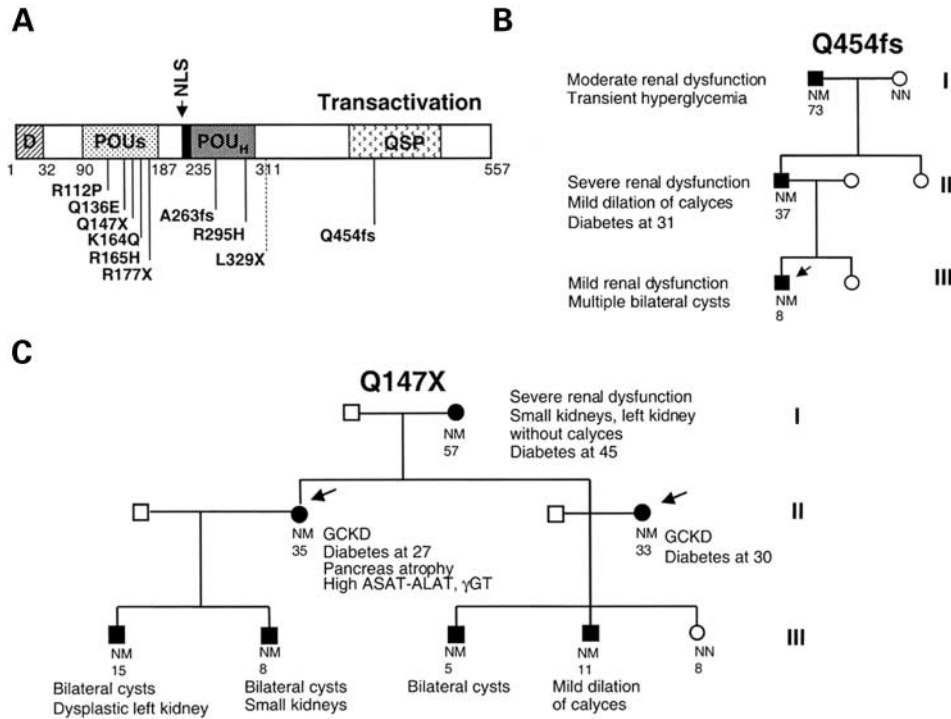
Our analysis was focused on five missense mutations of *HNF1 $\beta$*  (24), as well as two nonsense mutations (Q147X, R177X), and a frameshift deletion in the transactivation domain of the protein (Q454fsdelAG) (Fig. 1A). These mutations were identified during a screening of patients exhibiting renal clinical features characteristic of *MODY5-HNF1 $\beta$*  patients (hypoplastic glomerulocystic kidney, cysts, dysplastic kidneys) associated or not with early onset of diabetes. Three of them have not yet been reported.

The frameshift mutation Q454fsdelAG, further designed as Q454fs, is predicted to lead to a premature stop codon at position 549, instead of 557, with the insertion of novel amino acids. It was identified in a three-generation French family with variable expressivity of both renal cysts and diabetes (Fig. 1B). The Q147X was found in a three-generation French family, which co-segregated with renal dysfunction, hypoplastic glomerulocystic kidney, and diabetes. The clinical history of this family was initially described in 1982 (28). Pointing to variability of phenotype within the same family and similar to other families with *HNF1 $\beta$*  mutations (11), one carrier had a severe pancreas atrophy of both body and tail, whereas another carrier had a rather mild phenotype and relatively normal kidney structure (Fig. 1C). The mutation R177X, which was first reported in a Japanese family (29) and more recently in an Italian family (30), was found in a 13-year-old French girl who presented hyperchogenic kidneys.

### DNA-binding and heterodimerization properties of *HNF1 $\beta$* mutants

To examine the effect of different mutations on DNA-binding activity and heterodimerization potential, we expressed them in HEK293 or C33 cells, either alone or in combination with the wild-type protein. Both cell lines lack endogenous HNF1 $\alpha$  and  $\beta$  expression, but their epithelial nature and the embryonic kidney origin of HEK293 suggested that these cell lines probably express the cofactors required for dimerization and/or transcriptional activation. Total cell extracts from the transfected cells were assayed by gel mobility assay using as probe a double-stranded oligonucleotide [proximal element (PE)], encompassing the high affinity HNF1 binding site of the albumin proximal promoter (33). The wild-type protein bound strongly to this probe and the protein–DNA complexes were specifically supershifted by the addition of a polyclonal HNF1 $\beta$  antibody (Fig. 2). Because all *HNF1 $\beta$*  mutations identified so far retained an intact dimerization domain, we also investigate the possibility that mutations defective in DNA-binding may interfere with the function of the wild-type protein through the formation of inactive heterodimers.

As predicted from the structure, the Q147X and R177X mutations were unable to bind DNA (data not shown). We therefore examined the potential effects of these nonsense mutations on the DNA-binding activity of the wild-type protein. The A263fsinsGG mutant (stop codon at residue 265), which has a defective DNA-binding potential and behaves as a dominant-negative mutant both *in vivo* and



**Figure 1.** (A) Schematic representation of HNF1 $\beta$  domain organization. Domains are represented on the basis of three-dimensional studies reported for the structurally related HNF1 $\alpha$  protein (10). The position of the nine mutations analyzed is indicated. The position of an artificially truncated HNF1 $\beta$  mutant (L329X) is also indicated by a dotted line. (B) Pedigree of a French family with the Q454fs mutation in the *HNF1 $\beta$*  gene. (C) Pedigree of a French family with the Q147X mutation in the *HNF1 $\beta$*  gene. Subjects affected are indicated by filled symbols, non-affected by open symbols and probands by an arrow, with a summary of clinical findings in the text. Present subject's age (years), genotype and age at diagnosis of diabetes are indicated. NLS, nuclear localization signal; GCKD, glomerulo-cystic kidney disease.

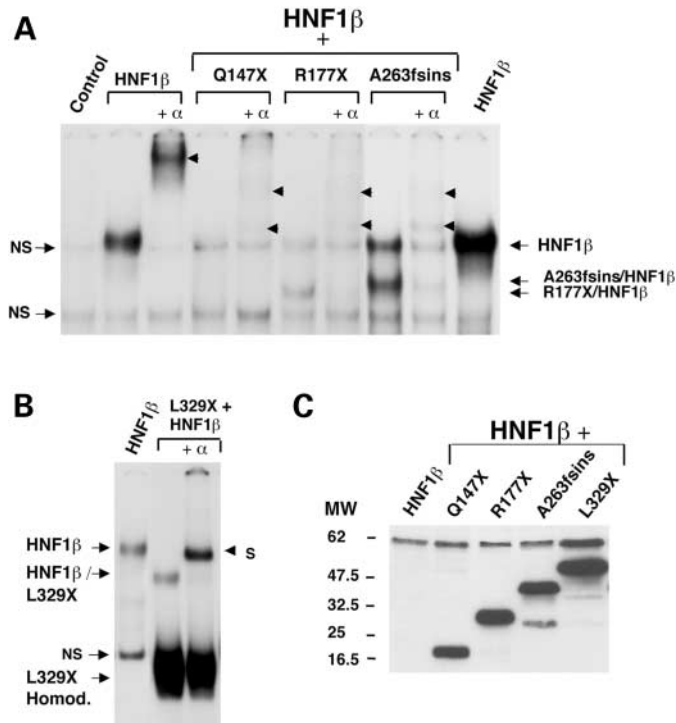
*ex vivo* (20,31) was used as control. As an additional control, an artificially truncated HNF1 $\beta$  protein containing a stop codon at the L329 residue (L329X) was used. L329X binds efficiently DNA as homo- or heterodimers, but does not exhibit transcriptional activity, and possess dominant-negative activity in *ex vivo* reporter assays (see later; Figs 5 and 6).

When Q147X, R177X or A263fsinsGG were co-expressed with the wild-type protein, the DNA-binding activity of HNF1 $\beta$  was significantly attenuated, although equivalent levels of wild-type protein were present in all samples (Fig. 2, compare gel shift in A with western blot in C). The three mutations decreased HNF1 $\beta$  binding activity to a similar degree. As expected, all wild-type HNF1 $\beta$  protein appeared in HNF1 $\beta$ /L329X heterodimeric complexes, with no apparent decrease in the binding activity (Fig. 2B). Notably, truncated proteins were expressed at higher levels than the full-length wild-type protein (Fig. 2C). Unexpectedly, we could detect the formation of very weak faster migrating complexes, corresponding to heterodimers between either the R177X or A263fsinsGG and the wild-type HNF1 $\beta$ , as indicated by the displacement of these complexes with the HNF1 $\beta$  specific antibody. In contrast, we did not detect any complexes corresponding to the binding of Q147X and HNF1 $\beta$  heterodimers, indicating that such heterodimers do not bind DNA (Fig. 2A).

We next investigated whether missense mutations would affect the DNA binding of HNF1 $\beta$ . DNA binding by the

Q136E mutant was not detectable at any protein concentration, indicating that the Q136 residue is essential for binding (Fig. 3A). The K164Q mutant had a barely detectable DNA-binding activity, which could be visualized only after a longer autoradiographic exposure, arguing that this mutation had also a drastic effect on DNA-binding. In contrast, R112P, R165H and R295H mutations interacted with DNA with ~40–60% efficiency compared with wild-type protein (Fig. 3A). DNA-binding and competition analysis using either two high affinity HNF1 binding sites present in the *albumin* (PE site, Fig. 3A) and in the *HNF4 $\alpha$ 1* promoters or two weak sites present in the *Alphafetoprotein* promoter gave similar results (data not shown). Thus, despite their location within the POU<sub>S</sub> and the POU<sub>H</sub> domains, the R112P, R165H and R295H mutations retain significant DNA-binding activity and appear to exhibit similar sequence specificity. These results further suggest that either these residues are not essential for binding or these mutations do not drastically disrupt the structure of the POU<sub>S</sub> and POU<sub>H</sub> domains of HNF1 $\beta$ . In addition, as equivalent amounts of either mutant or wild-type protein were detected in all extracts (Fig. 3B), the missense mutations examined do not appear to affect protein stability.

To detect heterodimer formation in gel mobility shift assays, full-length missense mutations were co-expressed with the truncated L329X protein into HEK293 cells. Equivalent amounts of either mutant or wild-type proteins were



**Figure 2.** Co-expression of various HNF1 $\beta$  truncated mutants and wild-type protein results in decreased binding activity of wild-type HNF1 $\beta$ . Cell extracts were prepared from HEK293 cells transiently transfected with the pCB6 vector containing the wild-type *HNF1 $\beta$* -cDNA and the indicated mutant cDNAs, or both. (A) Extracts producing either HNF1 $\beta$  alone or co-expressing HNF1 $\beta$  and the indicated mutant proteins were used in gel-shift assays, with the labelled PE oligonucleotide (Proximal Element of the rat albumin promoter encompassing the HNF1 $\alpha/\beta$ -binding site) as double-strand probe. The free-probe is not shown. The specific HNF1 $\beta$ -DNA complexes super-shifted by addition of a HNF1 $\beta$ -antibody ( $\alpha$ ), are indicated by head-arrows. Arrows show either HNF1 $\beta$  homodimers or heterodimers between HNF1 $\beta$  and the indicated mutation. Since similar levels of wild-type HNF1 $\beta$  are present in all lanes shown in the western blot (C), the attenuation of HNF1 $\beta$ -DNA complex is probably due to the formation of either non-functional heterodimers between wild-type and mutant proteins, or heterodimeric-complexes of intermediate migration, which are indicated by arrows. (B) Efficient heterodimerization and binding of wild-type HNF1 $\beta$  and L329X proteins. Note that all wild-type protein present in the extracts heterodimerize with L329X, without evidence of attenuation in DNA-binding. (C) Western blot analysis showing comparable expression levels of wild-type protein in all samples, whereas truncated proteins are expressed at higher levels than the wild-type protein. Extracts from transfected cells were resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel and immunoblotted using with a HNF1 $\beta$  antibody directed against residues 30–65. The wild-type (60 kDa) and truncated proteins are labelled with the HNF1 $\beta$  antibody. Molecular weight markers (kDa) are shown on the left. NS, non-specific complexes; S, supershifted complexes.

present in all extracts, except for L329X that was expressed at roughly 5–6 times higher amounts compared with the other HNF1 $\beta$  proteins, to facilitate complete heterodimerization. The presence of DNA-protein complexes with intermediate mobility relative to that corresponding to homodimers, indicated that similarly to wild-type HNF1 $\beta$  protein all mutants did heterodimerize with L329X. Compared with the HNF1 $\beta$ /L329X heterodimers, the binding capacity of these heterodimeric complexes was strongly attenuated in K164Q/L329X and Q136/L329X heterodimers, whereas it was either slightly decreased in R112P/L329X and R165H/L329X heterodimers or

no affected in the case of R295H/L329X heterodimers (Fig. 3C). These results further confirm that the R112P, R165H and R295H mutations do not perturb significantly the structure of the POU<sub>S</sub> and POU<sub>H</sub> bound to DNA.

The frameshift mutation Q454fs, which has intact DNA-binding and dimerization domains, bound efficiently to the HNF1 probe and heterodimerized with L329X protein (Fig. 3D). This mutant protein, as the other truncated forms of HNF1 $\beta$ , was also expressed at higher levels than wild-type protein (data not shown), suggesting that the stability of HNF1 $\beta$  may be modulated by its most C-terminal amino acids.

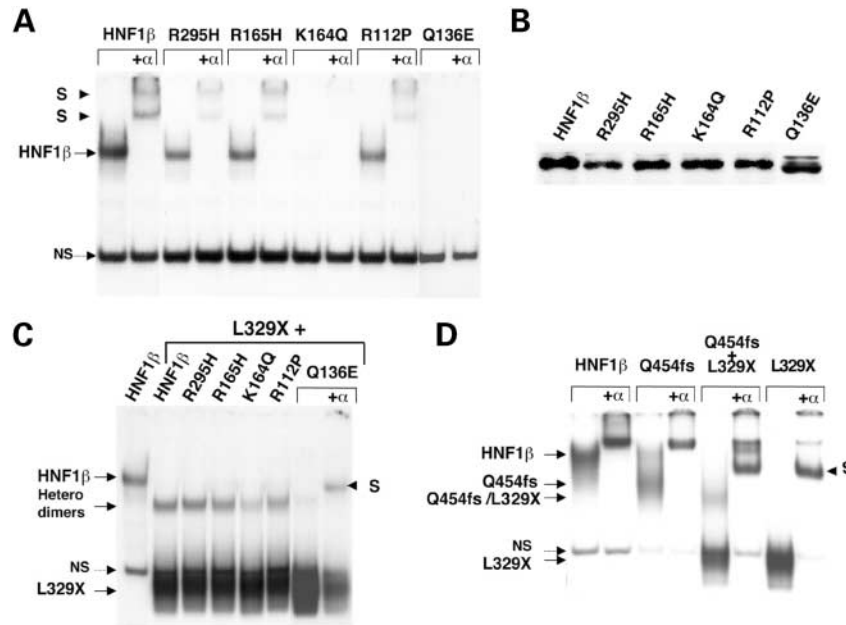
Thus, in agreement with the presence of an intact N-terminal dimerization, all mutant proteins form heterodimers and are able to interfere with the DNA-binding of wild-type HNF1 $\beta$ . Moreover, the DNA-binding capacity of the heterodimeric complexes formed appears to depend on the integrity of the POU<sub>S</sub> domain.

### Intracellular localization of HNF1 $\beta$ mutants

The sub-cellular localization of mutant proteins was examined by indirect immunofluorescence in transfected C33 cells. As shown in Figure 4, the mutations Q147X and R177X were preferentially located in the cytoplasm, whereas the wild-type protein and the other mutants examined, including A263fsinsGG, L329X, Q136E, R112P, K164Q, R165IH, Q454fs, were all localized in the nucleus (data not shown). These results are in agreement with the predicted nuclear localization signal between residues K229 and K237, encompassing a cluster of basic amino acids (KKMRRNRFK), at the N-terminus of the homeodomain (10). These results also indicate that the missense or frameshift mutations do not perturb folding of the protein and its subsequent correct *trans*-location to the nucleus.

