

500 20 202 419

50376  
1998  
323

**Université des Sciences et Technologies de Lille**

**N° d'ordre**

**Thèse  
Présentée pour l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé**

**par**

**Laurence SUAUD**

**Le récepteur nucléaire HNF-4 humain : expression et activité de  
ses isoformes ; études fonctionnelles de mutants associés à la  
forme MODY 1 du diabète non-insulino dépendant**

Soutenue le 5 novembre 1998 devant la Commission d'examen :

**Président :**

**Rapporteurs :**

**Examineurs**

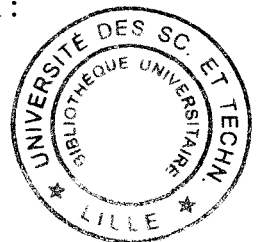
**Pr S. Ball**

**Dr M. Raymondjean**

**Pr G. Rousseau**

**Pr P. Formstecher**

**Dr B. Laine**



Ce travail a été réalisé au sein de l'unité INSERM 459 de la Faculté de Médecine de Lille. Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements :

au Professeur Pierre Formstecher pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour l'intérêt qu'il a porté à l'avancement de mes travaux.

au Professeur Steven Ball pour avoir accepté de présider le jury de thèse.

au Docteur Michel Raymondjean et au Professeur Guy Rousseau pour avoir accepté de juger ce travail et de siéger à ce jury.

au Docteur Bernard Laine pour m'avoir encadré tout au long de ce travail, pour votre gentillesse et surtout pour m'avoir supportée durant ces trois années.

à tous mes petits camarades, Nono, Anne-France, Marie, Mad, Céline, Nicolas...et les autres, pour leur sympathie, leur bonne humeur. Je vous lègue ma tasse à café!!!!

Résumé	4
Publications et communications	5
Abréviations	6
Revue générale	8
Chapitre I : HNF-4 facteur de transcription	9
<b>A. Organisation structurale et fonctionnelle :</b>	9
<b>I. Structure modulaire caractéristique partagée avec les récepteurs nucléaires :</b>	11
1. Notion de domaine :	11
2. La liaison à l'ADN :	12
2.1 Les éléments de réponse :	12
2.2. Les groupes de récepteurs :	13
2.3 Les doigts de zinc et les boîtes fonctionnelles :	15
2.4 Rôle de la phosphorylation dans la liaison à l'ADN :	17
3. La dimérisation :	18
3.1 Les motifs de dimérisation :	18
3.2. <u>Caractéristique structurale conférant à HNF-4 l'homodimérisation exclusive :</u>	19
4. La transactivation :	20
4.1 Les motifs de transactivation :	20
4.2 Partenaires de HNF-4 :	23
4.2.1 Le complexe d'initiation :	23
4.2.2 Les cofacteurs :	24
<b>II. Les isoformes de HNF-4 :</b>	27
1. HNF-4 $\alpha$ :	27
2. HNF-4 $\gamma$ :	27
3. HNF-4 $\beta$ :	28
<b>III. Conservation de HNF-4 au cours de l'évolution :</b>	29
<b>B. Les différents rôles de HNF-4.</b>	31
<b>I. Au cours de l'embryogenèse et de la différenciation cellulaire :</b>	31
1. Rôle dans l'embryogenèse et l'organogenèse :	31
2. Rôle de HNF-4 dans la différenciation :	33
2.1 <u>Différenciation des cellules hépatiques :</u>	33
2.2 <u>Différenciation des cellules intestinales :</u>	35

<b>II. Contrôle de l'expression de divers gènes :</b>	36
<b>1 Rôle dans le transport et le métabolisme des lipides :</b>	36
<u>1.1 HNF-4 comme activateur de la transcription :</u>	36
<u>1.2 HNF-4 comme répresseur de la transcription :</u>	38
<b>2 Rôle dans le métabolisme des glucides :</b>	39
<b>3. Rôle dans la synthèse des protéines sériques :</b>	40
<b>4. Rôle dans le métabolisme des acides aminés :</b>	42
<b>5. Facteurs modulant l'activité de HNF-4 :</b>	43
<u>5.1 Synergie entre HNF-4 et d'autres facteurs de transcription :</u>	43
<u>5.2. Rôle de l'alimentation :</u>	43
 <i>Chapitre II : HNF-4 lié au diabète de type 2</i>	45
<b>A. Les diabètes :</b>	45
<b>I Généralités :</b>	45
<b>1 Les diabètes insulino-dépendants :</b>	45
<b>2. Les diabètes non insulino-dépendants :</b>	45
<u>2.1. Facteurs prédisposants à l'apparition du diabète de type 2 :</u>	46
 <b>II. Le diabète de type MODY :</b>	48
<b>1. Le MODY 1 :</b>	49
<b>2. Le MODY 2 :</b>	51
<b>3. Le MODY 3 :</b>	53
<b>4. Le MODY 4 :</b>	53
 <b>B. Facteurs de transcription pancréatiques :</b>	54
<b>I. Morphologie du pancréas :</b>	54
<b>1 Les cellules exocrines :</b>	55
<b>2. Les cellules endocrines :</b>	56
 <b>II. Les facteurs de transcription pancréatiques :</b>	56
<b>1 Les facteurs de transcription intervenant au cours du développement embryonnaire:</b>	57
<u>1.1 les facteurs précoces :</u>	57
<u>1.2. Les facteurs tardifs :</u>	58

<b>2. Les facteurs de transcription intervenant dans le pancréas mature :</b>	59
<u>2.1. Dans les cellules endocrines :</u>	59
<u>2.2. Dans les cellules exocrines :</u>	61
 <i>Résultats et discussion :</i>	63
<b>A. Expression et activité des isoformes de HNF-4 :</b>	65
<b>I. Expression des isoformes de HNF-4 et différenciation de lignées cellulaires humaines à phénotype intestinal.</b>	65
1. Stratégie :	65
2. Résultats :	66
3. Discussion :	73
 <b>II. Modulation de l'activité de l'AF-2 via le domaine F :</b>	76
1. Stratégie :	76
2. Résultats :	76
3. Discussion :	108
 <b>B. Les mutants de HNF-4<math>\alpha</math> liés au MODY 1 :</b>	110
1. Stratégie :	111
2. Résultats :	111
<u>2.1 Etude du mutant V393I :</u>	111
<u>2.2 Etudes des mutants T130I et V255M :</u>	119
<u>2.3 Etude de la mutation HNF-4<math>\alpha</math> E276Q :</u>	124
3. Discussion :	141
4. Conclusion de l'étude des mutants de HNF-4 $\alpha$ liés au MODY 1:	142
 Conclusion	144
Appendice technique	146
Bibliographie	160

## Résumé

Le facteur de transcription Hepatocyte Nuclear Factor-4 (HNF-4) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones. Ces récepteurs possèdent une structure en domaines. Il existe chez l'homme plusieurs isoformes de HNF-4 ( $\alpha 1$  à  $\alpha 6$  et  $\gamma$ ). HNF-4 joue un rôle prépondérant dans l'embryogenèse et dans la différenciation des cellules hépatiques. Il est aussi impliqué dans le métabolisme de nombreux composés dont les glucides. Des mutations dans le gène de HNF-4 $\alpha$  sont associées à la forme MODY 1 du diabète non insulino-dépendant.

En utilisant la cellule Caco-2, modèle représentant la cellule épithéliale intestinale, nous avons montré que les isoformes de HNF-4 ont des taux d'expression différents et que la différenciation cellulaire s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'un nombre limité d'isoformes de HNF-4. Ces isoformes diffèrent surtout par leur domaine F, qui est précisément le domaine qui module l'activité transcriptionnelle de HNF-4 et de son domaine d'activation AF-2.

L'étude des propriétés fonctionnelles (fixation à l'ADN, transactivation, interactions avec d'autres récepteurs) de quatre mutants trouvés chez les patients MODY 1, a permis de définir plusieurs groupes de mutations :

⇒ Les mutations T130I et V255M n'ont aucun effet sur les propriétés fonctionnelles de HNF-4 et correspondent à des polymorphismes.

⇒ Les mutations E276Q et V393I provoquent une perte partielle de l'activité transactivatrice de HNF-4, mais la mutation E273Q en affectant l'expression du facteur de transcription HNF-1, qui est important dans la glycémie, a des conséquences cliniques typiques du MODY.

⇒ Les mutations donnant des formes tronquées de HNF-4 sont associées au MODY 1 typique.

## Publications et communications

### Publications :

**Suaud, L.**, Joseph, B., Formstecher, P., and Laine, B. mRNA expression of HNF-4 isoforms and of HNF-1 alpha/HNF-1 beta variants and differentiation of human cell lines that mimic highly specialized phenotypes of intestinal epithelium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 235(3):820-825, 1997.

Hani, E.H., **Suaud, L.**, Boutin, P., Chèvre, J.-C., Durand, E., Philippi, A., Demenais, F., Vionnet, N., Furuta, H., Velho, G., Bell, G.I., Laine, B., and Froguel, P. A missense mutation in hepatocyte nuclear factor-4 a, resulting in a reduced transactivation activity, in human late-onset non insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 101(3):521-526, 1998.

The activity of the activation function 2 of the human nuclear receptor HNF-4 $\alpha$  is differently modulated by F domains from various origins.