We next examined whether heterodimerization between Q147X or R177X and wild-type HNF1 $\beta$  could, at least in part, relocate the wild-type protein into the cytoplasm and therefore interfere with its function. Untagged and *myc*-tagged versions of mutant and wild-type proteins were co-expressed in the cells and their intracellular localization was subsequently examined by indirect immunofluorescence. As shown in Figure 4, co-expression of Q147X or R177X with the *myc*-tagged HNF1 $\beta$  protein did not modify the nuclear localization of the wild-type protein, even though significantly higher levels of truncated proteins were present in the cytoplasm (Fig. 4B; data not shown). Conversely, when mutant *myc*-tagged Q147X or R177X were co-expressed with the wild-type protein, we could detect immunofluorescence signals predominantly in the cytoplasm in most of transfected cells. In the latter case, however, the high expression of truncated proteins and their distribution in the nucleus and cytoplasm, did not allow us to exclude definitely the possibility that a fraction of these proteins may translocate into the nuclei through heterodimerization with wild-type HNF1 $\beta$ .

These results do not support the concept of a dominant-negative action of Q147X or R177X mutations, which could be mediated by an abnormal sub-cellular localization of wild-type HNF1 $\beta$  via heterodimerization.



**Figure 3.** DNA-binding activity and heterodimerization properties of missense and C-terminal frameshift mutations. (A) HEK293 cell-extracts overproducing single mutant proteins or the wild-type HNF1 $\beta$ , were used in gel shift assays using the labelled PE-oligonucleotide. Arrows indicate wild-type or mutant homodimeric DNA-complexes. S, Specific HNF1 $\beta$ -DNA complexes supershifted by the addition of a HNF1 $\beta$  antibody ( $\alpha$ ) are shown by head-arrows. (B) Western blot of the cell-extracts of the indicated proteins used in (A) and revealed using a HNF1 $\beta$  antibody, show that all missense mutations are produced at similar levels. (C) Gel-shift using cell-extracts from cells co-expressing the indicated proteins and the artificially truncated HNF1 $\beta$  protein L329X, showing the formation of heterodimers of intermediate mobility. (D) DNA-binding and heterodimerization of Q454fs mutant. In (C) and (D), arrows show the position of HNF1 $\beta$ , L329X or Q454fs homodimeric complexes as well as the heterodimers between the indicated mutant proteins and L329X, which display an intermediate mobility relative to the corresponding homodimers.

### Transactivation potential of HNF1 $\beta$ mutations

To assess the functional consequences of HNF1 $\beta$  mutations, vectors expressing mutant and wild-type HNF1 $\beta$  proteins were transfected into HEK293 cells, along with CAT-reporter vectors, containing either native target promoters (*HNF4 $\alpha$ 1*, *Alphafetoprotein* and *albumin*) or a chimeric promoter encompassing two HNF1 binding sites upstream of the thymidine kinase promoter (*DTK*-HNF1-CAT). The proximal *HNF4 $\alpha$ 1* promoter (-572/+25) and the *albumin* promoter (-151/+25), contain both a high affinity HNF1 binding site at positions -98 and -60, respectively (32,33). The *Alphafetoprotein* (*Afp*) promoter contains two HNF1 sites at -131 and -67 nucleotide positions (34). These promoters are transactivated by HNF1 $\beta$ , albeit at lower levels than HNF1 $\alpha$  (35).

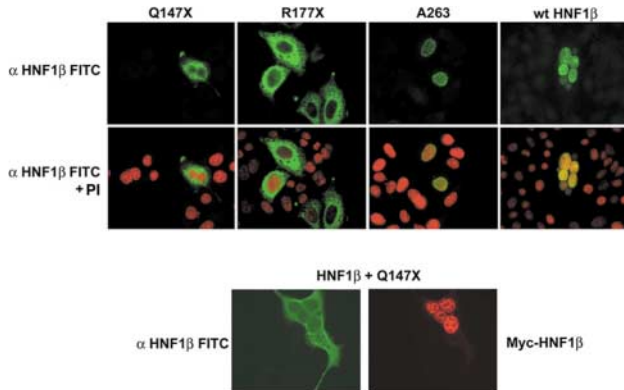
The nonsense mutations Q147X and R177X, which lack part of the DNA-binding domain and the entire transactivation domain, were transcriptionally inactive (data not shown). We assessed their potential interference with wild-type HNF1 $\beta$ -mediated transactivation by co-expressing increasing amounts of mutant proteins with a constant amount of wild-type HNF1 $\beta$ . A 30% decrease in the HNF1 $\beta$  transcriptional activity was observed with CAT-reporter vectors containing either the *HNF4 $\alpha$ 1* promoter (Fig. 5A), the *Afp* promoter (-1023/+33) (data not shown), or the chimeric *DTK*-HNF1-Cat reporter construct (Fig. 5B).

Analysis of individual missense mutations showed that at saturating concentrations the Q136E, R112P, K164Q and R165H mutants were transcriptionally inactive on the three promoters examined, despite the fact that only Q136E and

K164Q mutations abolished DNA binding (Fig. 6; data not shown). Notably, the R295H mutant exhibited a target promoter-specific effect. At lower concentrations of expression vector, the transactivation potential of R295H on the *HNF4 $\alpha$ 1* promoter varies between 75 and 78% of the activation obtained by the wild-type protein, whereas at saturating concentrations it reached wild-type transactivation values (Fig. 6A). In contrast, R295H was not able to transactivate the *Afp* promoter at all tested concentrations (Fig. 6B). Transactivation of the *albumin* promoter by this mutant was barely detectable in cells transfected with lower amounts of expression vector and reached only 25% of the wild-type activity at saturating concentrations (Fig. 6C). These results indicate that there is no a strict correlation between DNA-binding activity and transactivation function of these substitution mutants. The observation that R295H, R165H and R112P mutations retain significant DNA-binding activity, whereas their transactivation capacity is severely reduced, suggests that these mutations most likely interfere with protein-protein interactions that are necessary for transactivation function.

The frameshift Q454fs mutant, at non-saturating amounts of expression vector, exhibited 40–50% decrease in its transcriptional activity compared with that obtained with the wild-type protein, using either the *Afp* or the *albumin* promoter. When assayed on the *HNF4 $\alpha$ 1* promoter, this mutation reduced transcriptional activity by 30% at non-saturating concentrations and by 10% at saturating concentrations. The Q454 residue is located within a QSP-rich domain. Although the





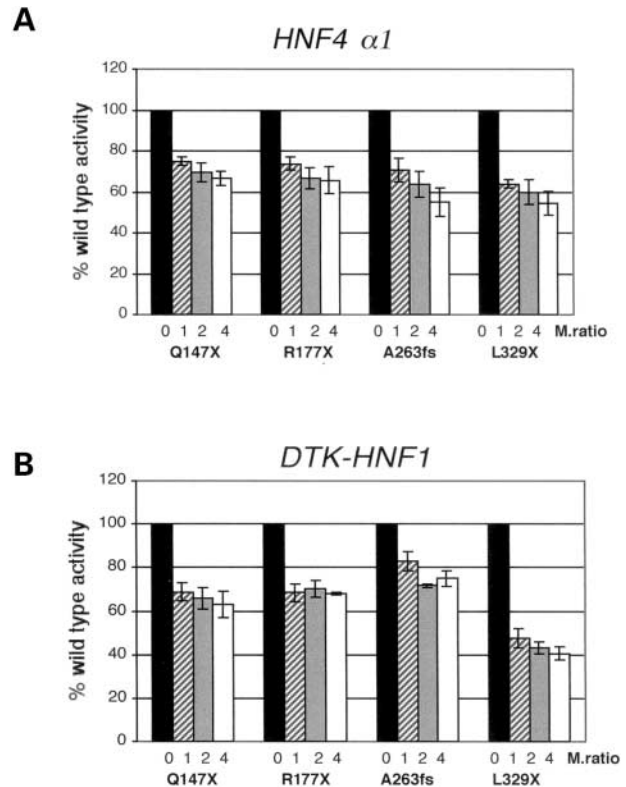
**Figure 4.** Sub-cellular localization of the mutant and wild-type proteins. Immunocytochemistry analyses of C33 cells transiently expressing Q147X and R177X, using an anti-HNF1 $\beta$  antibody (green) and propidium iodide (PI, red) as nuclear staining, reveal that while HNF1 $\beta$  is nuclear, the truncated mutant proteins are predominantly localized in the cytoplasm. To discriminate between wild-type and mutant proteins when co-expressed in C33 cells, myc tagged-HNF1 $\beta$  proteins in the nucleus were visualized with the myc-epitope tag antibody, whereas anti-HNF1 $\beta$  antibody reveals both wild-type and mutant proteins in the nucleus and cytoplasm. The restricted localization of myc-tagged HNF1 $\beta$  proteins in the nucleus indicates that Q147X is unable to sequester wild-type protein to detectable levels in the cytoplasm through heterodimerization.

C-terminal regions of HNF1 $\alpha$  and HNF1 $\beta$  do not exhibit extensive similarity, this domain is partially conserved and corresponds to one of the two activation domains identified in HNF1 $\alpha$  (6). This prompted us to examine the importance of this domain in the transactivation properties of HNF1 $\beta$ . As shown in Figure 6B and C, a HNF1 $\beta$ -mutant construct encompassing a selective in phase deletion of exon 7 (HNF1 $\beta$ -DelEx7) failed to transactivate, suggesting that important determinants for HNF1 $\beta$  transactivation are conferred by the QSP-rich domain.

In contrast to Q147X, R177X and A263fsinsGG mutations, co-expression of missense mutations or Q454fs with either HNF1 $\beta$  or HNF1 $\alpha$  did not decrease their respective transcriptional activity (data not shown). Although these mutant proteins did not interfere with the activity of HNF1 $\beta$  or HNF1 $\alpha$  in co-transfection assays, it is uncertain whether these results reflect the *in vivo* situation. It remains possible that at physiological concentrations, these mutant proteins, in particular those that bind DNA, but show strongly decreased transactivation potential, may partially interfere with the activity of wild-type HNF1 $\beta$  or HNF1 $\alpha$ .

### Interaction of HNF1 $\beta$ with coactivator and co-repressor proteins

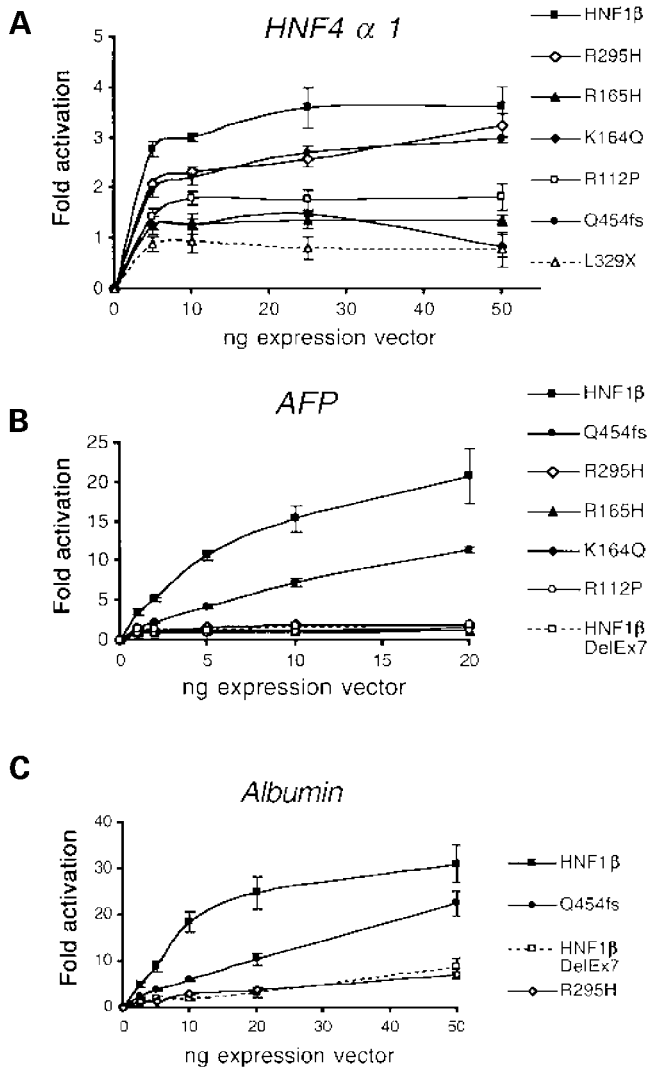
Coactivators possessing an intrinsic histone-acetyltransferase activity have been shown to stimulate transcription through the interaction with specific DNA-binding factors and the simultaneous acquisition of an active configuration [(36) and references therein]. We reasoned that the impaired transactivation function of those HNF1 $\beta$  mutations that retained DNA-binding activity and, can therefore be recruited to target promoters, could be related to a defective interaction with coactivator proteins or an increased interaction with co-repressors.



**Figure 5.** Effect of non-sense mutations Q147X, R177X and A263fsinsGG on the transcriptional activity of wild-type HNF1 $\beta$ . HEK293 cells were transiently transfected with a constant amount of HNF1 $\beta$  expression vector and increasing molar ratios (1 $\times$ , 2 $\times$ , 4 $\times$ ) of the indicated expression vector, together with the mouse *HNF4 $\alpha$ 1-Cat* (A) or *DTK-HNF1-Cat* reporters (B). CAT activity was normalized to transfection efficiency by measuring the  $\beta$ -galactosidase activity obtained with a co-transfected RSV- $\beta$ -galactosidase construct. Normalized CAT activities and standard errors from at least three independent experiments are expressed in percentage of that of the wild-type HNF1 $\beta$  alone shown as black bars (100%). A decrease of ~25–30% in the transactivation potential of HNF1 $\beta$  is reproducibly observed when a 4-molar ratio of the indicated expression vector is co-expressed with the wild-type protein.

The potential direct interaction of wild-type HNF1 $\beta$  with coactivator and co-repressor proteins was first investigated by *in vitro* GST pull-down experiments. As shown in Figure 7A, full length HNF1 $\beta$  interacted efficiently with CBP and PCAF histone-acetyltransferases and the histone-deacetylase, HDAC-1. PCAF interaction was observed by GST fusion proteins, containing either the N- or C-terminal part of HNF1 $\beta$ . CBP and HDAC-1 selectively interacted with either the N-terminal region, or the C-terminal region of the protein, respectively.

We next compared the *in vivo* interaction of the wild-type and four HNF1 $\beta$  mutations with CBP, PCAF and HDAC-1 in co-immunoprecipitation experiments. Nuclear extracts from Cos-1 cells co-transfected with wild-type and mutant pCMV-HNF1 $\beta$  vectors in combination with pCMV-CBP, pCMV-Flag-PCAF or pCMV-Flag-HDAC-1 expression vectors, were immunoprecipitated with either the  $\alpha$ CBP, or  $\alpha$ Flag antibody. The presence of HNF1 $\beta$  proteins in the precipitates was assessed in western blots using  $\alpha$ -myc antibody. Efficient *in vivo* interaction of full-length HNF1 $\beta$  was



**Figure 6.** Differential transactivation of CAT reporter promoter constructs by missense and frameshift HNF1 $\beta$  mutants. HEK 293 cells were transiently transfected with the indicated amounts of mutant and wild-type expression vectors, together with 2  $\mu$ g of a reporter construct containing the indicated promoter. The reporter constructs used contain the mouse *HNF4 $\alpha$ 1* proximal promoter (-572/+25) (A), the mouse *Afp* promoter (-1023/+33) (B) or the rat *albumin* promoter (-386/+4) (C). CAT activity was normalized to transfection efficiency by measuring the  $\beta$ -galactosidase activity obtained with a co-transfected RSV- $\beta$ -galactosidase construct. It is expressed in fold-activation above the activity obtained by the CAT-reporter alone and the values and standard deviations plotted, are the mean of at least four independent experiments. In (B), for visibility reasons, only the standard deviations of the HNF1 $\beta$  and Q454fs transactivation values are shown. The standard deviations of R295H, R165H, K164Q, R112P and HNF1 $\beta$ -Del Ex7 transactivation values ranged from  $\pm 0.05$  to  $\pm 0.3$ .

observed with all three factors (Fig. 7B). All three N-terminal missense HNF1 $\beta$  mutants (R295H, R165H and R112P) were found in association with PCAF and HDAC-1, but not with CBP. In contrast, the C-terminal Q454fs mutant interacted only with CBP, but not with PCAF or with HDAC-1 (Fig. 7B and D). The differential effects of the N- and C-terminal mutations on interactions with CBP and HDAC-1 could be due to the selective association of these two proteins with

the two domains of HNF1 $\beta$  as evidenced by the *in vitro* GST pull-down experiments. PCAF, which associates with both regions of HNF1 $\beta$  *in vitro*, did not interact with the Q454fs mutant, suggesting that the conformation adopted by this protein prevented such association.