**Suaud Laurence**, Formstecher Pierre and laine Bernard

The E276Q mutation in HNF-4 alpha gene which cosegregates with the MODY 1 form of diabetes results in an impaired synergistic enhancement of HNF-4 transactivating activity by COUP TFII.

**SUAUD Laurence**, HEMINOUE Youcef, FORMSTECHEP Pierre and LAINE Bernard  
soumis à Diabetes

### Communications :

“Les isoformes du récepteur nucléaire HNF 4 humain : études structurales et fonctionnelles”  
**Laurence SUAUD**, Céline BRUZI, Jean Pierre BOSSU, Pierre FORMSTECHEP, and Bernard LAINE.

XXIII Forum des JEUNES Chercheurs.

Université de Poitiers 2-5 Juillet 1996.

“The activity of the Activation Function 2 of human HNF-4 is differently modulated by the F domain from various origins, implication in the MODY 1 form of diabetes”.

**SUAUD L.**, Bossu J.P., Hani H., Froguel P., Formstecher P. et Laine B.

1er mini-colloque international de “Biologie et Prospective” : Facteurs de Transcription et régulation de l'expression des Gènes comme Cibles Thérapeutiques.

Luxembourg 28-31 Janvier 1998

Functional analysis of naturally occurring variants in the Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$  gene.

Moller AM., **Suaud L.**, Urhammer SA., Hansen T., Laine B., Pederson O.

Annual Meeting Of the European Association for the study of Diabète. Barcelone Septembre 1998.

## Abréviations

aa : acide aminé

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AF1 : activated function 1

AF2 : activated function 2

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AP-1 : activator protein 1

apo : apolipoprotéine

ARNm : acide ribonucléique messenger

bHLH : basic Helix-Loop-Helix

CBP : CREB-binding protein

C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein

CoA : Coenzyme A

COUP-TF : Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor

CRE : cAMP response element

CREB : cAMP response element binding protein

CTF/NF-1 : CCAAT box transcription factor/nuclear factor 1

Da : dalton (unité de masse)

DBD : DNA binding domain

DID : diabète insulino-dépendant

DNID : diabète non insulino-dépendant

DR : motif directement répété

ER : récepteur des oestrogènes

GLUT-2 : transporteur du glucose-2

GR : récepteur des glucocorticoïdes

GRIP-1 : glucocorticoid receptor-interacting protein

HFN : Hepatic Nuclear Factor

HRE : hormone responsive element

IR : motif répété inversé

LBD : ligand binding domain

M : unité de concentration molaire



MODY : Maturity Onset Diabetes of the Young

N-CoR : nuclear receptor corepressor 1

pb : paire de base

PKA : protéine kinase A

PPAR : peroxisome proliferator activating receptor

PR : récepteur de la progestérone

RXR : récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque

RAR : récepteur de l'acide *all trans* rétinoïque

TR : récepteur de l'hormone thyroïdienne

SMRT : silencing mediator for retinoid-and thyroid-hormone receptors

Sp1 : specificity protein 1

SRC-1 : steroid receptor coactivator 1

VDR : récepteur de la vitamine D

# Revue Générale

## Chapitre I : HNF-4 facteur de transcription

Le facteur de transcription Hepatocyte Nuclear Factor 4 ( HNF-4) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones rétinoïdes, stéroïdes et thyroïdiennes (Sladek *et al.* 1990).

HNF-4 a été découvert dans des extraits de foie de rat, grâce à sa capacité à se fixer sur des séquences d'ADN nécessaires à la transcription du gène de la transthyrétine (TTR) (Costa *et al.* 1989). Une protéine de 455 acides aminés a ainsi été purifiée. Par la suite, HNF-4 a été mis en évidence chez la souris, la drosophile, le xénope et l'homme

### **A. Organisation structurale et fonctionnelle :**

HNF-4 appartient à la super famille des récepteurs d'hormones rétinoïdes, stéroïdes et thyroïdiennes. Le premier récepteur nucléaire cloné a été le récepteur des glucocorticoïdes (GR) en 1985 (Hollenberg *et al.* 1985). Puis le clonage d'autres récepteurs nucléaires comme ceux des oestrogènes (ER), de la progestérone (PR), de la vitamine D (VDR), a mis en évidence les fortes homologues de séquence entre toutes ces protéines. Outre les récepteurs des hormones stéroïdes, thyroïdiennes, des rétinoïdes et de la vitamine D, la superfamille des récepteurs nucléaires comprend de nombreux récepteurs dits orphelins, car leur ligand est inconnu, mais leur structure est apparentée aux précédents. Aucune hormone ou vitamine susceptible de les activer n'a encore été identifiée. Cependant, d'autres types de signaux tels des nutriments ou des intermédiaires métaboliques pourraient activer ces orphelins. Par ailleurs, des récepteurs orphelins peuvent être activés par de multiples voies différentes de la liaison d'un ligand (O'Malley et Conneely, 1992). Parmi celles-ci, les mécanismes de phosphorylation s'appliquent non seulement aux récepteurs orphelins, mais aussi à l'ensemble des récepteurs nucléaires.

Sur le plan phylogénique (Figure 1), HNF-4 est très proche de RXR (récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque). De ce fait, HNF-4 est souvent comparé à RXR sur le plan de ses propriétés de dimérisation et de liaison à l'ADN.

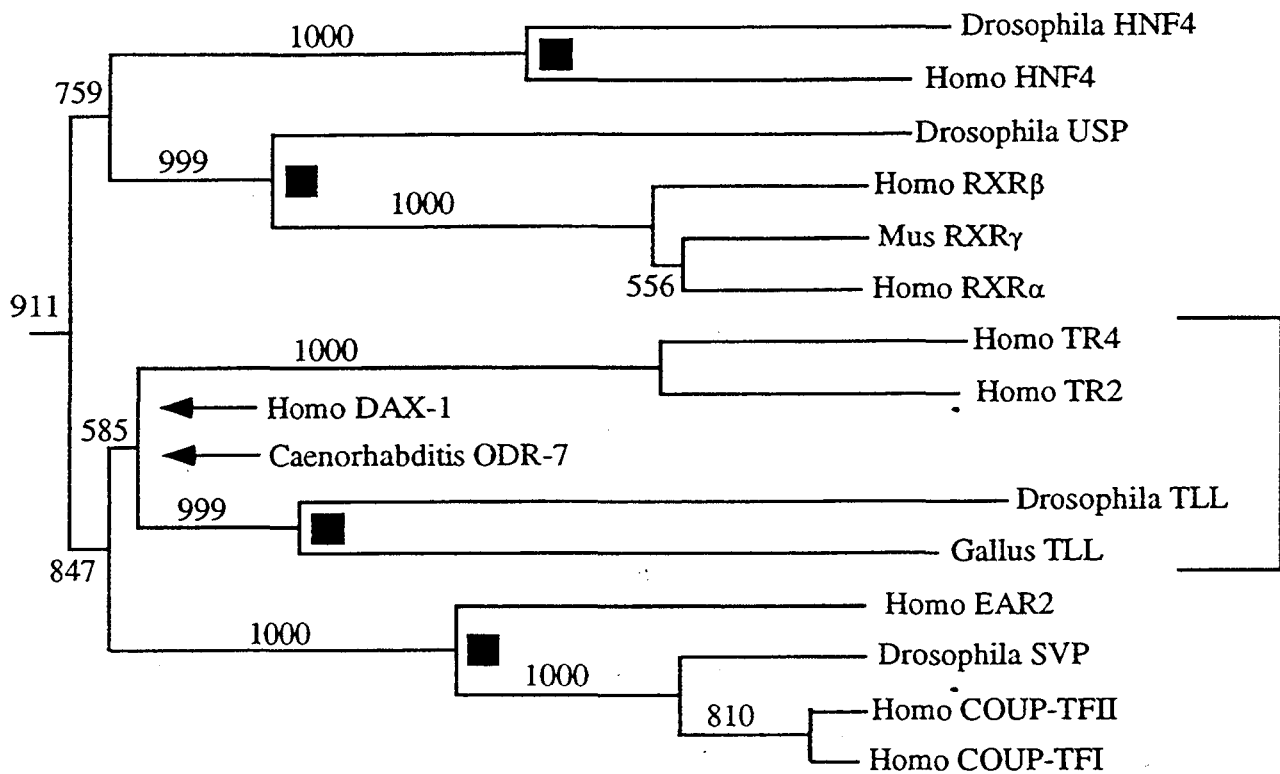


Figure 1. Arbre phylogénétique (d'après Laudet *et al.* 1992). Cet arbre a été construit par comparaison des domaines E des récepteurs nucléaires. RXR et HNF-4 sont très proches.

# I. Structure modulaire caractéristique partagée avec les récepteurs

## nucléaires :

### 1. Notion de domaine :

HNF-4, ainsi que tous les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, sont des récepteurs vis-à-vis de leur ligand, quand ce dernier existe, mais ce sont aussi des facteurs de transcription se liant à l'ADN. Ils portent dans leur séquence protéique tous les motifs structuraux responsables de plusieurs fonctions. Les récepteurs se composent de 6 domaines notés de A à F qui portent chacun une ou plusieurs fonctions (Figure 2).