### Functional consequences of defective interactions of coactivator and co-repressor proteins with HNF1 $\beta$ mutations

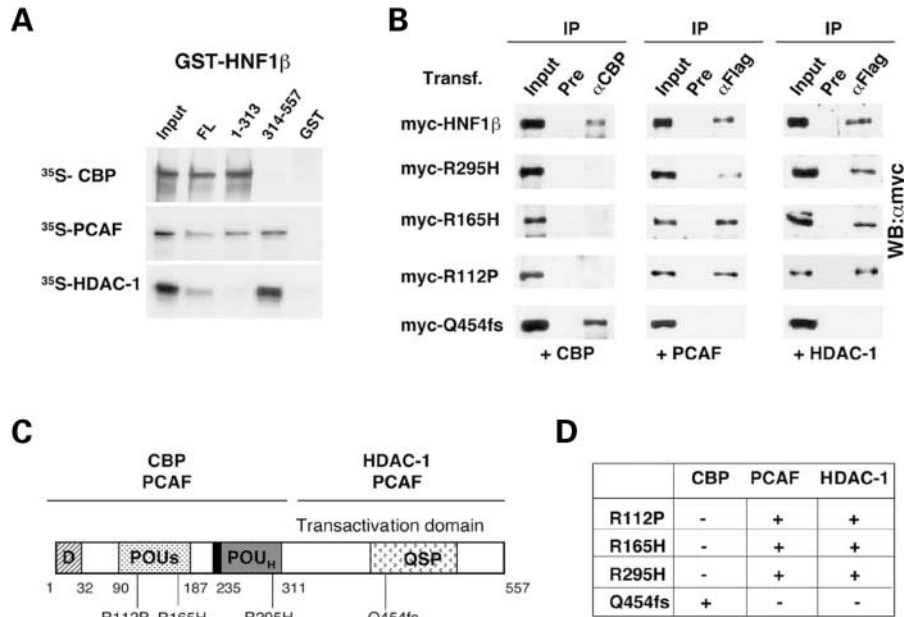
To investigate the functional significance of the identified interactions, we performed transient expression assays in NIH3T3 cells which lack endogenous HNF1 $\beta$  and contain low levels of CBP and PCAF compared with other cell lines. We used a cell line, which contains genome-integrated 3  $\times$  AlbPE-TK-CAT (9), because the chromatin structure adopted by the transiently transfected template may differ from the typical eukaryotic chromatin organization. In this assay, over-expression of CBP only marginally affected wild-type HNF1 $\beta$ -induced transcription (Fig. 8). In contrast, substantial (4.5-fold) activation was observed by PCAF over-expression. This activation, however, was still far below the level of induction observed by co-expression of both CBP and PCAF proteins, which was at the range of  $\sim 24$ -fold (Fig. 8). This suggests that high-level transcriptional activation by wild-type HNF1 $\beta$  requires synergism between the two coactivator proteins. Furthermore, treatment of the cells with TSA, a specific histone-deacetylase inhibitor, resulted in a similarly dramatic (17-fold) activation, indicating that the activity obtained by wild-type HNF1 $\beta$  alone corresponds to a repressed state, possibly through its association with HDAC-1.

We then examined the effect of expressing CBP and PCAF on those mutations whose DNA-binding activity was only weakly or not affected. The transactivation activities obtained by the R112P, R165H, R295H and Q454fs mutants were 14, 9, 21 and 18% of that detected with wild-type HNF1 $\beta$ , respectively. Notably, over-expression of CBP and PCAF only marginally affected the transactivation observed by these mutants. Because all these mutants could interact *in vivo* with either CBP or PCAF, but not with both, this finding further corroborates the idea of the requirement of simultaneous recruitment of both coactivators to achieve high level transcription. In addition, with the exception of R112P mutant, which was induced 4.5-fold, the activity of the other mutants, even those that exhibited efficient *in vivo* interactions with HDAC-1, was not increased by TSA treatment.

### DISCUSSION

In the present study, we examined the molecular consequences of HNF1 $\beta$  mutations identified in patients presenting a wide clinical spectrum, including renal dysfunction and diverse renal abnormalities, diabetes, genital tract malformations and pancreas atrophy.

We investigated two major classes of mutations, substitutions in the POU<sub>S</sub> and POU<sub>H</sub> domains and truncations and/or frameshifts in different functional domains of the protein. Intragenic loss-of-function mutations caused either by



**Figure 7.** *In vitro* and *in vivo* interaction of HNF1 $\beta$  mutants with CBP, PCAF and HDAC-1. (A) *In vitro* GST pull-down experiments were performed with <sup>35</sup>S-labeled CBP, PCAF, or HDAC-1 probes and bacterially expressed GST fusion proteins containing the full-length (FL), N-terminal part (1–313), or C-terminal part (314–557) of HNF1 $\beta$ . (B) Cos-1 cells were transfected with myc epitope-tagged HNF1 $\beta$  vectors together with pCMV-CBP, pCMV-Flag-PCAF, pCMV-Flag-HDAC-1 vectors as indicated. Nuclear extracts from the transfected cells were prepared and subjected to immunoprecipitation with non-immune (Pre), rabbit polyclonal CBP ( $\alpha$ CBP) or mouse monoclonal Flag epitope ( $\alpha$ Flag) antibodies. Co-immunoprecipitated HNF1 $\beta$  proteins were detected in western blots using myc epitope antibody ( $\alpha$ -myc). (C) Schematic representation of HNF1 $\beta$  protein domains and their interactions with CBP, PCAF and HDAC-1. (D) Summary of the interaction pattern of the indicated HNF1 $\beta$  mutations with CBP, PCAF and HDAC-1.

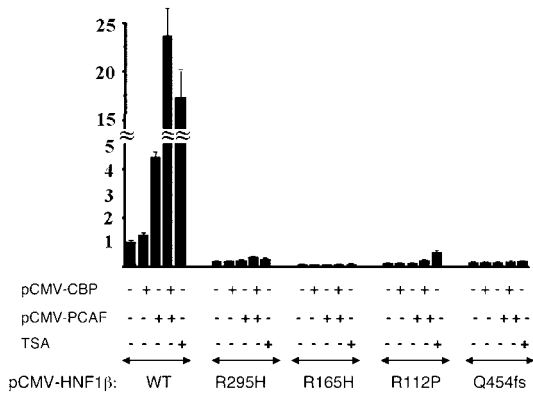
nonsense mutations, deletions or insertions, account for the majority of functionally characterized MODY5 mutations. The mutations Q147X and R177X belong to this class. Our *in vitro* studies show that truncated HNF1 $\beta$  proteins are expressed at reproducibly higher levels compared with the wild-type and can heterodimerize with wild-type protein. Interestingly, heterodimers between R177X or A263fsinsGG and wild-type HNF1 $\beta$ , but not Q147X/HNF1 $\beta$  heterodimers, are able to bind DNA, albeit with a significantly lower affinity than the wild-type homodimers. This suggests that the presence of the two invariant glutamines, Q136 and Q147, which create hydrogen bonds with DNA, allow the truncated POU<sub>S</sub> domain of either R177X or A263fsinsGG to contact DNA, which are subsequently stabilized by the wild-type partner in a heterodimeric complex.

In spite of their ability to heterodimerize with wild-type HNF1 $\beta$ , the Q147X and R177X proteins did not sequester the wild-type protein into the cytoplasm, but exhibited a weak dominant-negative effect in transfection experiments. Nevertheless, it is possible that these mutations may be subject to nonsense mediated mRNA decay (NMD), a surveillance mechanism that remove transcripts with termination signals located at least 50 nucleotides upstream of the terminal exon–exon junction (37). This pathway, however, cannot be verified in human tissues, as expressing tissues are so far not available. On the basis of NMD, haploinsufficiency is the most favoured *in vivo* mechanism underlying the phenotypes associated with heterozygous nonsense alleles (38).

In contrast to premature nonsense mutations, the missense mutations analyzed here, as well as the frameshift Q454fs,

are unlikely to be influenced by NMD (37). The five missense mutations affect residues that are conserved in HNF1 $\beta$  proteins from zebra fish to humans and, with the exception of R112, the corresponding residues are also conserved in the structurally related HNF1 $\alpha$  protein. Four out of five of these mutations are clustered within the POU<sub>S</sub> domain of the protein. This domain interacts with the atypical insertion of the homeodomain to create a stable interface and provides sequence specificity to the DNA interaction (10). The recently solved three-dimensional structures of the DNA-bound POU<sub>S</sub> and POU<sub>H</sub> domains of HNF1 $\alpha$  (10) strongly suggested that the missense mutations would impair DNA binding. Substitutions in Q136 are predicted to disrupt base-specific hydrogen bonds with DNA, those in K164 and R295 are predicted to perturb cationic side-chain/phosphate backbone interactions, whereas substitutions in R165 may disrupt DNA recognition indirectly through perturbations in local environment (10). In agreement with these structural predictions, the mutations Q136E and K164Q abolished DNA binding. However, neither R165H nor R295H significantly affect DNA-binding activity.

Notably, we observed that the R112P, R165H and R295H mutations decrease severely their transcriptional potential, although retain significant DNA-binding capacity and an apparently intact transactivation domain. These data suggest that these substitutions may induce structural changes within the POU<sub>S</sub> and POU<sub>H</sub> domains with effects beyond the DNA-binding domain that influence the transactivation potential of the protein. Specifically, we present evidence that these mutations interfere with protein–protein interactions required for transactivation function. First, we show that different



**Figure 8.** Activation of a genome-integrated HNF1-dependent reporter by HNF1 $\beta$  mutants. NIH3T3 cells with stably integrated 3 $\times$  AlbPE TK-CAT reporter were transfected with 100 ng of wild-type and mutant pCMV-HNF1 $\beta$  vectors together with 3  $\mu$ g of pCMV-CBP or pCMV-PCAF expression vectors, as indicated. Where indicated, the cells were treated with 1  $\mu$ M trichostatin A (TSA) for 12 h before harvest. The bars represent normalized CAT activities and standard errors from three experiments, expressed as fold-activation above the activity obtained with transfection of wild-type HNF1 $\beta$  alone.

functional domains of HNF1 $\beta$  interact *in vivo* with the histone-acetyltransferases CBP and PCAF and with the histone-deacetylase HDAC1. We also show that transcriptional activity of HNF1 $\beta$  in a genome-integrated promoter relies on the synergistic action of CBP and PCAF.

Second, we demonstrate that the loss of interaction with either CBP or PCAF in the different HNF1 $\beta$  mutants correlated with their transcriptional defects. Moreover, the activity of these mutants was not increased by treatment with the specific histone-deacetylase inhibitor TSA. These observations indicate that within the POU<sub>S</sub> and the POU<sub>H</sub> domains, DNA recognition and transcriptional properties are distinct and separable functions.

Previous work established that HNF1 $\alpha$ -mediated transcription requires the synergistic action of CBP and PCAF and that HNF1 $\alpha$  is subject to negative regulation by association with the co-repressors NCor and HDAC1 (36). Here, we showed a similar mechanism for HNF1 $\beta$ . Thus, despite the sequence divergence of the C-terminal transactivation domains, HNF1 $\alpha$  and HNF1 $\beta$  exhibit a strikingly similar pattern of interactions with co-regulators and co-repressors, which function in part via chromatin remodelling. These findings further suggest that the two proteins use similar strategies to mediate transcriptional activation in a chromatin context.

The dramatic activation of HNF1 $\beta$  upon treatment of the cells with TSA or by the simultaneous over-expression of CBP and PCAF, indicates that the repressed activity of wild-type HNF1 $\beta$  can be overcome by either allosteric inhibition of histone-deacetylases or by the recruitment of the histone-acetyltransferases CBP and PCAF. The TSA-mediated induction of the transcriptional activity of the wild-type HNF1 $\beta$  raises the possibility that the use of specific HDAC inhibitors may prove to be a potentially effective therapeutic strategy, as MODY5 patients possess a normal allele.

Our study on the frameshift mutation Q454fs uncovered the potential implication of a QSP-rich domain for HNF1 $\beta$

transcriptional activity. An HNF1 $\beta$  artificial mutant-construct encompassing a selective in phase deletion of exon 7, which primarily encodes this domain, fails to transactivate (Fig. 6). Thus, important determinants for HNF1 $\beta$  transactivation appear to be restricted to a unique C-terminal domain, instead of two activation domains as it was described for HNF1 $\alpha$  (6). The recent identification of two novel HNF1 $\beta$  mutations located within this domain: a S465R substitution (26) and a frameshift mutation at residue 472 (S. Cereghini, unpublished data), further highlights the importance of this domain.

The clinical presentation of the mutations examined here reflects the large spectrum of phenotypes associated with HNF1 $\beta$  mutations, suggesting a broad role for this transcription factor throughout development. However, the wide inter- and intra-familial phenotypic variability precludes a clear phenotype-genotype correlation. Although the mechanisms underlying this phenotypic variability are unknown, it is possible that environmental factors, modifier genes and stochastic developmental events are involved.

In conclusion, this comprehensive study on naturally occurring mutations within HNF1 $\beta$  extends our understanding of the different functional domains of the protein, provides novel insights into structure-function relationships and demonstrates that they impair function by multiple mechanisms. Although the majority of the mutations are clustered within the DNA-binding domain, our results show that the complex syndrome associated with HNF1 $\beta$  mutations may arise not only from defective DNA binding but also from decreased transactivation capacity through impaired recruitment of coactivator proteins. These observations also highlight the potential importance of a precise dosage of HNF1 $\beta$  for normal function during early organogenesis and in the adult.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects and mutation screening

Genomic DNA was prepared from EDTA blood samples and mutation analyses were performed by direct sequencing of polymerase chain reaction (PCR)-amplified HNF1 $\beta$  proximal promoter and the nine coding exons, including intron-exon boundaries. The Q147X family came from France and has been followed by C. Loirat and S. Cloarec, since 1980 (28). The R177X mutation was identified in a 13-year-old girl, whose mother has kidney dysfunction. DNA from the mother was not available. The Ethics Committee of Debré and Necker Hospital approved the study and participants provided a written consent. The mutation screening and detailed clinical features of patients carrying missense mutations have been reported elsewhere (24).

### Expression vectors and reporter plasmids

The wild-type human HNF1 $\beta$  cDNA (kindly provided by I. Bach) was cloned between the *Hind*III and *Xba*I sites of the pCB6 vector. Mutant HNF1 $\beta$  protein-constructs were generated by PCR based site-directed mutagenesis (Quick change<sup>TM</sup>, Stratagene) on the wild-type vector. The mouse HNF4 $\alpha$ 1 promoter (-1.3 kb/+25) was generated by PCR using mouse 129sv genomic DNA. The PCR product was

subcloned into pGEMT-easy vector, verified by sequence analysis, and subsequently cloned into CAT expression vector pBLCAT6 (35). The plasmid DTK-HNF1 was generated by cloning a double-stranded oligonucleotide containing two HNF1 sites of the human albumin promoter upstream to the *thymidine kinase* (*TK*) promoter (−51/+10) in pBLCAT6. To generate wild-type and mutant pCMV-myc-HNF1 $\beta$  expression vectors the open reading frames of the cDNAs were amplified from the pCB6 constructs by PCR using primers containing *Eco*RI and *Xba*I sites and inserted to the same sites of pCDNA-myc vector (Invitrogen). GST fusion protein expression vectors were constructed by subcloning PCR amplified full length and fragments corresponding to 1–313, or 314–557 amino acid regions of HNF1 $\beta$  to pGEX4T1 vectors. The constructions of pCMV-CBP, pCMV-Flag-PCAF and pCMV-Flag-HDAC-1 have been described previously (9,36).