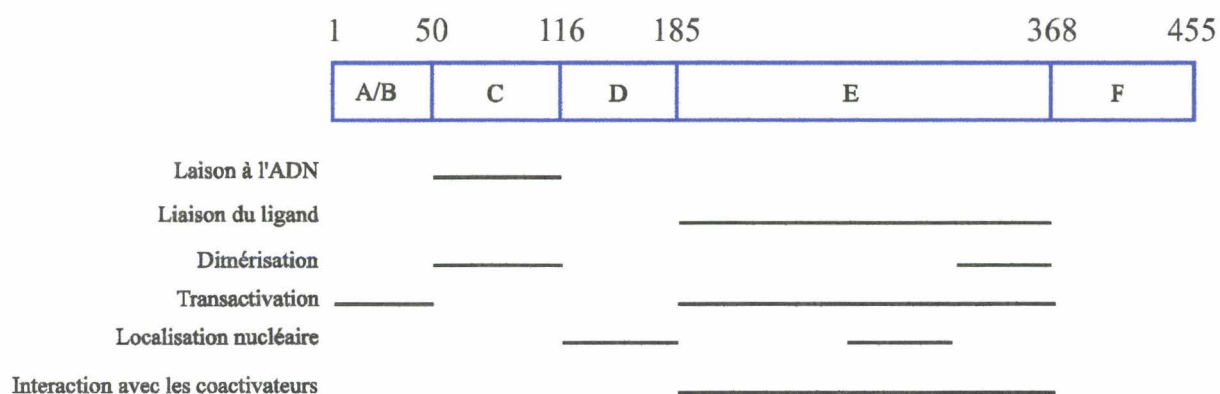


Figure 2. Domaines fonctionnels du récepteur nucléaire HNF-4.

Le domaine A/B situé à l'extrémité amino-terminale contient un motif appelé AF-1 (Activated Function 1) impliqué dans un mécanisme de transactivation constitutif, indépendant de la fixation du ligand.

Le domaine C, ou DBD (DNA binding domain), de soixante six résidus d'acides aminés, est la région la plus conservée entre les différents récepteurs nucléaires. Il se caractérise par une structure en doigt de zinc, ayant une conformation en hélice permettant une interaction avec le grand sillon de l'ADN. Il est aussi impliqué dans les mécanismes de dimérisation des récepteurs.

Le domaine D est une zone charnière flexible entre le domaine C et le domaine E, permettant les phénomènes de rotation de ces domaines. Ce domaine est impliqué dans la localisation nucléaire.

Le domaine E, ou LBD (ligand binding domain) est une région complexe. Il contient le site de fixation du ligand, mais il intervient aussi dans la dimérisation, et dans la transactivation dépendante du ligand grâce au motif AF-2 (Activated Function 2). Ce domaine est aussi impliqué dans la localisation nucléaire.

La fonction du domaine F n'a pas été exactement déterminée. Certains récepteurs n'ont pas de domaine F ou ont un domaine F très court. HNF-4, ER, RAR (récepteur de l'acide tout trans rétinoïque), entre autres, possèdent ce domaine. Pour HNF-4 $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2, la région F contient un domaine inhibiteur de la transactivation (Iyemere *et al.* 1998; Hadzopoulou-Cladaras *et al.* 1997).

## **2. La liaison à l'ADN :**

### 2.1 Les éléments de réponse :

La liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires est une étape cruciale du processus de transactivation du message hormonal. Cette fixation se fait sur une séquence particulière d'ADN appelée élément de réponse ou HRE (Hormone responsive element). Les récepteurs se lient à l'ADN soit sous forme de dimères (homodimères ou hétérodimères), soit sous forme de monomère.

Les HRE sont présents au niveau de la région promotrice ou des "enhancers" des gènes cibles impliqués dans la régulation hormonale. Chaque HRE est composé de deux séquences de six nucléotides. Ces sites peuvent prendre différentes orientations, soit sous forme d'un motif directement répété (DR), d'un palindrome (pal), ou d'un motif répété inversé (IR). Les hexamères de chaque motif peuvent être espacés d'un ou plusieurs nucléotides. Ainsi, des DR espacés d'un ou trois nucléotides s'appellent respectivement DR-1 et DR-3. L'espacement entre les deux séquences est un élément déterminant de la spécificité de réponse.

HNF-4 se fixe préférentiellement sur des DR-1 dont la séquence consensus est AGGTCA. HNF-4 peut aussi se fixer sur un DR-2 (Fraser *et al.* 1998) et un DR-0 (Kardassis *et al.* 1998). Sur un DR-2, il se fixe avec six fois moins d'affinité que sur un DR-1. Au niveau des DR-1, la

fixation de HNF-4 dépend aussi de la base présente entre les répétitions. L'affinité de fixation est beaucoup plus élevée si une adénosine est à cette position plutôt qu'une thymidine. Les facteurs de transcription COUP-TFs (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I et II) sont souvent en compétition avec HNF-4 pour la fixation au niveau des DR-1. Dans ce cas, COUP-TFs répriment l'activité transcriptionnelle et contrebalancent l'effet activateur de HNF-4. Pour la fixation sur les DR-0, HNF-4 n'est plus en compétition avec COUP-TFs. De par ces propriétés, HNF-4 est capable d'interférer avec d'autres voies métaboliques et notamment avec la voie des acides gras par compétition avec les hétérodimères PPAR/RXR pour la fixation sur les DR-1 (Nishiyama *et al.* 1998), mais cela dépend de la séquence du DR-1.

## 2.2. Les groupes de récepteurs :

La famille des récepteurs nucléaires peut-être divisée en 4 groupes selon leur potentiel de dimérisation et leur spécificité de liaison à l'ADN (Figure 3) (Jiang *et al.* 1995). Le groupe I comprend les récepteurs des stéroïdes. Quand ces récepteurs sont activés par leur ligand, ils s'associent en homodimères et se fixent sur l'ADN au niveau de séquences nucléotidiques orientées en palindrome. Le groupe II comprend les récepteurs des rétinoïdes, de l'hormone thyroïdienne, de la vitamine D, et certains récepteurs orphelins. Les récepteurs de ce groupe fonctionnent préférentiellement en hétérodimères, avec RXR comme partenaire. Ils se lient à l'ADN au niveau d'éléments de réponse en répétition directe. Les récepteurs du groupe III (NGFI-B, SF-1....) se lient sous forme de monomère à des HREs en demi-sites, mais récemment, il a été montré qu'ils sont capables de former des hétérodimères avec RXR. HNF-4 appartient au groupe IV. Ce groupe possède des caractéristiques du groupe I et II. En effet, comme les récepteurs du groupe I, HNF-4 se fixe à l'ADN exclusivement sous forme d'homodimère, mais, comme les récepteurs du groupe II, il se fixe au niveau de HRE en répétition directe.