### Cell culture, transient transfection and immunofluorescence conditions

The NIH3T3 cell line containing genome-integrated copies of the 3 $\times$  AlbPE-TK-CAT reporter (39) has been described (9). The human embryonic kidney HEK 293 and human epithelial carcinoma C33 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum as described (40). Cells were plated on 5 cm dishes 1 day before transfection at a density of  $2 \times 10^5$ /dish and transfected overnight using the standard calcium phosphate co-precipitation procedure. An aliquot of 0.5  $\mu$ g of the  $\beta$ -galactosidase expression vector pMJM20 was also included as a control for transfection and recovery efficiency. In co-transfection experiments, 2  $\mu$ g of a promoter construct and the indicated amount of co-transfected expression vector were used. The total amount of expression vector was kept identical using the pCB6 empty vector. Transfected cells were harvested 48 h after washing and subsequently  $\beta$ -gal and CAT assays were performed as described (40). To over-express wild-type and mutated proteins, HEK293 or C33 cells were transfected with the corresponding expression vectors as described earlier. Transfections were performed in 10 cm dishes using either 4  $\mu$ g of expression plasmid and 4  $\mu$ g of pCB6 vector; when co-expressed the wild-type and mutant protein, 4  $\mu$ g of each expression were used.

### Protein extracts and gel mobility-shift assays

To assess the specific DNA-binding affinity of each mutation, cells were transiently transfected with the corresponding expression vectors and the relative amount of proteins in the total cell extract was evaluated by western blotting. Nuclear extracts from transfected cell lines, gel mobility shift assays and western blots were performed as reported (41). Protein concentrations were estimated using the Bradford assay. Double stranded (ds) oligonucleotides used in gel retardation experiments correspond to the HNF1 binding site of the albumin promoter (33).

### Co-immunoprecipitation assays

Nuclear extracts from transfected Cos-1 cells were prepared as described (39), and the lysates were adjusted to 25 mM HEPES pH 7.9, 150 mM KCl, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM NaF, 0.5 mM PMSF and 10 mg/ml aprotinin. After a pre-clearing step with protein G-Sepharose (APB), the extracts were incubated with 4  $\mu$ g/ml rabbit polyclonal CBP, (Santa-Cruz Biotechnology) or mouse monoclonal Flag antibody (Sigma) at 4°C, followed by adsorption to protein G-Sepharose. After extensive washing with the earlier mentioned buffer, the complexes were resuspended in SDS sample buffer, separated by 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and immunostained with mouse monoclonal myc-epitope antiserum (Santa Cruz, Biotechnology). *In vitro* protein–protein interaction assays,  $^{35}$ S-labeled recombinant proteins were synthesized *in vitro* using the TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega), in accordance with the manufacturer's instructions. An aliquot of 2  $\mu$ g of GST-fusion proteins coupled to glutathione Sepharose column (APB) were incubated with the *in vitro* translated proteins in a buffer containing 20 mM HEPES pH 7.9, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP-40, 0.2% BSA, 10% glycerol, 1 mM PMSF and 10  $\mu$ g/ml aprotinin, at 4°C with constant agitation. After excessive washing with the same buffer lacking BSA, the beads were resuspended in SDS-sample buffer and the proteins were separated by electrophoresis in SDS–polyacrylamide gels.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank clinicians and fetopathologists from Debré and Saint-Antoine Hospital, particularly C. Baumann, and AL Delezoide, for their interest. We also thank Professor Grundfeld, D. Chauveau and M.-C. Gubler, for discussions. This work was supported by Association de la Recherche sur le Cancer (ARC) contracts no. 5824 and 3231, by CNRS, and INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale) to S.C., and by GSRT (01ED509) to I.T.

### REFERENCES

1. Odom, D.T., Zizlsperger, N., Gordon, D.B., Bell, G.W., Rinaldi, N.J., Murray, H.L., Volkert, T.L., Schreiber, J., Rolfe, P.A., Gifford, D.K. *et al.* (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*, **303**, 1311–1312.
2. Servitja, J.M. and Ferrer, J. (2004) Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia*, **47**, 597–613.
3. Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M. and Cereghini, S. (1991) vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J.*, **10**, 1445–1457.
4. De Simone, V., De Magistris, L., Lazzaro, D., Gerstner, J., Monaci, P., Nicosia, A. and Cortese, R. (1991) LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J.*, **10**, 1435–1443.
5. Cereghini, S. (1996) Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.*, **10**, 267–282.
6. Toniatti, C., Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R. and Ciliberto, G. (1993) A bipartite activation domain is responsible for the activity of transcription factor *HNF1/LFB1* in cells of hepatic and nonhepatic origin. *DNA Cell Biol.*, **12**, 199–208.

7. Sourdive, D.J., Chouard, T. and Yaniv, M. (1993) The HNF1 C-terminal domain contributes to transcriptional activity and modulates nuclear localisation. *C. R. Acad. Sci. III*, **316**, 385–394.
8. Vaxillaire, M., Abderrahmani, A., Boutin, P., Bailleul, B., Froguel, P., Yaniv, M. and Pontoglio, M. (1999) Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *J. Biol. Chem.*, **274**, 35639–35646.
9. Soutoglou, E., Katrakili, N. and Talianidis, I. (2000) Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol. Cell*, **5**, 745–751.
10. Chi, Y.I., Frantz, J.D., Oh, B.C., Hansen, L., Dhe-Paganon, S. and Shoelson, S.E. (2002) Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1alpha. *Mol. Cell*, **10**, 1129–1137.
11. Lindner, T.H., Njolstad, P.R., Horikawa, Y., Bostad, L., Bell, G.I. and Sovik, O. (1999) A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 2001–2008.
12. Bingham, C., Ellard, S., Allen, L., Bulman, M., Shepherd, M., Frayling, T., Berry, P.J., Clark, P.M., Lindner, T., Bell, G.I. *et al.* (2000) Abnormal nephron development associated with a frameshift mutation in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 beta. *Kidney Int.*, **57**, 898–907.
13. Kolatsi-Joannou, M., Bingham, C., Ellard, S., Bulman, M.P., Allen, L.I., Hattersley, A.T. and Woolf, A.S. (2001) Hepatocyte nuclear factor-1beta: a new kindred with renal cysts and diabetes and gene expression in normal human development. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **12**, 2175–2180.
14. Iwasaki, N., Okabe, I., Momoi, M.Y., Ohashi, H., Ogata, M. and Iwamoto, Y. (2001) Splice site mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 beta gene, IVS2nt + 1G > A, associated with maturity-onset diabetes of the young, renal dysplasia and bicornuate uterus. *Diabetologia*, **44**, 387–388.
15. Bohn, S., Thomas, H., Turan, G., Ellard, S., Bingham, C., Hattersley, A.T. and Ryffel, G.U. (2003) Distinct molecular and morphogenetic properties of mutations in the human HNF1beta gene that lead to defective kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 2033–2041.
16. Ryffel, G. (2001) Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. Review. *J. Mol. Endocrinol.*, **27**, 11–29.
17. Yamagata, K. (2003) Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young. Review. *Endocr. J.*, **50**, 491–499.
18. Barbacci, E., Reber, M., Ott, M., Breillat, C., Huetz, F. and Cereghini, S. (1999) Variant Hepatocyte Nuclear Factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development*, **126**, 4795–4805.
19. Coffinier, C., Thepot, D., Babinet, C., Yaniv, M. and Barra, J. (1999) Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development*, **126**, 4785–4794.
20. Tomura, H., Nishigori, H., Sho, K., Yamagata, K., Inoue, I. and Takeda, J. (1999) Loss-of-function and dominant-negative mechanisms associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations in familial type 2 diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12975–12978.
21. Wild, W., Pogge von Strandmann, E., Nastos, A., Senkel, S., Lingott-Frieg, A., Bulman, M., Bingham, C., Ellard, S., Hattersley, A.T. and Ryffel, G.U. (2000) The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1beta inhibits kidney formation in developing Xenopus embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 4695–4700.
22. Yoshiuchi, I., Yamagata, K., Zhu, Q., Tamada, I., Takahashi, Y., Onigata, K., Takeda, J., Miyagawa, J. and Matsuzawa, Y. (2002) Identification of a gain-of-function mutation in the HNF-1beta gene in a Japanese family with MODY. *Diabetologia*, **45**, 154–155.
23. Carbone, I., Cotellessa, M., Barella, C., Minetti, C., Ghiggeri, G.M., Caridi, G., Perfumo, F. and Lorini, R. (2002) A novel hepatocyte nuclear factor-1beta (MODY-5) gene mutation in an Italian family with renal dysfunctions and early-onset diabetes. *Diabetologia*, **45**, 153–154.
24. Bellanne-Chantelot, C., Chauveau, D., Gautier, J., Dubois-Laforgue, D., Clauin, S., Beaufils, S., Wilhelm, J.M., Boitard, C., Noel, L.H., Velho, G. *et al.* (2004) Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann. Intern. Med.*, **140**, 510–517.
25. Harries, L.W., Ellard, S., Jones, R.W., Hattersley, A.T. and Bingham, C. (2004) Abnormal splicing of hepatocyte nuclear factor-1 beta in the renal cysts and diabetes syndrome. *Diabetologia*, **45**, 937–943.
26. Furuta, H., Furuta, M., Sanke, T., Ekawa, K., Hanabusa, T., Nishi, M., Sasaki, H. and Nanjo, K. (2002) Nonsense and missense mutations in the human hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) and their relation to type 2 diabetes in Japanese. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 3859–3863.
27. Kitanaka, S., Miki, Y., Hayashi, Y. and Igarashi, T. (2004) Promoter-specific repression of hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 beta and HNF-1 alpha transcriptional activity by an HNF-1 beta missense mutant associated with Type 5 maturity-onset diabetes of the young with hepatic and biliary manifestations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 1369–1378.
28. Rizzoni, G., Loirat, C., Levy, M., Milanese, C., Zachello, G. and Mathieu, H. (1982) Familial hypoplastic glomerulocystic kidney. A new entity? *Clin. Nephrol.*, **18**, 263–268.
29. Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B.N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O. *et al.* (1997) Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat. Genet.*, **17**, 384–385.
30. Montoli, A., Colussi, G., Massa, O., Caccia, R., Rizzoni, G., Civati, G. and Barbetti, F. (2002) Renal cysts and diabetes syndrome linked to mutations of the hepatocyte nuclear factor-1 beta gene: description of a new family with associated liver involvement. *Am. J. Kidney Dis.*, **40**, 397–402.
31. Hiesberger, T., Bai, Y., Shao, X., McNally, B.T., Sinclair, A.M., Tian, X., Somlo, S. and Igarashi, P. (2004) Mutation of hepatocyte nuclear factor-1beta inhibits *Pknox1* gene expression and produces renal cysts in mice. *J. Clin. Invest.*, **113**, 814–825.
32. Zhong, W., Mirkovitch, J. and Darnell, J.E.J. (1994) Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7276–84.
33. Cereghini, S., Blumenfeld, M. and Yaniv, M. (1988) A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev.*, **2**, 957–974.
34. Feuerman, M.H., Godbout, R., Ingram, R.S. and Tilghman, S.M. (1989) Tissue-specific transcription of the mouse alpha-fetoprotein gene promoter is dependent on HNF-1. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 4204–4212.
35. Haumaitre, C., Reber, M. and Cereghini, S. (2003) Functions of HNF1 family members in differentiation of the visceral endoderm cell lineage. *J. Biol. Chem.*, **278**, 40933–40942.
36. Soutoglou, E., Violet, B., Vaxillaire, M., Yaniv, M., Pontoglio, M. and Talianidis, I. (2001) Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *EMBO J.*, **20**, 1984–1992.
37. Le Hir, H., Nott, A. and Moore, M.J. (2003) How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 215–220.
38. Inoue, K., Khajavi, M., Ohyama, T., Hirabayashi, S.I., Wilson, J., Reggin, J.D., Mancias, P., Butler, I.J., Wilkinson, M.F., Wegner, M. *et al.* (2004) Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat. Genet.*, **36**, 361–369.
39. Ktistaki, E. and Talianidis, I. (1997) Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science*, **277**, 109–112.
40. Power, S.C. and Cereghini, S. (1996) Positive regulation of the vHNF1 promoter by the orphan receptors COUP-TF1/Ear3 and COUP-TFII/Arp1. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 778–791.
41. Cereghini, S., Ott, M.O., Power, S. and Maury, M. (1992) Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development*, **116**, 783–797.



# SUMO-Dependent Compartmentalization in Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear Bodies Prevents the Access of LRH-1 to Chromatin

Angeliki Chalkiadaki and Iannis Talianidis\*

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

Received 16 December 2004/Returned for modification 25 January 2005/Accepted 21 March 2005

**Posttranslational modification by SUMO elicits a repressive effect on many transcription factors. In principle, sumoylation may either influence transcription factor activity on promoters, or it may act indirectly by targeting the modified factors to specific cellular compartments. To provide direct experimental evidence for the above, not necessarily mutually exclusive models, we analyzed the role of SUMO modification on the localization and the activity of the orphan nuclear receptor LRH-1. We demonstrate, by using fluorescence resonance energy transfer (FRET) and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assays, that sumoylated LRH-1 is exclusively localized in promyelocytic leukemia protein (PML) nuclear bodies and that this association is a dynamic process. Release of LRH-1 from nuclear bodies correlated with its desumoylation, pointing to the pivotal role of SUMO conjugation in keeping LRH-1 in these locations. SUMO-dependent shuttling of LRH-1 into PML bodies defines two spatially separated pools of the protein, of which only the soluble, unmodified one is associated with actively transcribed target genes. The results suggest that SUMO-PML nuclear bodies may primarily function as dynamic molecular reservoirs, controlling the availability of certain transcription factors to active chromatin domains.**

The selectivity of gene expression is mainly controlled by the limited ability of transcription factors to access the genome. Besides alterations of chromatin structure, other processes, such as the positioning of genes within the nucleus and compartmentalization of the proteins that regulate their expression, have been implicated in the pathways determining the specificity of gene activation (9, 15, 30). Covalent attachment of the small-ubiquitin-related modifier (SUMO) to proteins has been characterized as a modification with diverse effects, including targeting of the substrates to specific nuclear territories (17, 42, 46, 52). For example, sumoylation is required for the targeting of the cytoplasmic nuclear import factor RanGAP1 to the nuclear pore complex or to mitotic spindles and kinetochores in dividing cells (24, 32, 33). Furthermore, under conditions that allow SUMO conjugation, several proteins, including transcription factors, have been found to localize in nuclear speckles (38, 40, 41), although direct evidence for the identity of the proteins at the nuclear speckles as SUMO-modified ones is still missing.

These sites of accumulations often coincide with the nuclear bodies associated with promyelocytic leukemia protein nuclear bodies (PML-NBs). PML-NBs are nuclear matrix-associated structures, ranging in size from 0.2 to 1  $\mu\text{m}$  (7, 52). Besides PML, several other proteins accumulating in these structures have been identified. These include SUMO-1, Sp100, Daxx, Rb, BLM, CBP, and p53, suggesting roles in DNA replication and repair, cell cycle control, apoptosis, and transcription (1, 6, 23, 29, 50, 51). SUMO modification of several of the above components, including the PML protein itself, is important for their recruitment to the PML-NBs and consequently for the

proper formation of the nuclear domain (52). Although several lines of evidence suggest that PML-NBs may play a role in the regulation of gene expression (3, 5, 47, 52), the relationship between SUMO modification-dependent compartmentalization of transcription factors into these structures and their function on target genes is less well understood.

To address this question, we studied the role of SUMO modification on the localization and the activity of the orphan nuclear receptor LRH-1 (for liver receptor homologue 1; also known as FTF and CPF). LRH-1 plays a crucial role in liver development during early embryogenesis in controlling cell proliferation and renewal of intestinal crypt cells and in the regulation of cholesterol-bile acid homeostasis in adult hepatocytes (8, 12, 20, 31, 36). Here we show that LRH-1 is reversibly modified by SUMO-1 *in vitro* and *in vivo*. We present evidence for a SUMO-dependent sequestration of LRH-1 into PML-NBs, which precludes its access to active chromatin domains.