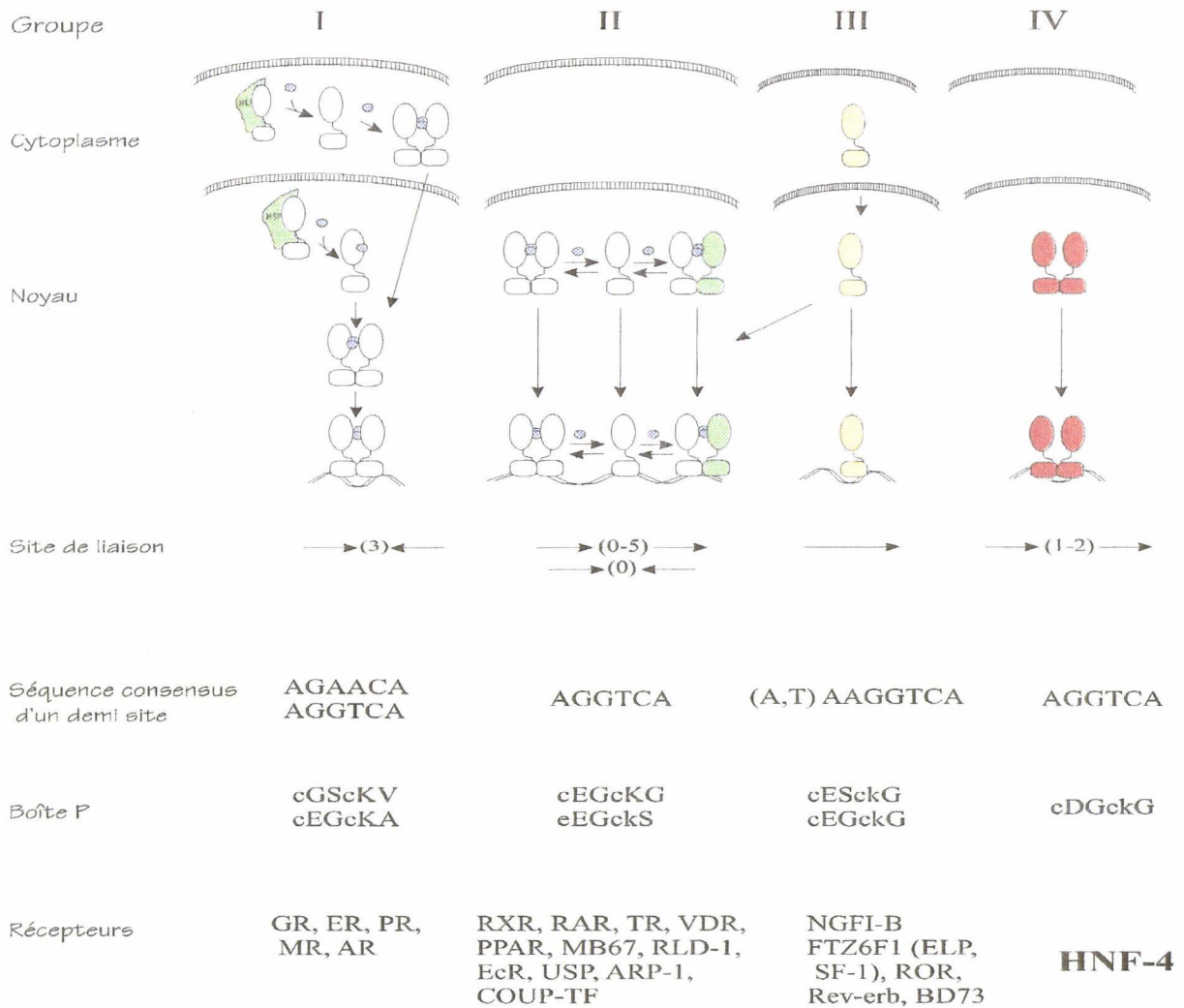


Figure 3. HNF-4 définit un nouveau groupe de récepteurs nucléaires (d'après Jiang *et al.* 1995). Les récepteurs nucléaires sont classés selon leur potentiel de dimérisation, leur spécificité de liaison à l'ADN et leur localisation cellulaire. La séquence consensus des demi-sites des HREs des récepteurs de chaque groupe est donnée. L'orientation de chaque demi-site est indiquée par les flèches. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux nombres de bases qui peuvent être présentes entre chaque demi-site. Pour le groupe III, (A,T) signifie région riche en AT présente à l'extrémité 5' du demi-site. La boîte P (séquence en acides aminés) comporte les deux résidus d'acide aminé compris entre le troisième et le quatrième résidu cystéine du premier doigt de zinc et un ou deux résidus situés en aval du quatrième résidu cystéine. Cette boîte correspond aux résidus d'acide aminé qui sont directement en contact avec l'ADN du HRE, elle est donc impliquée dans la spécificité de liaison à l'ADN. Pour chaque groupe, les récepteurs représentatifs sont donnés. Les récepteurs dont la dimérisation en solution a été montrée sont sur la première ligne (d'après Jiang *et al.* 1995).



### 2.3 Les doigts de zinc et les boîtes fonctionnelles :

Chaque doigt de zinc, localisé dans le domaine C, a une conformation en hélice alpha sur laquelle se superpose un feuillet bêta, la structure globale étant maintenue par le zinc. Une des hélices interagit avec l'ADN au niveau du grand sillon de la double hélice.

Les deux résidus d'acides aminés localisés entre la troisième et la quatrième cystéine du premier doigt de zinc et le troisième résidu situé en aval de la quatrième cystéine, forment la boîte P (Figure 4). Cette boîte P confère à chaque récepteur sa spécificité de reconnaissance des éléments de réponse sur l'ADN (Baniahmad *et al.* 1998). La boîte P présente chez HNF-4 est complètement différente de celle existante chez les autres récepteurs nucléaires (Figure 3), cela suggère bien que HNF-4 peut définir une nouvelle sous classe parmi les récepteurs nucléaires (Jiang *et al.* 1995).

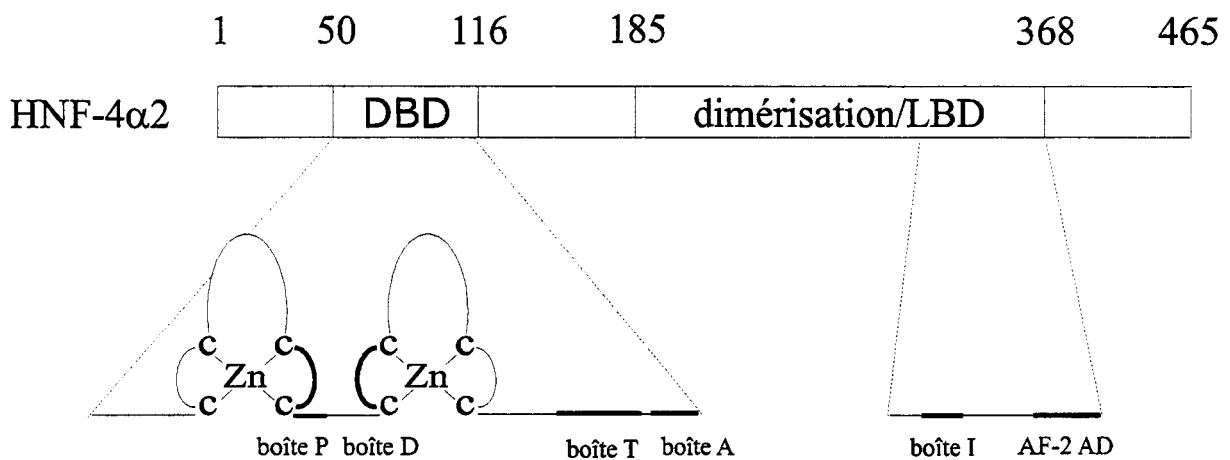


Figure 4. Localisation des doigts de zinc et des boîtes impliqués dans la liaison à l'ADN et la dimérisation.  
HR : "heptad repeat".

Au niveau du deuxième doigt de zinc, il existe une boîte D qui intervient dans la dimérisation sur laquelle nous reviendrons par la suite.

Deux autres boîtes fonctionnelles appelées boîtes T et A ont été identifiées en partie C-terminale des doigts de zinc (Figure 4). Pour RXRα, la partie N-terminale de la boîte T forme une hélice alpha (aussi appelée troisième hélice). Cette boîte est impliquée dans la formation d'homodimères du DBD de RXR sur des DR-1 (Jiang et Sladek, 1997), mais il semble qu'elle soit surtout nécessaire à une interaction correcte de RXR avec l'ADN (Lee *et al.* 1993).

		Boîte T			Boîte A		
		3 <sup>ème</sup> hélice					
<b>rHNF-4</b>	106	CRLKKCFRAGM	KKEAVQ	<b>N</b>	ER	DRI STRRSSYED	137
<b>dHNF-4</b>		CRLRKCFKAGM	KKEAVQ	<b>N</b>	ER	DRI SCRRTSNDD	
<b>hRXR<math>\alpha</math></b>	190	CRYQKCLAMGM	KREAVQ	<b>E</b>	ER	QRG KDRNENEVE	221
<b>mRXR<math>\beta</math></b>		CRYQKCLATGM	KREAVQ	<b>E</b>	ER	QRG KDKDGDGDG	
<b>mRXR<math>\gamma</math></b>		CRYQKCLVMGM	KREAVQ	<b>E</b>	ER	QRS RERAESEAE	

Figure 5A. Comparaison des séquences en acides aminés des boîtes T et A de RXR et de HNF-4 $\alpha$ . Les résidus encadrés correspondent à la région de RXR $\alpha$  qui a une structure en hélice  $\alpha$  en solution. Les séquences ont été identifiées chez la drosophile (d), la souris (m), le rat (r) et l'homme (h), (d'après Jiang et Sladek, 1997).

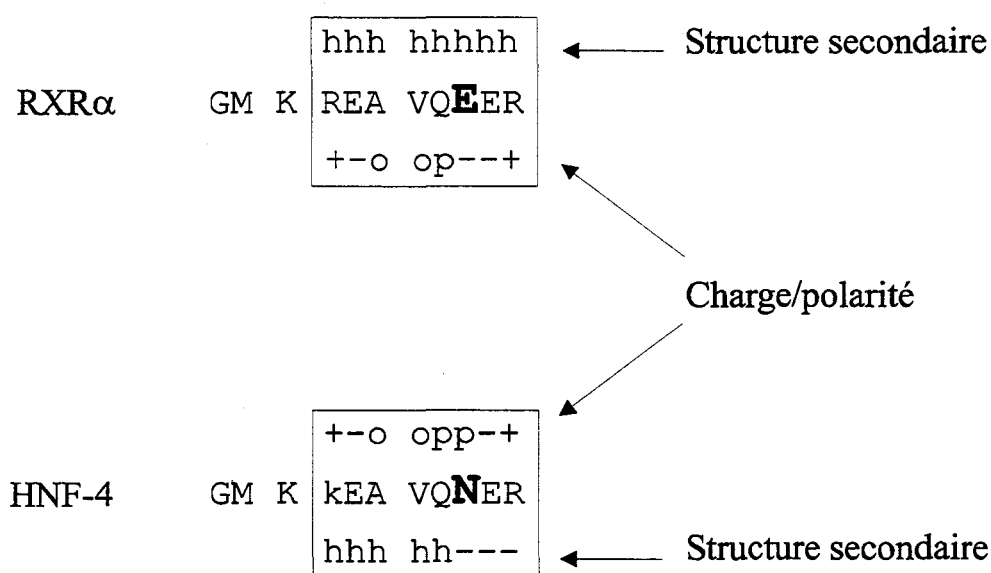


Figure 5B. Représentation schématique de la 3ème hélice de hRXR $\alpha$  et de la région correspondante pour rHNF-4. Les charges et la polarité sont indiquées : +, charge positive ; -, charge négative ; p, polaire non chargé ; o, non polaire et hydrophobe. La prédiction de structure secondaire déterminée par la méthode de Chou-Fasman est aussi indiquée : h, structure en hélice  $\alpha$  ; -, pas de structure apparente (d'après Jiang et Sladek, 1997).