## MATERIALS AND METHODS

**Plasmids and antibodies.** The open reading frame of the human LRH-1 cDNA was subcloned into pCDNA-myc (Invitrogen) and pEYFP (Clontech) vectors. Site-directed mutagenesis was performed with the GeneEditor kit (Promega). Glutathione *S*-transferase (GST)-SUMO-1, GST-Ubc9, GST-PIAS $\alpha$ , and pCMV-Flag-PIAS $\alpha$  plasmids were provided by N. Kotaja and J. Palvimo, GST-SAE1/2 was provided by R. Hay, GST-RanBP2 was provided by F. Melchior, and pSG-PML-III and green fluorescent protein (GFP)-PML-III were provided by H. Will. pMT-HA-SUMO-1, pECFP-SUMO-1, pEYFP-SUMO-1, and pCMV-Flag-SuPr-1 were generated by amplifying the open reading frame of SUMO-1 missing the last four amino acids and the entire open reading frame of SuPr1 by PCR, followed by ligation into pMT-HA, pECFP, pEYFP, and pCMV-Flag vectors, respectively. All constructs were verified by DNA sequencing.

Anti-SUMO-1 (FL-101), anti-myc (9E10 and A-14), antihemagglutinin (anti-HA; Y-11), anti-PML, and anti-Cy3-labeled PML (PG-M3) were from Santa Cruz Biotechnology; anti-Pol-II (8WG16) was from Covance; anti-histone 3 (ab8580) was from Abcam; and anti-Flag (M2) and anti-Lamin B were from Sigma. A polyclonal antibody against LRH-1 was raised by immunization of New Zealand White rabbits with bacterially expressed recombinant human LRH-1 protein. In Western blots and immunofluorescence assays horseradish peroxi-

\* Corresponding author. Mailing address: Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, P.O. Box 1527, Vassilika Vouton, 711 10 Herakleion, Crete, Greece. Phone: 30-2810-391163. Fax: 30-2810-391101. E-mail: talianidis@imbb.forth.gr.

dase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin G (Jackson Laboratories) and anti-rabbit or anti-mouse AlexaFluor568 or AlexaFluor488 (Molecular Probes) were used as secondary antibodies, respectively.

**siRNA-mediated knockdown of SUMO-1.** Double-stranded small interfering RNA (siRNA) for targeting human SUMO-1 and control siRNA containing scrambled sequence were purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc-29498 and sc-37007). HepG2 cells were transfected with the siRNAs at 100 nM final concentrations by using the jetSI-ENDO kit (Polyplus). Extract preparations and immunofluorescence analyses were performed 72 h after transfection.

**Immunoprecipitations, Western blots and in vitro SUMO conjugation assays.** Cells were lysed by resuspension in lysis buffer containing 1.72% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris-HCl (pH 6.7), 10% glycerol, 0.33% NP-40, 0.33% sodium deoxycholate, 10 mM *N*-ethylmaleimide (NEM), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2  $\mu$ g of aprotinin/ml, and 10  $\mu$ g of E64/ml, followed by mild sonication and centrifugation at 12,000  $\times$  *g*. The extracts were either analyzed directly on Western blots or, after a 17-fold dilution with a buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.9), 5% glycerol, 0.1% NP-40, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM NEM, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2  $\mu$ g of aprotinin/ml, and 10  $\mu$ g of E64/ml, subjected to immunoprecipitation as described previously (45). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed as described previously (21, 44) except for the cross-linking step. For the latter, mouse livers were perfused successively with phosphate-buffered saline (PBS), 1% formaldehyde, and 0.125 M glycine for 10 min. Cross-linked nuclei were purified by centrifugation through a sucrose gradient as described previously (45). In re-ChIP assays, after the protein G-Sepharose beads from the primary immunoprecipitation were washed, bound complexes were eluted from the beads by incubation with 10 mM dithiothreitol at 37°C for 30 min. After a 50-fold dilution with 1 $\times$  sonication buffer, the eluates were subjected to immunoprecipitation with the second antibody. Reporter assays were performed as described previously (28).

In vitro sumoylation reactions were performed by using 1  $\mu$ l of in vitro-translated, <sup>35</sup>S-labeled LRH-1 in a 15- $\mu$ l reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, and 2 mM ATP, 50 ng of GST-SUMO-1, 25 ng of GST-SAE1/2, 25 ng of GST-UBC9, and 1  $\mu$ g of GST-RanBP2, or GST-PIAS-1, or GST-PIAS $\alpha$ . After incubation at 30°C for 1 h, the reaction products were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Nuclear matrix isolation was carried out essentially as described in references 22 and 37, except that all buffers were supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche), 10 mM NEM, and 10  $\mu$ g of E64/ml. Briefly, after being washed with PBS, the cells were resuspended in CSK buffer (see below) and incubated for 3 min on ice. After centrifugation for 3 min at 5,000  $\times$  *g*, the supernatant (Nucleocytoplasm) was separated, and the pellet was resuspended in CSK buffer containing 1 mg of RNase-free DNase/ml. After incubation at 37°C for 15 min, the reaction mix was adjusted with ammonium sulfate to 0.25 M final concentration and centrifuged again. The supernatant (chromatin fraction) was saved, and the pellet was extracted with 2 M NaCl. Complete removal of histones and DNA was verified by SDS-PAGE and agarose gel electrophoresis. The final insoluble pellet (nuclear matrix) was resuspended in SDS sample buffer. Equal proportions of each fraction were separated by SDS-PAGE and analyzed in Western blots.

Quantitative assessment of Western blot signals was performed with a Fujifilm LAS-1000 luminescent image analyzer.

**Immunofluorescence and confocal microscopy.** Cells were plated on poly-D-lysine-coated glass coverslips and transfected with various combinations of expression vectors by using the PolyPlus transfection reagent. At 24 to 36 h after transfection the cells were either used for live cell imaging or fixed with 2% paraformaldehyde. Immunostainings were performed as described previously (28). Fluorescence images were obtained on Zeiss AxioScope 2 Plus microscope outfitted with a Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning system and Lasersharp-2000 imaging software.

For fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis the following filter settings were used. Cyan fluorescent protein (CFP) fluorescence was observed by using argon laser 457-nm excitation and 488/10 band-pass emission filters, whereas yellow fluorescent protein (YFP) fluorescence was observed by using argon laser 514-nm excitation and 570LP band-pass emission filters. Photobleaching of YFP fluorescence was achieved by irradiation of the selected cells for 1 min with the 514-nm excitation filter at maximum intensity. Sequential images before or after photobleaching were collected, and pixel intensities of the different regions were analyzed by using NIH Image-J software. FRET efficiency was expressed as the percent increase of prebleach CFP fluorescence in the individual areas compared to that observed after YFP photobleaching.

For fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis, the coverslips were placed in PBS and observed by using argon laser 514-nm excitation and

545/40 band-pass emission filters for YFP and argon laser 488-nm excitation and 515/30 band-pass emission filters for GFP. An approximately 1- $\mu$ m<sup>2</sup> spot was bleached for 2 s at 50 to 60% intensity setting of the appropriate excitation laser, and serial images were collected over a 60-s period. Fluorescence intensities of the bleached areas from five independent experiments were normalized to out-of-focus contribution and are expressed as a percentage of the measured pre-bleach intensities.

In situ permeabilization experiments were performed by treating the cells with 0.5% Triton X-100 containing CSK buffer (10 mM PIPES [pH 6.8], 300 mM sucrose, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA) for 1 min at room temperature. Permeabilization was stopped by fixing the cells with 2% paraformaldehyde or by extraction with lysis buffer.

## RESULTS

**LRH-1 is modified by SUMO-1 in vitro and in vivo.** The LRH-1 protein has three conserved consensus sumoylation sites ( $\Psi$ KXE) at amino acid positions 146, 224, and 264. In order to demonstrate that LRH-1 can be modified by SUMO, we performed Western blot analysis with lysates from HEK293 cells, which were transfected with HA-tagged SUMO-1 and myc-tagged wild type, or SUMO consensus-site mutant forms of LRH-1. A slower-migrating LRH-1 species (~90 kDa) was observed only when LRH-1 was coexpressed with SUMO-1 and the known SUMO E3 ligase PIAS $\alpha$  (25) (Fig. 1A, lane 3). The fact that this band corresponds to SUMO-modified LRH-1 is demonstrated by its dependence on the coexpression of SUMO-1 and PIAS $\alpha$  (Fig. 1A, lanes 1 to 3) and by its disappearance upon coexpression of SuPr-1 (Fig. 1A, lane 4), which is a known SUMO protease (3). Furthermore, we could detect a band with the same mobility in myc-LRH-1 immunoprecipitates with an HA antibody recognizing HA-tagged SUMO-1 and in HA-SUMO-1 immunoprecipitates by using a myc antibody recognizing myc-tagged LRH-1 (Fig. 1B). When the same analyses were performed with the different sumoylation consensus site LRH-1 mutants, the slower-migrating band disappeared only in the case of K224R, suggesting that lysine 224 of LRH-1 is the major SUMO conjugation site (Fig. 1A, lanes 6 to 8).

In order to examine the modification of endogenous LRH-1 proteins, we performed Western blot analysis with nuclear extracts from C3A-HepG2 cells. A slower-migrating  $\alpha$ LRH-1-reactive band (~90 kDa) was observed in addition to the major 55-kDa species, which corresponds to unmodified LRH-1 protein. The identity of the 90-kDa band as SUMO-conjugated LRH-1 was confirmed by Western blot analysis of anti-LRH-1 immunoprecipitates with an  $\alpha$ SUMO-1 antibody (Fig. 1C). Additional evidence for the sumoylation of endogenous LRH-1 was provided by the analysis of cells transfected with SUMO-1 siRNA. In SUMO-1-specific siRNA-transfected cells endogenous SUMO-1 was efficiently knocked down and the slower-migrating band in simple Western blots stained with anti-LRH-1, or in LRH-1 immunoprecipitates probed with anti-SUMO-1, disappeared (Fig. 1D). The specificity of the assay was confirmed by the unaltered expression of LRH-1, or HNF-4 and TFIIB, which were used as additional controls (Fig. 1D).

Next, we tested whether LRH-1 could also be a substrate for SUMO modification in vitro. We used an in vitro sumoylation assay using purified recombinant GST-SUMO-1 protein, E1 (SAE1/2), E2 (Ubc9) enzymes, and various E3 ligases (RANBP2, PIAS1, and PIAS $\alpha$ ). As substrates, we used in vitro-translated <sup>35</sup>S-labeled wild-type LRH-1 or its different



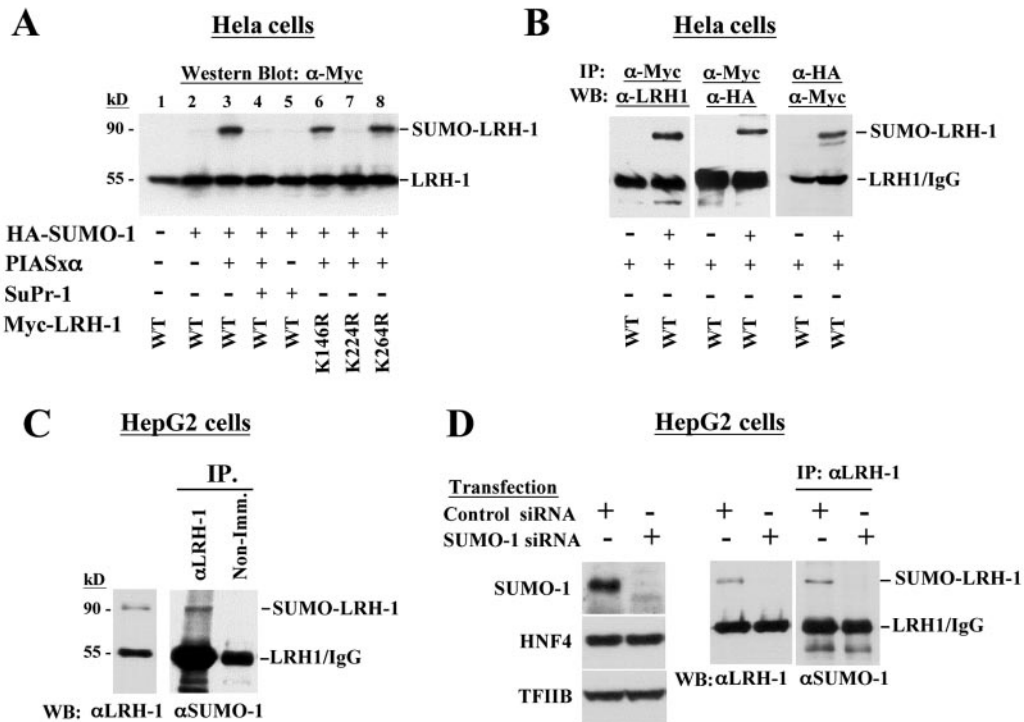


FIG. 1. LRH-1 is modified by SUMO-1 in vivo. (A) Extracts of HEK-293 cells transfected with the indicated expression vectors were analyzed in Western blots with a myc tag-specific antibody to detect modified and unmodified LRH-1. (B) myc-LRH-1 and HA-SUMO-1 proteins were immunoprecipitated with  $\alpha$ myc or  $\alpha$ HA antibody, and the presence of LRH-1 and SUMO-1 in the immunoprecipitates was detected in Western blots by using  $\alpha$ LRH-1,  $\alpha$ myc and  $\alpha$ HA antibodies as indicated. (C) Endogenous LRH-1 from C3A-HepG2 cells was detected in Western blot by an  $\alpha$ LRH-1 antibody (left panel) or immunoprecipitated with  $\alpha$ LRH-1 antibody and analyzed in Western blots with  $\alpha$ SUMO-1 antibody. As a control, nonimmune (Non-Imm.) antiserum was used for immunoprecipitation. (D) C3A-HepG2 cells were transfected with SUMO siRNA and control siRNA as indicated. Cell lysates prepared 72 h after transfection were analyzed in Western blots with antibodies recognizing SUMO-1, HNF4, TFIIIB, and LRH-1 (left and middle panels). Part of the extracts was immunoprecipitated with  $\alpha$ LRH-1 antibody and analyzed in Western blots with  $\alpha$ SUMO-1 antibody (panel on right).

SUMO consensus site mutant derivatives. We could detect SUMO attachment to radiolabeled LRH-1 only when SUMO-1, SAE1/2, Ubc9 and PIAS1, or PIAS $\alpha$  ligases were present in the reaction (Fig. 2, lanes 4 and 5). As expected, unlike the K146R or the K264R mutants, the K224R mutant form of LRH-1 was not modified in vitro (Fig. 2, lanes 8 to 13). Collectively, these results suggest that LRH-1 can be

modified by SUMO-1 on lysine 224 by the PIAS family of E3 ligases and that sumoylated LRH-1 is a substrate for SuPr-1, which can hydrolyze the SUMO moiety from the protein.