La boîte T (localisée entre les résidues d'acides aminés 117 à 125) de HNF-4 est légèrement différente de celle des autres récepteurs nucléaires. Ainsi, celles de HNF-4 et RXR ne diffèrent que par deux résidus d'acides aminés. Il existe une substitution conservative, un résidu d'arginine chez RXR est remplacé par un résidu de lysine chez HNF-4 (Figure 5A). La deuxième substitution est non conservative, un résidu d'acide glutamique est remplacé par un résidu d'asparagine. Il a été montré pour RXR, que la boîte T peut prendre une structure en hélice  $\alpha$  (Lee *et al.* 1993). Le résidu d'asparagine présent chez HNF-4 entraîne une perte potentielle de l'hélice  $\alpha$  (Figure 5B) (Jiang et Sladek, 1997). Cette boîte facilite la dimérisation du DBD de HNF-4, mais elle n'est pas vraiment impliquée dans l'affinité pour l'ADN. En effet, des expériences de gel retard ont été réalisées avec deux constructions. La première contient les 125 premiers résidus d'acides aminés de HNF-4 (HNF-4.125). La deuxième contient en plus, la substitution du résidu d'asparagine par le résidu d'acide glutamique (HNF-4.N123E), cette substitution rend la région identique à celle présente chez RXR. Ces deux constructions possèdent les mêmes propriétés de liaison à l'ADN et de dimérisation (Jiang et Sladek, 1997).

La boîte A a été d'abord décrite comme étant une séquence de NGFI-B qui interagit avec une adénine placée en 5' de l'élément de réponse (Wilson *et al.* 1992). Cette boîte est impliquée dans la reconnaissance de la séquence d'ADN par TR $\beta$ . La boîte A de HNF-4 est complètement différente de celle des autres récepteurs nucléaires (Figure 5A). Elle est nécessaire au DBD de HNF-4 pour avoir une forte affinité à l'ADN (Jiang et Sladek, 1997). La structure en trois dimensions de l'hétérodimère RXR-TR a montré que les résidus basiques de cette boîte participent aux contacts entre la protéine et le petit sillon de l'hélice d'ADN, et ont un rôle dans la stabilisation du complexe protéine-ADN (Rastinejad *et al.* 1995).

#### 2.4 Rôle de la phosphorylation dans la liaison à l'ADN :

HNF-4 possède de nombreux sites potentiels de phosphorylation sur des résidus de sérine, thréonine, et tyrosine.

Ktistaki *et al.* (1995) ont montré que la phosphorylation des résidus tyrosine de HNF-4 est nécessaire à la liaison à l'ADN. De plus, cette phosphorylation n'est pas impliquée dans la translocation nucléaire de HNF-4, mais elle aurait un rôle direct ou indirect dans sa localisation sous-nucléaire (Ktistaki *et al.* 1995).

Jiang *et al* (1997b) ont produit HNF-4 marqué radioactivement au P<sup>32</sup> dans des cellules COS et dans des baculovirus. Les protéines obtenues ont été séparées sur gel d'acrylamide et digérées par la trypsine. Ils ont montré qu'il existe au moins 13 phosphopeptides de HNF-4, et que la phosphorylation des résidus de thréonine et surtout des résidus de sérine, est associée à une forte affinité et à la spécificité de liaison à l'ADN (Jiang *et al.* 1997b). De plus, les sites de phosphorylation au niveau du DBD sont conservés entre HNF-4 de xénope et de drosophile, suggérant un rôle important de la phosphorylation pour la liaison à l'ADN.

Viollet *et al* ont réalisé une étude plus complète sur des rats (Viollet *et al.* 1997). Ils ont montré qu'au niveau de la boîte A, il existe un site consensus (131-RRSS-134) qui est phosphorylé par la PKA. Cette phosphorylation entraîne une diminution de l'affinité de HNF-4 pour l'ADN, et *ex vivo* elle entraîne une baisse de la transactivation de HNF-4. De plus la phosphorylation dépend du régime alimentaire. Cela suggère que les hormones et l'alimentation peuvent réguler l'activité de HNF-4 via la voie de l'AMPc.

Ces différents types de phosphorylation montrent que HNF-4 peut certainement intégrer différents types de signaux intra- et extracellulaires.

### **3. La dimérisation :**

HNF-4 comme d'autres récepteurs nucléaires se lie à l'ADN sous forme de dimère, mais exclusivement sous forme d'homodimère. Au niveau de la séquence de HNF-4, il existe deux régions permettant ce mécanisme, les boîtes D et I.

#### 3.1 Les motifs de dimérisation :

Nous avons vu que la boîte T, présente dans le DBD, facilite la dimérisation de HNF-4. Le DBD contient un autre motif appelé boîte D (Figure 4), qui est retrouvé chez HNF-4, comme chez RXR, RAR, VDR, et TR. Ce motif intervient dans la liaison à leurs HREs respectifs. Un autre motif, la boîte I, est localisé dans le LBD de HNF-4 et correspond aux "heptad repeats" 7, 8 et 9, dont les homologues dans RXR, correspondent aux hélices H9 et H10 identifiées par radiocristallographie du LBD de l'apoRXR $\alpha$  (Bourguet *et al.* 1995). La boîte I, est impliquée dans l'homodimérisation en solution (Lee *et al.* 1998), mais aussi dans la fixation à l'ADN en

augmentant la stabilité du complexe récepteur-ADN (Jiang *et al.* 1997a). Ce motif est aussi présent dans d'autres récepteurs nucléaires et intervient notamment dans l'hétérodimérisation de RXR-RAR, RXR-TR et dans l'homodimérisation de COUP-TF. Ce motif de dimérisation est aussi impliqué dans la fixation à l'ADN, avec une efficacité similaire pour les DR, IR et ER (palindrome inversé) (Lee *et al.* 1998).

### 3.2. Caractéristique structurale conférant à HNF-4 l'homodimérisation exclusive :

Des études en gradient de sucrose ont permis de montrer que HNF-4 est présent en solution sous forme d'homodimères (Jiang *et al.* 1995). Ce complexe est plus stable que le complexe protéine-ADN (Jiang *et al.* 1997a).

Du point de vue de la séquence en acides aminés, HNF-4 et RXR sont très proches. Nous pouvons nous demander pourquoi HNF-4 n'est pas capable de dimériser avec RXR. La détermination de la structure tridimensionnelle du LDB de RXR par diffraction des rayons X sous forme d'homodimère sans ligand (Bourguet *et al.* 1995), a montré que ce domaine est organisé en douze hélices  $\alpha$  (H1 à H12) et deux feuillets  $\beta$  qui s'associent en trois couches formées respectivement par les hélices H1 à H3, H4 à H8 et H9 à H11/H12. La boîte I est localisée au niveau des hélices H9 et H10, qui au niveau de la structure tridimensionnelle sont des interfaces de dimérisation. Comme nous l'avons dit précédemment, la boîte I est aussi présente chez HNF-4, et a un rôle primordial dans les interactions HNF-4/HNF-4. Il a été montré que onze acides aminés de la boîte I ont un rôle déterminant dans la spécificité de dimérisation (figure 6) (Lee *et al.* 1998). Au niveau de cette boîte, RXR et USP (ultraspiracle) son homologue chez la drosophile, possèdent un résidu d'alanine en position 416 et un résidu d'arginine en position 421. HNF-4 possède aux positions correspondantes un résidu de glycine et de leucine. Si ces acides aminés sont remplacés par des résidus d'alanine et d'arginine alors, HNF-4 est capable d'hétérodimériser avec RAR. Ces deux acides aminés confèrent donc à HNF-4 la propriété de ne former que des homodimères.

		H9		H10				
USP	429	IEMCREK <b>Y</b> VYA	CLD	EHCRLE <b>H</b> PGDD	GRF	AQ <b>L</b> LLLR <b>L</b> PALR	SI	468
		+E REKVYA	L+	+C+ ++P	GRF	A+LLLR <b>L</b> PALR	SI	
RXR	389	VEALREK <b>Y</b> VYA	SLE	AYCK <b>H</b> K <b>Y</b> PEQP	GRF	AK <b>L</b> LLLR <b>L</b> PALR	SI	428
		++ LR +V	SLE Y	+ +	GRF	+LLL LP+L+ SI		
HNF-4	299	IKRLRSQ <b>V</b> Q <b>V</b>	SLE	DY <b>I</b> ND <b>R</b> Q <b>Y</b> DSR	GRF	G <b>E</b> LLLLL <b>L</b> PTLQ	SI	338

Figure 6. Séquences en acides aminés de la boîte I de USP, du RXR $\alpha$  humain, et de HNF-4 $\alpha$  de rat et humain. Correspondance avec les hélices 9 et 10 de RXR. Les homologies de séquence sont montrées, les + indiquent les changements d'un résidu d'acide aminé chargé par un autre chargé Les substitution conservatives d'acides aminés entre USP, RXR et HNF-4 sont indiquées en rouge (d'après Lee *et al.* 1998).

#### 4. La transactivation :

La régulation transcriptionnelle des gènes représente l'ultime fonction mise en jeu par les récepteurs nucléaires dans le processus de transactivation du message hormonal ou métabolique.

##### 4.1 Les motifs de transactivation :

La fonction de transactivation est portée par deux régions appelées AF-1 et AF-2 qui sont présentes dans la plupart des récepteurs nucléaires dont HNF-4 (Hadzopoulou-Cladaras *et al.* 1997). Leur activité est dépendante du type de promoteur mais aussi du type cellulaire, car ces régions forment le lien entre les récepteurs et les composants de la machinerie transcriptionnelle (la RNA polymérase II, ses facteurs associés et divers coactivateurs).