**Sumoylated LRH-1 is localized in discrete nuclear dots.** To study the subnuclear localization of LRH-1, we expressed a YFP-LRH-1 fusion protein in HeLa cells. A diffuse nuclear staining was observed (Fig. 3A). However, when the wild-type YFP-LRH-1 was coexpressed with SUMO-1 and PIAS $\alpha$ , which, as judged by Western blot analysis leads to the sumoylation of ca. 50% of the protein (data not shown), a substantial part of the fluorescence signal was accumulated in dot-like structures in the majority of the cells. No such accumulation was observed with the K224R mutant protein or in SuPr-1-expressing cells, suggesting that the observed relocalization of LRH-1 was dependent on sumoylation (Fig. 3A). Although such SUMO-dependent subnuclear redistribution has been observed with other transcription factors (9, 38, 40), the question of whether the proteins accumulating at the nuclear dots correspond to SUMO-modified ones has not been directly addressed before. To this end, we performed FRET after photobleaching assays (25), with CFP-tagged SUMO-1 and YFP-tagged LRH-1 proteins. FRET is based on the ability of a higher-energy donor fluorophore (CFP) to transfer energy to a lower-energy acceptor molecule (YFP), causing sensitized fluorescence of the acceptor and simultaneous quenching of the

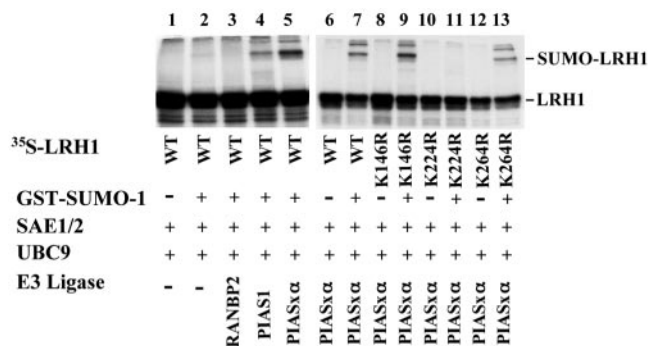


FIG. 2. Modification of LRH-1 by SUMO-1 in vitro. <sup>35</sup>S-labeled wild-type LRH-1 and its mutant forms were synthesized in vitro and incubated in a reaction reconstituted with the indicated recombinant proteins. The reaction products were separated by electrophoresis in SDS-10% polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

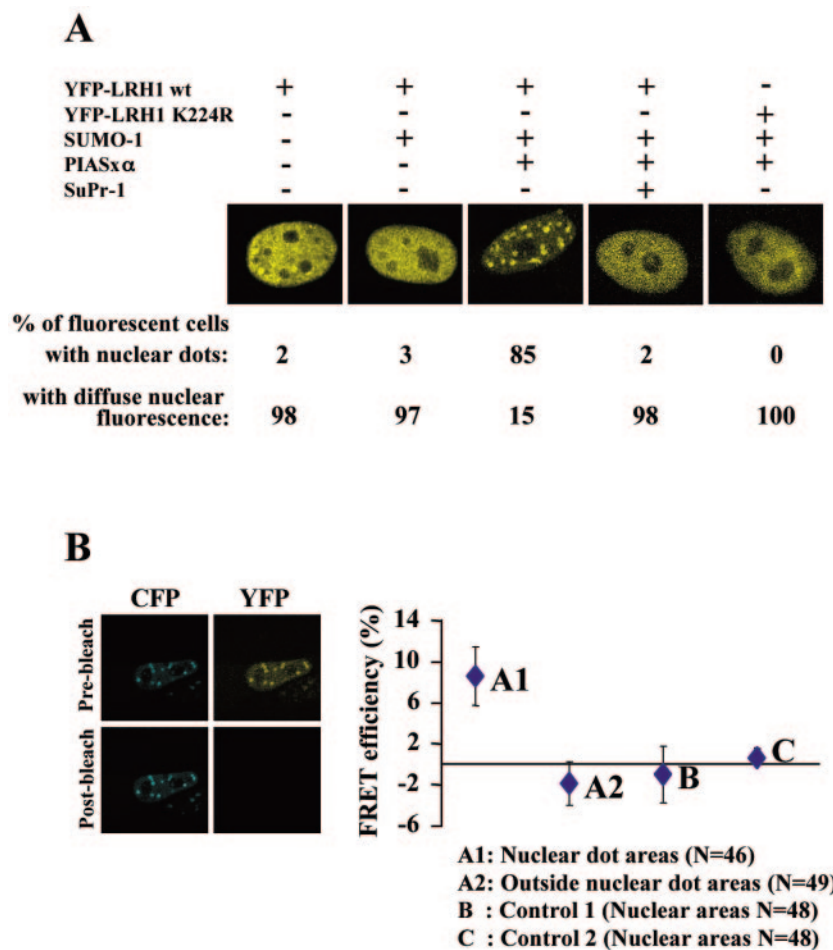


FIG. 3. SUMO-modified LRH-1 is localized in discrete nuclear dots. (A) HeLa cells were transfected with the indicated expression vectors and observed by confocal microscopy. Representative images of cells from several experiments are shown. (B) HeLa cells were transfected with pECFP-SUMO-1, pEYFP-LRH-1, and pCMV-Flag-PIASx $\alpha$ . Sequential CFP and YFP fluorescence images were recorded before and after 1 min of photobleaching of YFP fluorescence by 514-nm laser line. FRET efficiency was expressed as the percent increase of prebleach CFP fluorescence after YFP photobleaching in the nuclear dot areas (A1) and similar-sized areas outside the nuclear dots (A2). In the control experiment B, the cells were cotransfected with pECFP-SUMO-1, pEYFP-LRH-1 K224R, and pCMV-Flag-PIASx $\alpha$ , whereas in the control experiment C, the cells were cotransfected with pECFP-SUMO-1 and pEYFP-LRH-1 without the PIASx $\alpha$  expression vector. The differences in fluorescence intensity in similar-sized nuclear areas were calculated as described above. The graph shows mean values and standard errors from the indicated number (N) of measurements, which were obtained from six to eight different cells.

donor fluorescence, when the two molecules are in close proximity. If FRET occurs, photobleaching of YFP should lead to an increase in the emission of the CFP protein. An average of 8% increase in CFP emission was observed only at the nuclear dots but not in the areas outside them (Fig. 3B, A1 and A2 datum set). The significance of this increase is substantiated by the absence of FRET signal in control experiments where either YFP-LRH-1 K224R was coexpressed with CFP-SUMO-1 and PIASx $\alpha$ , or YFP-LRH-1wt was coexpressed with CFP-SUMO-1 without PIASx $\alpha$  (Fig. 3B, B and C datum set). Because FRET occurs only when the donor and acceptor molecules are within 50 to 100 Å of each other (25), these results can be interpreted either as a true molecular interaction between wtLRH-1 and SUMO-1 or as an interaction of LRH-1 with other sumoylated proteins. The latter scenario can be excluded by the absence of FRET signal in any of the randomly selected nuclear locations under conditions where LRH-1 sumoylation does not occur (e.g., in YFP-LRH-1 K224R-trans-

fected cells or in cells not transfected with PIASx $\alpha$ ). Therefore, we conclude that SUMO-modified LRH-1 is localized solely at the nuclear dot areas, pointing to the existence of two populations of LRH-1 molecules (sumoylated and nonsumoylated), which are distributed into distinct nuclear territories.

**The sites where sumoylated LRH-1 accumulates correspond to PML-containing nuclear bodies.** In order to further characterize the identity of the nuclear domains where sumoylated LRH-1 accumulates, we performed colocalization assays with PML, which is known to be concentrated in similar speckles in a sumoylation-dependent manner (3, 13). In C3A-HepG2 cells endogenous LRH-1 and SUMO-1 were detected throughout the nucleoplasm and at small speckles, which largely overlapped with endogenous PML-containing nuclear dots (Fig. 4A1 and 2). When endogenous SUMO-1 expression was knocked down, LRH-1 disappeared from the nuclear speckles, whereas PML was concentrated in two to four large nuclear aggregates (Fig. 4A3 and 4).

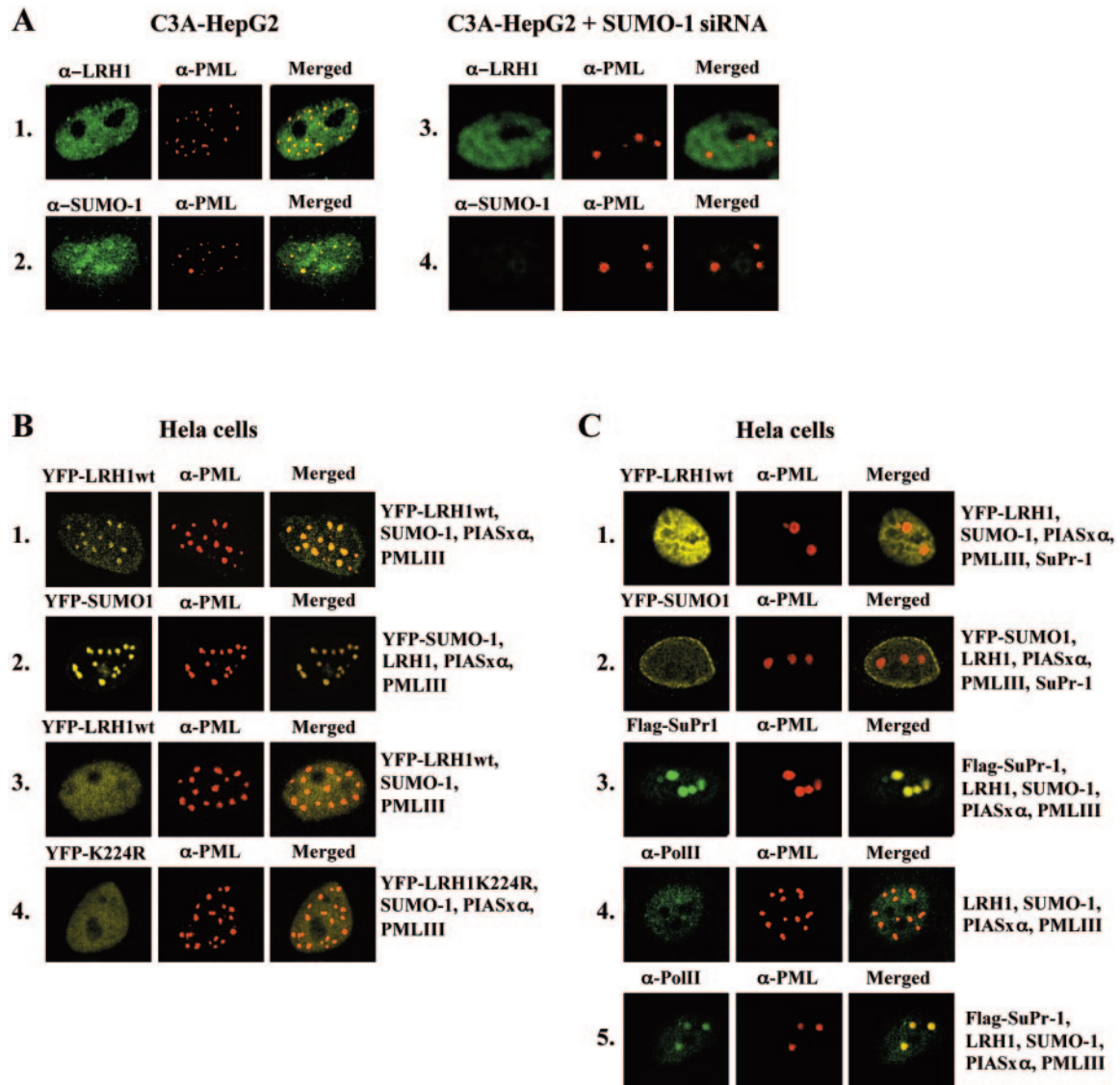


FIG. 4. SUMO-modified LRH-1 is localized in PML-containing nuclear bodies. (A) Untransfected and SUMO-siRNA-transfected C3A-HepG2 cells were stained with  $\alpha$ LRH-1 (rows 1 and 3) and  $\alpha$ SUMO-1 (rows 2 and 4). (B and C) HeLa cells, which were transfected with the expression vectors indicated at the right, were observed by direct fluorescence of YFP or immunofluorescence staining with anti-Flag or anti-RNA Pol II antibodies (left panels). In all cases PML-NBs were detected in the same field by immunofluorescence staining with a TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate)-conjugated PML antibody (middle panels). Merged images are depicted in the right panels.

The correlation between sumoylation of LRH-1 and its colocalization with PML was further corroborated by the analysis of HeLa cells transfected with various combinations of expression vectors that mimic the conditions under which SUMO modification of the ectopically expressed YFP-LRH-1 can occur (transfection with wtLRH-1, PIASx $\alpha$ , and SUMO-1 [Fig. 4B1]) or cannot occur (transfection with wtLRH-1 and SUMO-1 without PIASx $\alpha$  [Fig. 4B3] or transfection with LRH-1 K224R with PIASx $\alpha$  and SUMO-1 [Fig. 4B4]). As expected, colocalization of YFP-LRH-1 with PML in the NBs could be detected in a SUMO-1- and PIASx $\alpha$ -dependent manner (Fig. 4B1). Under the same conditions YFP-SUMO-1 also colocalized with PML (Fig. 4B2). Overexpression of SuPr-1 resulted in a diffuse nuclear distribution of YFP-LRH-1 and YFP-SUMO-1, with some accumulation of the latter at the

nuclear periphery (Fig. 4C1 and 2). Although this could be consistent with the idea that desumoylation of LRH-1 leads to its release from PML-NBs, we note that SuPr-1 action might not be selective because sumoylation of the PML protein itself is important for the integrity of nuclear bodies (3, 13, 34). In agreement with a previous study (3), we observed that SuPr-1 overexpression resulted in the disruption of PML-NBs and that PML was relocated in two to four large, abnormally shaped aggregates (Fig. 4C1 to C3). Interestingly, in addition to the diffuse nuclear fraction, a clear concentration of endogenous RNA polymerase II was detected in these SuPr-1-containing and SUMO-deficient structures, suggesting that they may represent novel PML deposit sites functionally different from those of PML-NBs, which contain sumoylated proteins but do not accumulate RNA polymerase-II (Fig. 4C4 and 5). Because



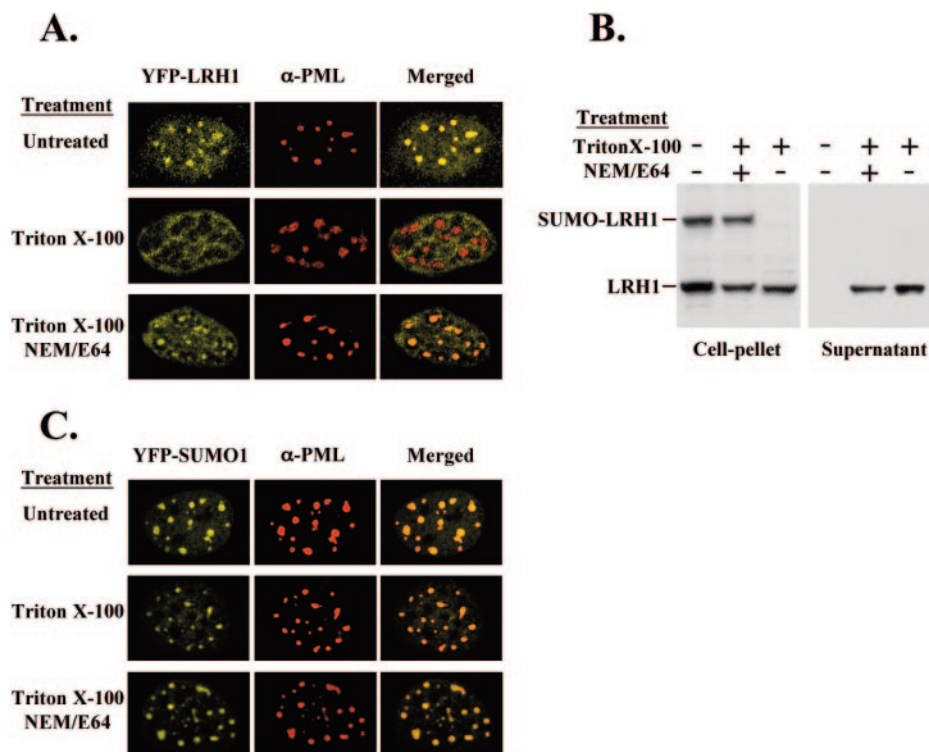


FIG. 5. Release of LRH-1 from PML-NBs correlates with the loss of SUMO moiety. (A) HeLa cells were transfected with YFP-LRH-1, HA-SUMO, PIAS $\alpha$ , and PML-III expression vectors. (C) HeLa cells were transfected with YFP-SUMO-1, myc-LRH-1, PIAS $\alpha$ , and PML-III expression vectors. The cells were incubated in a 0.5% Triton X-100-containing buffer for 1 min before fixation or extraction. Triton X-100 treatments were performed in the presence or absence of 10 mM NEM and 10  $\mu$ g of E64 isopeptidase inhibitors/ml. Confocal microscopic images (A and C) and Western blot analysis of extracts with  $\alpha$ LRH-1 antibody (B) are shown.

of the high density of RNA polymerase II in these SuPr-1-generated territories, it is tempting to speculate that they may represent hot spots of active transcription for several genes. However, the diffuse nucleoplasmic distribution of LRH-1 in SuPr-1-overexpressing cells suggests that the SuPr-1-mediated induction of LRH-1 activity (see below) is more likely a consequence of the release of LRH-1 from PML-NBs and the concomitant increase of the free LRH-1 pool than of its relocation to the above RNA polymerase II-dense nuclear regions.

**Dynamics of SUMO-dependent association of LRH-1 with PML-NBs.** Evidence for the role of desumoylation on the release of LRH-1 from PML-NBs was provided by in situ permeabilization experiments. Our rationale was that if the accumulation of SUMO-LRH-1 at PML-NBs has a "storage" function, then decreasing the intranuclear concentration of LRH-1 might mobilize the molecules located in these compartments. To this end, we treated the cells with 0.5% Triton X-100 for 1 min and, after fixation, examined the distribution of YFP-LRH-1, YFP-SUMO-1, and PML proteins. Under these mild permeabilization conditions, ca. 50% of the LRH-1 protein leaked out of the nuclei, whereas the overall morphology of the cells was preserved. As shown in Fig. 5A, YFP-LRH-1 was cleared from the nuclear dots in Triton X-100-treated cells and was localized mainly at the surrounding areas. On the other hand, under the same conditions, PML and YFP-SUMO-1 remained concentrated in discrete nuclear speckles (Fig. 5A and C). Importantly, when the detergent treatment was performed in the presence of the isopeptidase inhibitors

NEM and E64, which prevent the cleavage of SUMO from modified proteins (14), a substantial proportion of YFP-LRH-1 fluorescence remained associated with the PML-containing nuclear dots (Fig. 5A). Parallel Western blot analysis revealed the loss of SUMO moiety from LRH-1 in Triton X-100-permeabilized cells and its retention when the treatment was performed in the presence of isopeptidase inhibitors (Fig. 5B). These results suggest that lowering the nuclear concentration of proteins leads to desumoylation and the release of LRH-1 from the nuclear speckles, while a large portion of SUMO molecules, which may correspond to certain proteins that retained SUMO-1, cleaved SUMO-1, or free SUMO-1, are retained in PML-NBs.

If the observed isopeptidase inhibitor-sensitive desumoylation and release of LRH-1 is mediated by the activation of the SuPr-1 family of enzymes, the results of the above experiment are in an apparent contradiction with those obtained in SuPr-1-overexpressing cells, where PML-NBs were disrupted. We have to assume that the observed desumoylation of LRH-1 is either not selective and is accompanied by at least a partial disruption of the PML-NBs or that it is mediated by other, specific isopeptidases that do not cleave the SUMO moiety from PML. We favor the first scenario, which is also supported by the less-compact appearance of PML dots and the partial loss of SUMO-1 from PML-NBs in Triton X-100-permeabilized cells (Fig. 5A and C). We also note that high levels of SuPr-1 expression over a long period of time may lead to more dramatic effects compared to those exerted by the activation of

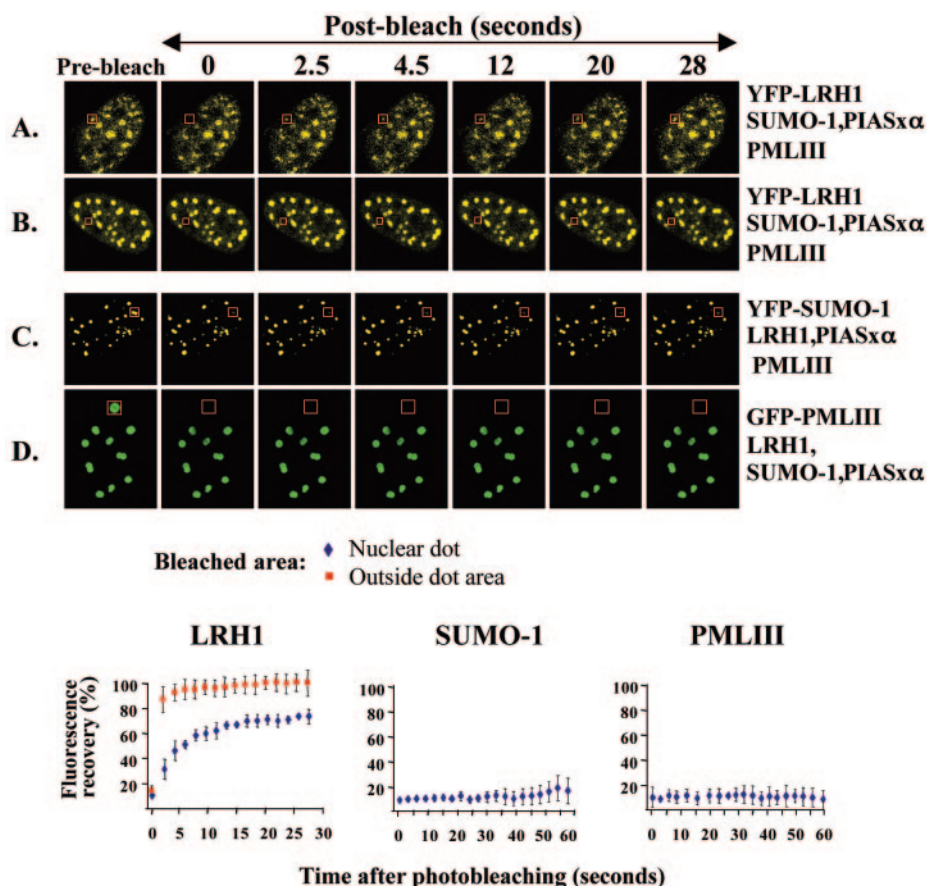


FIG. 6. Dynamic association of LRH-1 with PML-NBs. HeLa cells were transfected with the expression vectors indicated at the right, and expression was detected by direct fluorescence of YFP or GFP in live cells. After targeted photobleaching of the boxed areas corresponding to nuclear dots (A, C, and D) or areas outside the nuclear dots (B), serial images were collected every 2.5 s. Images from one experiment at selected time points are shown. The graphs at the bottom represent fluorescence recovery curves for the bleached areas. The results are presented as mean values and standard errors of the percentages of the postbleach fluorescence intensities at the irradiated areas relative to the prebleach intensity from five independent experiments.

the endogenous protein. In either case, however, the results clearly demonstrate that desumoylation of LRH-1 leads to its dissociation from the PML-NBs.

The kinetics of LRH-1 association with PML-NBs was evaluated by FRAP experiments. In cells expressing YFP-LRH-1, YFP-SUMO-1, or GFP-PML-III, individual nuclear dot areas and areas outside of the dots were photobleached by using a 2-s pulse, and the kinetics of the recovery of fluorescence intensity at the bleached spots were measured. Recovery of YFP-LRH-1 fluorescence in nuclear dot areas reached equilibrium at ca. 75% of the prebleach intensity within 15 s, pointing to the existence of a highly mobile and a relatively immobile population of the protein (Fig. 6A). In areas outside the nuclear speckles almost full recovery of YFP-LRH-1 fluorescence was observed within 2.5 s (Fig. 6B). The existence of an immobile fraction in the nuclear speckles and the difference in residence time between the two territories (dots and outside dot areas) provide further support for the idea that PML-NBs may function as molecular reservoirs of nuclear LRH-1. In agreement with a previous report, PML protein residing at NBs was found to be immobile (Fig. 6D), which is consistent with the nature of structural proteins that contribute to the integrity of NBs (6). Interestingly, however, SUMO-1 was also

found to be a relatively immobile protein (Fig. 6C). This is most likely due to the sumoylation of immobile PML and other structural components (e.g., SP100) of the NBs, without precluding the possibility that NB-associated SUMO-1 stably resides in these structures as part of the sumoylation machinery in reserve for modification of incoming protein substrates.

Taken together, these results suggest that association of LRH-1 with PML-NBs is a dynamic process, which involves rapid sumoylation and desumoylation-driven exchange of the majority of LRH-1 protein residing in these structures.

**Sumoylation negatively regulates LRH-1 transcriptional activity by excluding it from active chromatin domains.** The regulated SUMO-dependent shuttling of LRH-1 into PML-NBs defines two spatially sequestered pools of the protein with apparently different roles in transcription. Therefore, we analyzed the functional consequence of sumoylation on the transcriptional activity of LRH-1 and on its recruitment to target genes in the context of chromatin. In transient-transfection assays the sumoylation-deficient mutant of LRH-1 exhibited an approximately twofold increased transactivation capacity (Fig. 7A). A similar level of increase in wtLRH-1-mediated transcription was observed in SuPr1-transfected cells, suggesting that sumoylation elicits a repressive effect on the transcrip-

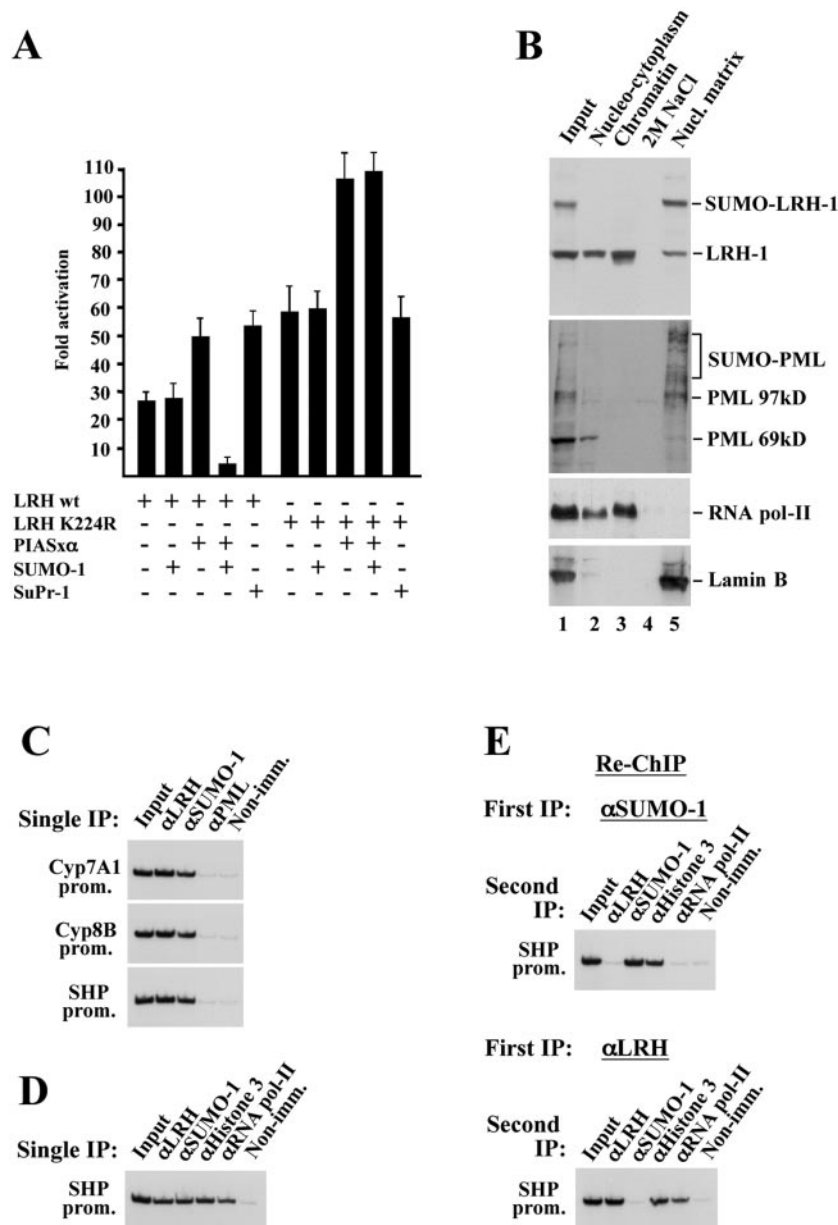


FIG. 7. SUMO-modified LRH-1 is not associated with transcriptionally active LRH-1 target genes in vivo. (A) Sumoylation has a repressive effect on the transactivation potential of LRH-1. HeLa cells were transfected with the SHP-luc reporter containing the 500-bp proximal promoter region of the SHP gene in front of firefly luciferase cDNA, together with the indicated expression vectors. The bars represent mean values and standard errors of normalized luciferase activities from three independent experiments and are expressed as the fold increase over the values obtained from cells transfected with the reporter alone. (B) C3A-HepG2 cells were sequentially extracted with Triton X-100 (Nucleocytoplasm), DNase I, and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Chromatin), and 2 M NaCl. Equal aliquots of each fraction and the solubilized pellet (Nucl. Matrix) were subjected to SDS-PAGE and, after being blotted to nitrocellulose membranes, were stained with the indicated antibodies. (C and D) ChIP assays were performed with the indicated antibodies by using cross-linked, soluble chromatin from mouse livers. LRH-1 target promoters (CYP7A1, CYP8B, and SHP genes) in the immunoprecipitates were detected by radioactive PCR. (E)  $\alpha$ SUMO-1 (top panel) or  $\alpha$ LRH-1-immunoprecipitated (bottom panel) complexes (1st IP) were eluted from the protein G-Sepharose beads and, after dilution, were subjected to a second immunoprecipitation step with the indicated antibodies (2nd IP) and analyzed by radioactive PCR.

tional activity of LRH-1. Although in our Western blot assays (Fig. 1) we could not observe sumoylated LRH-1 in cells transfected with wtLRH-1 alone, the different transactivation potential of wild-type and mutant LRH-1 may be explained by assuming that some of the overexpressed wild-type protein became sumoylated by endogenous SUMO-1 and PIASxα which, due to the high turnover of the modification, limited

detection. To clarify this, we performed additional assays by coexpressing LRH-1 with PIASxα and SUMO-1. Interestingly, coexpression of PIASxα alone with either wild-type and the K224R mutant of LRH-1 increased their transactivation potential (Fig. 7A), suggesting that PIASxα can function as a coactivator for LRH-1 independent of sumoylation. However, when SUMO-1 was coexpressed (conditions when sumoylated

LRH-1 can be detected by Western blot analysis), an eightfold decrease in wtLRH-1-induced promoter activity was observed. Importantly, no such repression was evident in LRH-K224R-induced transcription (Fig. 7A). In principle, a repressive effect in reporter assays could be the result of a direct action of SUMO-1 on LRH-1 properties or an indirect effect brought about by the modification of coactivators (e.g., p300) (19) or corepressors (e.g., HDAC) (11, 26, 49), which may modulate LRH-1 activity. Although the results obtained with the sumoylation-deficient LRH mutant argue against the latter possibility, in either of the above cases SUMO is presumed to act on promoter-bound LRH-1-containing transcription complexes. An alternative possibility is that sumoylated LRH-1 cannot access its target genes because it is spatially sequestered to nuclear locations from which active chromatin domains are excluded. Because, as shown above, sumoylated LRH-1 is localized in PML-NBs, one way to distinguish between these possibilities is to determine whether sumoylated LRH-1 and/or PML can associate with chromatin and LRH-1-regulated target genes.

To this end, we first performed a nuclear protein fractionation procedure as described in references 22 and 37. In the first fractionation step, soluble nucleocytoplasmic proteins are removed by extraction with Triton X-100. Chromatin and associated proteins are then released by DNase I digestion and extraction by 0.25 M ammonium sulfate. After being washed with 2 M NaCl, the remaining insoluble material in the pellet is composed of nuclear matrix proteins (22, 37). Equal amounts of the different fractions were analyzed by Western blot analysis, with antibodies to LRH-1, PML, RNA polymerase (Pol) II, and lamin B (Fig. 7B). As expected, RNA Pol II was distributed mainly in the "chromatin" fraction and to a lesser extent in the "nucleocytoplasmic" fraction. Lamin B and sumoylated PML were detected only at the "nuclear matrix" fraction. These results verify that the different fractions are essentially pure or that only minimal cross-contamination occurred during the procedure. The majority of unmodified LRH-1 was detected in the detergent-soluble and chromatin fractions. Importantly, SUMO-modified LRH-1 was solely observed in the final insoluble fraction (Fig. 7B), indicating that sumoylated LRH-1 is associated with the nuclear matrix but not with DNA. Although the above data argue against the possibility that sumoylated LRH-1 is targeted to gene regulatory regions, they do not entirely exclude it. It is still possible that, due to its tight association with components of the nuclear matrix, chromatin-bound SUMO-LRH-1 could not be liberated by DNase treatment or that the DNase-I-released protein was somehow desumoylated.