Le motif AF-1 de HNF-4 est formé par les 24 premiers résidus d'acides aminés du domaine A/B. Ce motif est impliqué dans la transactivation constitutive indépendante de la fixation d'un ligand dans les autres récepteurs nucléaires. L'AF-1 de HNF-4 est un activateur acide de par la charge globale des acides aminés qui le composent (Hadzopoulou-Cladaras *et al.* 1997). Ce domaine pour RXR prend une structure en hélice  $\alpha$ . Connaissant la similitude

de structure entre RXR et HNF-4, on suppose que ce dernier peut aussi prendre une structure en hélice  $\alpha$ , bien que sa structure exacte, dans le cadre du récepteur entier, ou pendant son interaction avec d'autres protéines, soit inconnue. Il a été montré récemment que l'AF-1 de RAR $\beta$ 2 est aussi un activateur acide. Cela laisse penser que l'AF-1 de ces deux récepteurs fonctionne de manière similaire (Hadzopoulou-Cladaras *et al.* 1997).

		$\phi$	$\phi$	X	E	$\phi$	$\phi$		
hHNF-4	360	L	L	Q	E	M	L	L	366
rHNF-4	360	L	L	Q	E	M	L	L	366
hRAR $\alpha$	409	L	I	Q	E	M	L	E	415
hRAR $\beta$	402	L	I	Q	E	M	L	E	408
hRAR $\gamma$	411	L	I	R	E	M	L	E	417
mRXR $\alpha$	455	F	L	M	E	M	L	E	461
mRXR $\beta$	436	F	L	M	E	M	L	E	442
mRXR $\gamma$	451	F	L	M	E	M	L	E	457
hTR $\alpha$	401	L	F	L	E	V	F	E	407
hTR $\beta$	449	L	F	L	E	V	F	E	455
hER	539	L	L	L	E	M	L	D	545
hGR	752	M	L	A	E	I	I	T	758
hPR	908	M	M	S	E	V	I	A	914
hAR	893	M	M	A	E	I	I	S	899
hMR	959	M	L	V	E	I	I	S	965
hARP-1	395	L	I	R	D	M	L	L	401
hEAR-2	384	L	I	R	D	M	L	L	390
hEAR-3	402	L	I	R	D	M	L	L	408
dSVP	524	L	I	R	D	M	L	L	530

Figure 7. Alignement des séquences de la région AF-2 AD de différents membres de la famille des récepteurs nucléaires.  $\phi$  résidus d'acide aminé hydrophobe, X acide aminé non conservé, E, acide glutamique. L'acide glutamique (en rouge) est conservé dans la plupart des récepteurs nucléaires. Le résidu de leucine (en violet) situé en position 366 pour HNF-4 est critique pour l'activité de son AF-2 AD, il est conservé pour ARP-1, EAR-2, EAR-3 et SVP (famille COUP-TF) qui sont des répresseurs de la transcription. Le préfixe situé avant le nom des récepteurs désigne l'espèce : humain (h), rat (r), souris (m), drosophile (d).

L'AF-2 de HNF-4 a été localisé entre les résidus d'acides aminés 128 à 366, c'est à dire situé dans le domaine E et dans une partie du domaine D. Cette région est très complexe et elle est différente de celle présente chez les autres récepteurs nucléaires. Toute délétion à l'intérieur de ce domaine provoque une diminution de la transactivation. Néanmoins, cette région comporte un motif hautement conservé  $\phi\phi XE\phi\phi$  ( $\phi$  acide aminé hydrophobe, X acide aminé non conservé, E, acide glutamique) appelé AF-2 AD (Figure 7) qui est impliqué dans le mécanisme de transactivation. La délétion de ce motif entraîne la perte totale du potentiel de transactivation (Hadzopoulou-Cladaras *et al.* 1997). Contrairement aux récepteurs TR, RAR, RXR, l'AF-2 AD de HNF-4 ne possède pas d'activité autonome.

Dans le LBD de RXR, dont la structure tridimensionnelle a été déterminée (Bourguet *et al.* 1995), le motif AF-2 AD est localisé sur l'hélice 12. La comparaison des structures tridimensionnelles du LBD de RXR sans ligand (Bourguet *et al.* 1995) et du LBD de RAR en présence de ligand (Renaud *et al.* 1995) a permis d'établir un modèle pour le mécanisme de transactivation induite par le ligand. En effet, la fixation du ligand entraîne un pivotement de l'hélice 12 qui se replie alors sur le corps du récepteur pour former une poche dans laquelle est fixé le ligand, et crée une surface d'interaction possible entre les facteurs de la transcription et le domaine AF-2. Connaissant la forte homologie entre RXR et HNF-4, il est fort possible que ce mécanisme soit semblable pour HNF-4, ou alors, s'il n'existe pas de ligand pour HNF-4, que sa structure tridimensionnelle soit constitutivement "active".

L'activité transcriptionnelle de HNF-4 $\alpha$  peut être modulée par le domaine F. Il a été montré que 14 résidus d'acides aminés présents dans le domaine F de HNF-4 $\alpha$ 1 de rat (une des isoformes de HNF-4) ont une activité répressive sur la transactivation (Iyemere *et al.* 1998). Iyemere *et al.* suggère que le domaine répresseur, du fait de sa proximité avec l'AF-2 AD, diminue peut-être l'accessibilité de l'AF-2 AD aux coactivateurs ou masque des résidus critiques contenus dans l'AF-2 AD (Iyemere *et al.* 1998). Hadzopoulou-Cladaras *et al.* suggèrent que le domaine F pourrait moduler le degré d'interaction entre l'AF-1 et l'AF-2 (Hadzopoulou-Cladaras *et al.* 1997).



## 4.2 Partenaires de HNF-4 :

### 4.2.1 Le complexe d'initiation :

La transcription est un processus multiple. Elle nécessite la formation d'un complexe protéique d'initiation au niveau du promoteur. Ce complexe est formé de l'ARN polymérase II, de différents facteurs de transcription ( TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH), de TBP (TATA binding protein) et des TAFs (TBP associated factors). Le facteur de transcription TFIIB agit comme un pont entre la TBP et l'ARN polymérase II (Chou et Struhl, 1997). Le domaine C-terminal de TFIIB interagit avec le complexe TBP-boîte TATA, alors que l'extrémité N-terminale est nécessaire pour l'assemblage de la TFIIF et de la ARN polymérase II dans le pré-complexe d'initiation. *In vitro*, TFIIB s'associe de façon stable avec le promoteur après la fixation de TBP sur la boîte TATA, mais avant l'incorporation dans le complexe d'initiation de TFIIF, TFIIE, TFIIH et de la ARN polymérase II (Chou et Struhl, 1997). De plus TFIIB interagit, *in vitro*, avec certaines TAFs, et ces interactions peuvent contribuer au recrutement ou à l'association stable de TFIIB dans le contexte d'un complexe de transcription actif.

HNF-4 possède un élément de réponse (site AIA) sur le promoteur du gène de l'apolipoprotéine AI. HNF-4 activerait la transcription de ce gène en facilitant la formation du complexe d'initiation via une interaction physique entre TFIIB et la partie N-terminale de HNF-4 (Malik et Karathanasis, 1996). Ces interactions ont des conséquences importantes. Ainsi, quand HNF-4 est lié à l'ADN, il est suffisant pour recruter TFIIB même en l'absence de TBP. TFIIB potentialise la stabilité de HNF-4 sur le site A. De plus, même si HNF-4 stimule la formation du complexe TBP-TFIIB au niveau du promoteur, le rôle de HNF-4 dans la transcription n'est pas limité à cette étape. L'activité transcriptionnelle de HNF-4, dans des études *in vitro* et *ex vivo*, dépend aussi du motif AF-2 AD. Malik *et al* suggère que l'AF-2 AD pourrait faciliter l'entrée de la ARN polymérase II, de TFIIE, TFIIH dans le complexe d'initiation. Ainsi, de multiples interactions protéine-protéine permettraient la formation et l'activation du complexe d'initiation de transcription (Malik et Karathanasis, 1996).

#### 4.2.2 Les cofacteurs :

D'autres facteurs intermédiaires, les cofacteurs, peuvent être impliqués dans la transmission du signal des récepteurs nucléaires. Il existe deux types de cofacteurs, les coactivateurs et les corépresseurs qui, respectivement, activent et répriment l'activité des facteurs de transcription. Pour l'instant 4 corépresseurs ont été mis en évidence (Tableau I). Ils interagissent, en absence de ligand avec les complexes récepteur (TR, RAR)-ADN. Le ligand va induire une dissociation entre le complexe récepteur-ADN et le corépresseur, et il y a ensuite un recrutement des coactivateurs (Gelman *et al.* 1997). De nombreux coactivateurs ont été découverts (Tableau I) grâce à un système double-hybride. Ainsi, la protéine CBP/P300 a été clonée grâce à sa capacité à interagir avec la protéine CREB et E1A (Chrivia *et al.* 1993; Eckner *et al.* 1994). CBP/P300 est un lien entre les différentes voies de transduction du signal et la transcription. Elle a par conséquent un rôle essentiel dans les processus de croissance et de différenciation cellulaire. CBP/P300 est capable d'interagir avec HNF-4 d'une façon ligand-indépendant (Yoshida *et al.* 1997). Il existe dans CBP/P300 deux régions d'interactions avec les récepteurs : une région amino-terminale (1-101) qui lie tous les récepteurs nucléaires testés, la deuxième région (des acides aminés 356 à 495) se lie fortement à RXR mais pas à RAR ni TR. L'interaction de CBP/P300 avec HNF-4 fait intervenir la région située entre les acides aminés 119 à 375 de HNF-4 et les régions 271-451 et 1626-2259 de CBP/P300. Cette interaction permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de HNF-4. Une autre étude montre que le DBD de HNF-4 est nécessaire pour avoir une forte interaction avec CBP/P300 (Dell et Hadzopoulou-Cladaras, 1998).