Therefore, we addressed the issue by using an independent approach. We performed ChIP assays with soluble chromatin prepared from mouse liver cells that were cross-linked in their native tissue environment. We analyzed LRH-1, SUMO-1, and PML occupancy on three well-characterized LRH-1-regulated genes (Cyp7A1, Cyp8B, and SHP). As expected, LRH-1 occupancy was observed at the promoter regions of all three genes (Fig. 7C and D). Interestingly, however, positive ChIP signals could be detected in anti-SUMO-1-immunoprecipitated chromatin, but not in that obtained with anti-PML. To determine whether the observed SUMO-1 signal corresponds to sumoylated LRH-1 and to find a correlation between SUMO-1 oc-

cupancy and the activation state of the genes, we performed sequential ChIP assays. In these experiments SUMO-1-containing, or LRH-1-containing chromatin purified by the first immunoprecipitation was eluted from the protein G-Sepharose beads and subjected to a second immunoprecipitation with antibodies recognizing SUMO-1, LRH-1, histone 3, or RNA Pol II. As shown in Fig. 7E, histone H3, but not LRH-1 or RNA Pol II, could be detected on the SUMO-1-associated SHP promoter. Furthermore, SUMO-1 was absent in LRH-1-occupied chromatin, which contained histone H3 and RNA Pol II. This finding clearly demonstrates that sumoylated LRH-1 is not associated with its target genes. Because RNA Pol II recruitment is a molecular indicator of the activation state of genes, the results point to the existence of two populations of hepatocytes or alleles at any given time: one with active promoters, occupied by unmodified LRH-1 and RNA Pol II, and another with inactive promoters, occupied by an unidentified sumoylated protein(s) but lacking LRH-1 and RNA Pol II.

## DISCUSSION

LRH-1 is an orphan member of the nuclear receptor superfamily, which plays a pivotal role in early endodermal development, whereas in adults it controls the expression of enzymes involved in lipid and bile acid homeostasis (12, 16, 20, 31, 36, 39). In addition, LRH-1 has also been implicated in cell proliferation via cross talk with the  $\beta$ -catenin signaling pathway (8). The functioning of LRH-1 in such diverse biological processes highlights the importance of identification and exploration of potential signaling pathways that may modulate its activity.

We demonstrate here that LRH-1 is a direct substrate for the SUMO conjugation machinery and that sumoylation can modulate its activity. LRH-1 is reversibly modified by SUMO-1 at a single lysine residue, located at the hinge domain of the protein. Several lines of evidence described here suggest that SUMO modification-mediated inhibition of LRH-1 activity is due to its spatial sequestration from active chromatin domains. First, we demonstrate that sumoylated LRH-1 is localized in PML-containing nuclear bodies but not in nuclear territories outside them. Second, sumoylated LRH-1 is not associated with chromatin and its actively transcribed target genes. Third, desumoylation, which leads to the dissociation of LRH-1 from PML-NBs, increases its transcriptional activity.

Various functions have been attributed to PML-NBs, including a role in transcriptional regulation (52). Although the precise mechanism by which PML-NBs regulate gene expression is unknown, accumulating evidence on various transcription factors has led to the proposal of speculative models, which assume that PML-NBs may function either as "storage sites," which can titrate the concentration of soluble factors in the nucleus, or as sites of specific posttranslational modifications (e.g., sumoylation), or as scaffolds into which transcription complexes assemble (52). Our results provide experimental evidence for links between the proposed functions by demonstrating a dynamic, sumoylation-dependent association of LRH-1 with the PML-NBs. The sumoylation machinery at these sites may play an operational role in the supply of active LRH-1 for transcription, as demonstrated by the finding that the release of LRH-1 from PML-NBs requires enzymatic re-



removal of the SUMO moiety. Although the mode of activation of SUMO proteases in response to nuclear protein concentration is not known, it is clear that their function is central to the establishment of a dynamic equilibrium between the two pools of the LRH-1 protein: the one localized at PML-NBs and the other an unmodified soluble pool situated outside the PML-NBs. In this way, SUMO-mediated compartmentalization may play a role in regulating the actual nuclear concentration of the protein available for transcription in addition to or more likely in combination with the pathways that control the production and degradation of LRH-1.

The PML protein itself is also subject to SUMO modification, which is required for the proper formation of the nuclear body (3, 13, 35, 53). Interestingly, global desumoylation of proteins brought about by overexpressing a SUMO protease or by knocking down endogenous SUMO-1 expression results in relocalization of PML into a small number of nuclear structures, which unlike the regular PML-NBs accumulate RNA Pol II. These novel PML deposit sites may therefore represent hot spots of active transcription of genes although, because LRH-1 was not concentrated in these territories, it is unlikely that they contribute to the desumoylation-mediated activation of LRH-1 target genes. Nevertheless, the observation illuminates the plasticity of specific territories within the nuclear environment, where proteins can accumulate in response to different stimuli and possibly exercise distinct biological functions. Consistent with this notion is the recent demonstration of association of PML with nucleoli in response to specific stress signals (2).

SUMO modification of transcription factors is becoming increasingly recognized as an important pathway regulating gene expression (10, 27, 34, 38, 40, 41, 48). Several models have been put forward as possible mechanism(s) for SUMO modification-dependent transcriptional effects, including competition with other modifications, modulation of interactions with DNA and other proteins on the promoters, or the above-mentioned "sequestration model," whereby sumoylation leads to the localization of the transcription factor to subnuclear domains where it cannot access its target genes (4, 17, 18, 42, 46, 52). Although the models described above are not necessarily mutually exclusive, probably no generally applicable mechanism exists and, depending on the modified factor, sumoylation may elicit its transcriptional effects by several means. This scenario is corroborated by our sequential ChIP assays, which detected SUMO-1 or LRH-1 on the promoters but not the two proteins together. The results are consistent with the idea that two populations of hepatocytes or promoter alleles exist at any given time: one with active promoters, occupied by unmodified LRH-1 and RNA Pol II, and another, with inactive promoters occupied by unidentified sumoylated protein(s), which lack LRH-1 and RNA Pol II. This points to the parallel involvement of a direct, LRH-1 modification-independent function of SUMO-1 at the promoters. The recent finding that histone H4 and, to a lesser extent, histones H2A, H2B, and H3 can be modified by SUMO (43), which at least in transfected reporters mediates gene silencing, is in line with our detection of histones but not of an active RNA Pol II-containing preinitiation complex on the SUMO-associated promoter (Fig. 7 and data not shown). Although our results do not provide definite evidence for the presence of sumoylated nucleosomes on the repressed promoters, these results clearly

show that sumoylated proteins (histones or others) can be associated with chromatin, which, as indicated by the absence of PML ChIP signals on these regulatory regions, most likely reside outside the PML-NBs. In this respect we note that a significant amount of SUMO-1 fluorescence signal can be detected throughout the nucleoplasm, outside of the PML-NBs (Fig. 3, 5, and 6). SUMO modification of some of these proteins may affect preinitiation complex formation at the promoters by recruiting corepressor activities. Examples for such direct repression have been provided by studies on Elk-1 and histones, whose sumoylation at promoters can facilitate the recruitment of HDAC or HP-1 repressor proteins (43, 49).

Our results on LRH-1 point to a fundamentally different control mechanism for the set of transcription factors that are modified by SUMO at PML-NBs. Sumoylation of these factors leads to their "storage" at PML-NBs, and thus they become spatially sequestered from active chromatin. SUMO-dependent compartmentalization of LRH-1 is a reversible and highly dynamic process, which may play a fine-tuning role in controlling the availability of this factor to chromatin. PML-NBs, where sumoylated LRH-1 accumulates, are not regarded as sites of active transcription since they are devoid of DNA, but nascent RNAs and transcriptionally active genomic loci are concentrated in their immediate periphery (31, 47). In light of this and the evidence provided here, we propose that sumoylation may act as a "modus operandi" for the formation of dynamic reservoirs of transcription factors in the vicinity of active chromatin domains. Shuttling of transcription factors between these nuclear domains may represent an important control mechanism of gene expression.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to R. Hay, F. Melchior, N. Kotaja, J. Palvimo, and H. Will for providing reagents; N. Katrakili for technical assistance; N. Tavernarakis for help with confocal microscopy; and P. Hatzis for helpful comments on the manuscript.

This study was supported by grants from EU (QLRT-2000-01513 and LSHG-2004-502950) and from GSRT (01ED509).

#### REFERENCES

- Alcalay, M., L. Tomassoni, E. Colombo, S. Stoldt, F. Grignani, M. Fagioli, L. Szekeley, K. Helin, and P. G. Pelicci. 1998. The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.* **18**:1084-1093.
- Bernardi, R., P. P. Scaglioni, S. Bergmann, H. F. Horn, K. H. Vousden, and P. P. Pandolfi. 2004. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* **6**:665-672.
- Best, J. L., S. Ganiatsas, S. Agarwal, A. Changou, P. Salomoni, O. Shirihai, P. B. Meluh, P. P. Pandolfi, and L. I. Zon. 2002. SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol. Cell* **10**:843-855.
- Boggio, R., R. Colombo, R. T. Hay, G. F. Draetta, and S. Chiocca. 2004. A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol. Cell* **16**:549-561.
- Boisvert, F. M., M. J. Hendzel, and D. P. Bazett-Jones. 2000. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J. Cell Biol.* **148**:283-292.
- Boisvert, F. M., M. J. Krullak, A. K. Box, M. J. Hendzel, and D. P. Bazett-Jones. 2001. The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J. Cell Biol.* **152**:1099-1106.
- Borden, K. L. 2002. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol. Cell Biol.* **22**:5259-5269.
- Botrugno, O. A., E. Fayard, J. S. Annicotte, C. Haby, T. Brennan, O. Wendling, T. Tanaka, T. Kodama, W. Thomas, J. Auwerx, and K. Schoonjans. 2004. Synergy between LRH-1 and  $\beta$ -catenin induces G<sub>1</sub> cyclin-mediated cell proliferation. *Mol. Cell* **15**:499-509.
- Carmo-Fonseca, M. 2002. The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. *Cell* **108**:513-521.
- Chakrabarti, S. R., R. Sood, S. Nandi, and G. Nucifora. 2000. Posttransla-



- tional modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13281–13285.
11. **Colombo, R., R. Boggio, C. Seiser, G. F. Draetta, and S. Chiocca.** 2002. The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1. *EMBO Rep.* **3**:1062–1068.
  12. **del Castillo-Olivares, A., J. A. Campos, W. M. Pandak, and G. Gil.** 2004. The role of alpha1-fetoprotein transcription factor/LRH-1 in bile acid biosynthesis: a known nuclear receptor activator that can act as a suppressor of bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**:16813–16821.
  13. **Duprez, E., A. J. Saurin, J. M. Desterro, V. Lallemand-Breitenbach, K. Howe, M. N. Boddy, E. Solomon, H. de The, R. T. Hay, and P. S. Freemont.** 1999. SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localization. *J. Cell Sci.* **112**:381–393.
  14. **Eloranta, J. J., and H. C. Hurst.** 2002. Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumoylated in vivo. *J. Biol. Chem.* **277**:30798–30804.
  15. **Emerson, B. M.** 2002. Specificity of gene regulation. *Cell* **109**:267–270.
  16. **Fayard, E., J. Auwerx, and K. Schoonjans.** 2004. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism, and steroidogenesis. *Trends Cell Biol.* **14**:250–260.
  17. **Gill, G.** 2003. Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**:108–113.
  18. **Gill, G.** 2004. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* **18**:2046–2059.
  19. **Girdwood, D., D. Bumpass, O. A. Vaughan, A. Thain, L. A. Anderson, A. W. Snowden, E. Garcia-Wilson, N. D. Perkins, and R. T. Hay.** 2003. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol. Cell* **11**:1043–1054.
  20. **Goodwin, B., S. A. Jones, R. R. Price, M. A. Watson, D. D. McKee, L. B. Moore, C. Galardi, J. G. Wilson, M. C. Lewis, M. E. Roth, P. R. Maloney, T. M. Willson, and S. A. Kliewer.** 2000. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* **6**:517–526.
  21. **Hatzis, P., and I. Talianidis.** 2002. Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol. Cell* **10**:1467–1477.
  22. **He, D. C., J. A. Nickerson, and S. Penman.** 1990. Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* **110**:569–580.
  23. **Hodges, M., C. Tissot, K. Howe, D. Grimwade, and P. S. Freemont.** 1998. Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am. J. Hum. Genet.* **63**:297–304.
  24. **Joseph, J., S. H. Tan, T. S. Karpova, J. G. McNally, and M. Dasso.** 2002. SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J. Cell Biol.* **156**:595–602.
  25. **Karpova, T. S., C. T. Baumann, L. He, X. Wu, A. Grammer, P. Lipsky, G. L. Hager, and J. G. McNally.** 2003. Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J. Microsc.* **209**:56–70.
  26. **Kirsh, O., J. S. Seeler, A. Pichler, A. Gast, S. Muller, E. Miska, M. Mathieu, A. Harel-Bellan, T. Kouzarides, F. Melchior, and A. Dejean.** 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J.* **21**:2682–2691.
  27. **Kotaja, N., U. Karvonen, O. A. Janne, and J. J. Palvimo.** 2002. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol. Cell Biol.* **22**:5222–5234.
  28. **Ktistaki, E., and I. Talianidis.** 1997. Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* **277**:109–112.
  29. **LaMorte, V. J., J. A. Dyck, R. L. Ochs, and R. M. Evans.** 1998. Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:4991–4996.
  30. **Lemon, B., and R. Tjian.** 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* **14**:2551–2569.
  31. **Lu, T. T., M. Makishima, J. J. Repa, K. Schoonjans, T. A. Kerr, J. Auwerx, and D. J. Mangelsdorf.** 2000. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* **6**:507–515.
  32. **Mahajan, R., C. Delphin, T. Guan, L. Gerace, and F. Melchior.** 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**:97–107.
  33. **Matunis, M. J., E. Coutavas, and G. Blobel.** 1996. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **135**:1457–1470.
  34. **Muller, S., M. Berger, F. Lehembre, J. S. Seeler, Y. Haupt, and A. Dejean.** 2000. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* **275**:13321–13329.
  35. **Muller, S., M. J. Matunis, and A. Dejean.** 1998. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* **17**:61–70.
  36. **Pare, J. F., D. Malenfant, C. Courtemanche, M. Jacob-Wagner, S. Roy, D. Allard, and L. Belanger.** 2004. The fetoprotein transcription factor (FTF) gene is essential to embryogenesis and cholesterol homeostasis and is regulated by a DR4 element. *J. Biol. Chem.* **279**:21206–21216.
  37. **Reyes, J. C., C. Muchardt, and M. Yaniv.** 1997. Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* **137**:263–274.
  38. **Ross, S., J. L. Best, L. I. Zon, and G. Gill.** 2002. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol. Cell* **10**:831–842.
  39. **Sablin, E. P., I. N. Krylova, R. J. Fletterick, and H. A. Ingraham.** 2003. Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol. Cell* **11**:1575–1585.
  40. **Sachdev, S., L. Bruhn, H. Sieber, A. Pichler, F. Melchior, and R. Grosschedl.** 2001. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* **15**:3088–3103.
  41. **Sapetschnig, A., G. Rischitor, H. Braun, A. Doll, M. Schergaut, F. Melchior, and G. Suske.** 2002. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J.* **21**:5206–5215.
  42. **Seeler, J. S., and A. Dejean.** 2003. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:690–699.
  43. **Shio, Y., and R. N. Eisenman.** 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:13225–13230.
  44. **Soutoglou, E., and I. Talianidis.** 2002. Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* **295**:1901–1904.
  45. **Soutoglou, E., B. Viollet, M. Vaxillaire, M. Yaniv, M. Pontoglio, and I. Talianidis.** 2001. Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *EMBO J.* **20**:1984–1992.
  46. **Verger, A., J. Perdomo, and M. Crossley.** 2003. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.* **4**:137–142.
  47. **Wang, J., C. Shiels, P. Sasieni, P. J. Wu, S. A. Islam, P. S. Freemont, and D. Sheer.** 2004. Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J. Cell Biol.* **164**:515–526.
  48. **Yang, S. H., E. Jaffray, R. T. Hay, and A. D. Sharrocks.** 2003. Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol. Cell* **12**:63–74.
  49. **Yang, S. H., and A. D. Sharrocks.** 2004. SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell* **13**:611–617.
  50. **Zhang, Y., and Y. Xiong.** 1999. Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol. Cell* **3**:579–591.
  51. **Zhong, S., P. Hu, T. Z. Ye, R. Stan, N. A. Ellis, and P. P. Pandolfi.** 1999. A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene* **18**:7941–7947.
  52. **Zhong, S., P. Salomoni, and P. P. Pandolfi.** 2000. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat. Cell Biol.* **2**:E85–E90.
  53. **Zhong, S., P. Salomoni, S. Ronchetti, A. Guo, D. Ruggero, and P. P. Pandolfi.** 2000. Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J. Exp. Med.* **191**:631–640.