HNF-4 est capable d'interagir avec un autre coactivateur, GRIP1 (glucocorticoid receptor-interacting protein 1).

GRIP1 a été cloné grâce à sa capacité à interagir avec le LBD du GR de souris dans un système double hybride (Hong *et al.* 1996). Il peut également interagir avec le LBD de façon ligand dépendant avec les autres récepteurs des stéroïdes, mais aussi avec TR $\alpha$ , VDR, RAR $\alpha$  et RXR $\alpha$  (Hong *et al.* 1997). GRIP1 est partiellement analogue à SRC-1 (Steroid receptor coactivator 1) (Gelman *et al.* 1997) et TIF2 est certainement l'équivalent humain de GRIP1 (Hong *et al.* 1997).

## Cofacteurs modifiant l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires

Nouveau facteur	Domaine de récepteurs utilisés pour le recherche du cofacteur	Bibliothèque d'ADNc, extrait tissulaire ou cellulaire	Interactions avec d'autres récepteurs	Effet du ligand
<b>Coactivateurs</b>				
ACTR	RAR $\beta$	RH4XRE	RXR, TR, VDR, ER	Association
ARA 70	A/B (région C terminale)	Cellules de cerveau humain		Association
BRG1		Cellules HeLa		Association
hbrm		Cellules hépatiques humaines	GR	Association
ERAP 140	hER-AF-2	Cellules MCF-7		Association
ERAP 160				
GRIP1	GR-LBD	Cellules d'embryon de souris	GR,AR,ER	Association
p160	CBP (domaine C-terminal et ER-LBD)	Macrophages humains		Association
p300/CBP	Protéine E1A	Cellules 293	T3R, RAR, RXR,	Association
RAP46	GR	Cellules de foie humain	AR, ER, PR	dépend du récepteur
RIP110	hRXR $\alpha$ -LBD	Cellules de foie murines	TR, RAR, RXR	dépend du RIP et du récepteur
RIP13	mER-LBD	Cellules HeLa, ZR75-1, COS-1		Association
RIP140				
RIP160				
RIP80				
hSNF2a		Cellules de cerveau foetal humain	ER, RAR	?
hSNF2b	hPR-LBD (rés.631-933)	Lymphocytes B humains	ER, GR, PR, RXR, TR	Association
SRC-1				
mSUG1	mRAR $\alpha$ -région E	Cellules d'embryon de souris	ER, TR, VDR, RXR	Association
TIF1	mRXR $\gamma$ (domaines D et E)	Cellules P19	ER, TR, VDR, RAR	Association
TIF2	ER-LBD	Cellules de placenta humain	AR, ER, GR, PR, RAR,RXR, TR	Association
Trip (15protéines)	rTR $\beta$ 1 (du Cterm du DBD au Cterm de la protéine)	Cellules HeLa	RXR (Trip1)	Différent selon les Trip
<b>Corépresseur</b>				
N-CoR (p270 ou TRAC)	TR	Cellules hypophysaires de souris	RAR	Dissociation
SMRT	hRXR $\alpha$ -LBD (rés 198-462)	Cellules HeLa	TR, RAR	Dissociation
TRUP	hTR (rés. 168-259, N term du LBD)	Lymphocytes B humains		Dissociation
Calréticuline	hGR-DBD			?

Tableau I. Liste des co-facteurs qui interagissent avec les récepteurs nucléaires (modifié d'après Gelman *et al.* 1997).

Les facteurs de la famille COUP-TF répriment souvent l'expression de gènes dépendant de HNF-4 par compétition pour la fixation sur les mêmes éléments de réponse. Cependant, il existe une synergie entre COUP-TF et HNF-4 pour l'activation de l'expression du gène de HNF-1. COUP-TF, dans ce cas, ne se fixe pas sur le promoteur de HNF-1, par contre il agit comme cofacteur de HNF-4, via des interactions protéine-protéine, permettant une forte augmentation de la transcription (Ktistaki et Talianidis, 1997b). La région située entre les résidus d'acides aminés 227 à 271 de HNF-4 est nécessaire à cette interaction.

HNF-1 est un autre facteur de transcription qui peut dans certains cas être un corépresseur de HNF-4 (Ktistaki et Talianidis, 1997a). Dans des expériences de transfection transitoire, HNF-1 régule négativement l'expression des promoteurs activés par HNF-4. Cette répression nécessite une interaction directe entre les deux facteurs. L'interaction HNF-4/HNF-1 nécessite la région située entre les acides aminés 280 à 440 de HNF-1 et l'AF-2 AD de HNF-4.

Les corépresseurs N-CoR (nuclear receptor co-repressor) et SMRT (silencing mediator for retinoid- et thyroid-hormone receptors) sont connus pour interagir avec certains récepteurs nucléaires (pour revue (Baniahmad *et al.* 1998), mais pour l'instant aucune interaction avec HNF-4 n'a été mise en évidence.

## II. Les isoformes de HNF-4 :

La famille HNF-4 constitue une famille de facteurs de transcription dont le premier membre HNF-4  $\alpha$ 1 (Sladek *et al.* 1990) a été identifié, chez le rat, comme un facteur intervenant dans l'expression hépato-spécifique de différents gènes. D'autres isoformes ont ensuite été découvertes (Kritis *et al.* 1996; Furuta *et al.* 1997; Chartier *et al.* 1994), dans différentes espèces. Récemment deux autres membres de la famille ont été mis en évidence, HNF-4 $\beta$  chez le xénope (Holewa *et al.* 1997) et HNF-4 $\gamma$  chez l'homme (Drewes *et al.* 1996).

### 1. HNF-4 $\alpha$ :

Le gène codant HNF-4 $\alpha$  a été localisé sur le chromosome 20 chez l'homme et 2 chez la souris. Le gène de HNF-4 $\alpha$  contient 10 exons. Selon la nomenclature de Furuta *et al.* (Furuta *et al.* 1997), il existe chez l'homme 6 isoformes de HNF-4 $\alpha$ , notées de  $\alpha$ 1 à  $\alpha$ 6. Ces isoformes sont obtenues par épissage alternatif du même transcrit primaire (Figure 8). Par comparaison avec HNF-4 $\alpha$ 1, HNF-4 $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 5 possèdent une insertion de 10 résidus d'acides aminés au niveau du domaine carboxy-terminal (domaine F). Les isoformes  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5 et  $\alpha$ 6 présentent une insertion de 30 résidus d'acides aminés au niveau du domaine A/B. Les isoformes  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 6 se caractérisent par un domaine F complètement différent.

Une nouvelle isoforme, HNF-4  $\alpha$ 7, a été mise en évidence dans des lignées cellulaires indifférenciées de souris. HNF-4  $\alpha$ 7 est la seule isoforme de HNF-4 présente au stade indifférencié, et elle est exprimée avant HNF-1 $\alpha$ . HNF-4 $\alpha$ 7 possède un domaine A complètement différent de celui de HNF-4 $\alpha$ 1 de souris et plus court de 23 résidus d'acides aminés résultant de l'utilisation d'un deuxième promoteur (Nakhei *et al.* 1998).

### 2. HNF-4 $\gamma$ :

HNF-4 $\gamma$  est le deuxième sous-type de HNF-4 à avoir été identifié chez l'homme (Drewes *et al.* 1996). Il est le produit d'un gène localisé sur le chromosome 8. HNF-4 $\gamma$  présente avec HNF-4 $\alpha$  des différences de séquence en acides aminés, particulièrement au niveau des domaines A/B et F (Cf. Figure 8 pourcentage d'identité entre HNF-4 $\alpha$  et  $\gamma$ ). De plus, il n'a pas

la même distribution tissulaire que HNF-4 $\alpha$  : il est exprimé dans le pancréas, les reins, l'intestin, les testicules, mais pas dans le foie. Enfin, il possède un potentiel de transactivation plus faible que HNF-4 $\alpha$ , du moins sur les gènes cibles étudiés. Néanmoins, HNF-4 $\gamma$  active peut-être d'autres gènes cibles, où il fonctionne en synergie avec d'autres facteurs de transcription que ceux qui agissent avec HNF-4 $\alpha$ .

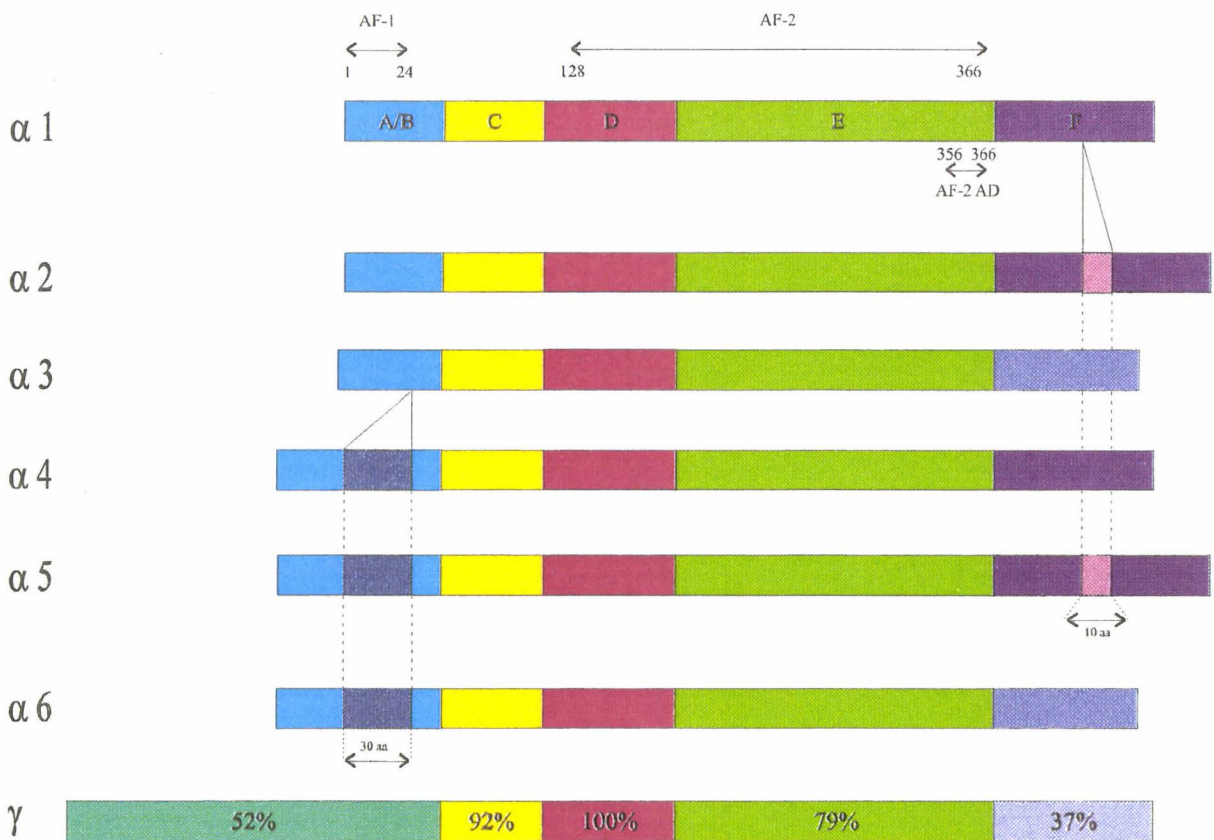


Figure 8. Les isoformes de HNF-4 $\alpha$  et le sous type HNF-4 $\gamma$  humains. Les pourcentages de similitude de séquences en acides aminés des différents domaines de HNF-4 $\gamma$  par rapport à HNF-4  $\alpha$ 1 sont indiqués.

### 3. HNF-4 $\beta$ :

Il existe un troisième sous-type de HNF-4, HNF-4 $\beta$ , mais qui, pour l'instant n'a été mis en évidence que chez *Xenopus laevis* (Holewa *et al.* 1997). HNF-4 $\beta$  est capable de se fixer sur beaucoup de sites reconnus par HNF-4 $\alpha$ , mais avec une affinité moindre. Il a aussi une capacité plus faible de transactivation des gènes cibles. HNF-4 $\beta$  présente une distribution

tissulaire plus large que HNF-4 $\alpha$ . La protéine HNF-4 $\beta$  est présente dans le foie, les reins, l'intestin, l'estomac, les gonades (ovaires et testicules), et les poumons. Ces différences dans l'expression de HNF-4 $\alpha$  et  $\beta$  suggèrent que ces deux protéines ont des fonctions différentes chez la grenouille adulte.

HNF-4 $\alpha$  et  $\beta$  sont des facteurs de transcription ayant un rôle précoce dans le développement de *Xenopus*. Cependant, ils ne possèdent pas la même expression temporelle. Ainsi, des ARNm de HNF-4 $\alpha$  sont trouvés dans l'oocyte au stade III et n'existent plus dans l'oeuf fertilisé, même si la protéine est toujours présente. Par contre, les ARNm de HNF-4 $\beta$  sont retrouvés seulement dans les derniers stades de l'oogenèse et dans l'oeuf fertilisé.

Il est possible, que chacun des membres de la famille HNF-4 ait son propre rôle dans différents tissus. En effet, l'inactivation génique de HNF-4 $\alpha$  chez la souris, conduit à la mort embryonnaire au stade 10.5 jours *post-coitum*. HNF-4 $\gamma$  et  $\beta$  ne sont donc pas capables de compenser la perte de HNF-4 $\alpha$  (Chen *et al.* 1994). Ceci indique bien que ces facteurs HNF-4 possèdent des rôles distincts. De plus, leurs fonctions sont très certainement conservées au cours de l'évolution des vertébrés.

### III. Conservation de HNF-4 au cours de l'évolution :

Le facteur HNF-4 $\alpha$ , comme le montre la figure 9, est bien conservé au cours de l'évolution des espèces. HNF-4 $\alpha$  de souris ne diffère de HNF-4 de rat que par quelques nucléotides, mais la séquence peptidique est conservée. Les isoformes humaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  présentent près de 96% de similitude de séquence en acides aminés avec les isoformes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de rat et de souris. La plupart des mutations sont localisées dans le domaine F. Sur les 89 résidus d'acides aminés, six substitutions sont conservatives et trois non conservatives. Les domaines de liaison à l'ADN de drosophile et de rat présentent 91% de similitude de séquence en acides aminés. De plus, la conservation du domaine hydrophobe de liaison au ligand (68% de similitude) permet la formation de dimères HNF-4 de rat/ HNF-4 de drosophile. HNF-4 $\alpha$  de *Xenopus* est très similaire à HNF-4 $\alpha$  de rat au niveau des domaines de liaison à l'ADN et au ligand (Holewa *et al.* 1996). Récemment deux formes de HNF-4 ont été découvertes chez le ver à soie *Bombyx mori* (Swevers et Iatrou, 1998). Ces deux formes diffèrent par leur domaine A/B. Le DBD de ces formes présentent 90% de similitude de séquence en acides aminés avec HNF-4 de drosophile, 92% avec HNF-4  $\alpha 2$  de souris et 88% avec HNF-4 $\gamma$  humain. Le

domaine de liaison au ligand de HNF-4 du ver à soie présente 71% de similitude de séquence d'acides aminés avec celui de HNF-4 de drosophile, 66% avec HNF-4  $\alpha 2$  de souris et 75% avec HNF-4 $\gamma$  humain.

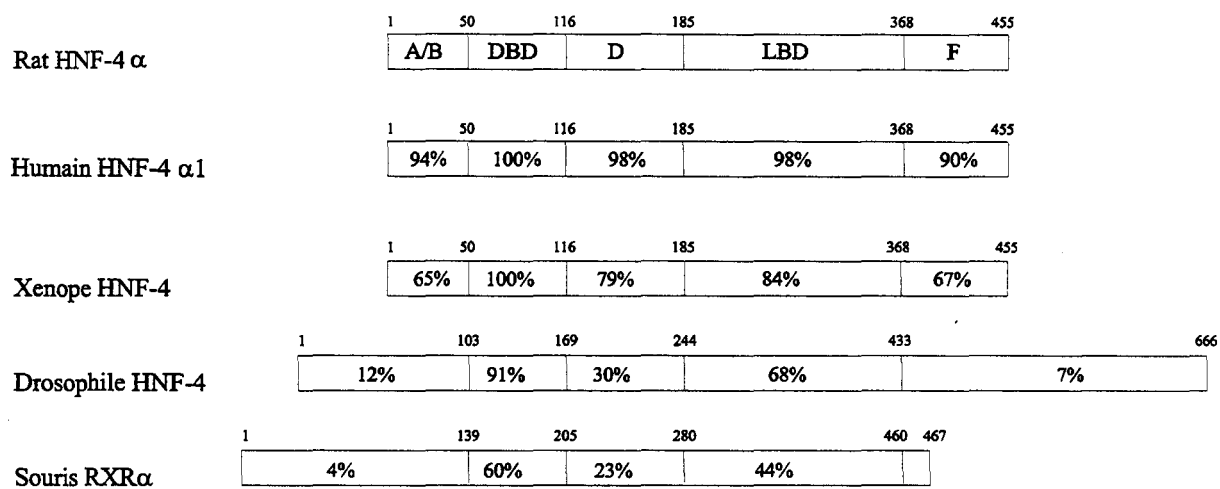


Figure 9. Conservation de HNF-4 entre les espèces. Les pourcentages de similitude de séquence de HNF-4 de xénope, drosophile, humaine et de RXR de souris, avec les domaines de HNF-4 $\alpha$  de rat sont indiqués.

Il est important de noter que HNF-4 présente des similitudes de séquence assez importantes avec RXR.



## **B. Les différents rôles de HNF-4.**

HNF-4 $\alpha$  est abondant dans le foie, l'intestin, le rein, et est présent en quantité plus faible dans le pancréas. HNF-4 a un rôle très important dans l'embryogenèse, mais il participe aussi à la différenciation d'au moins deux (foie, intestin) de ces quatre tissus. Chez l'adulte, il est un facteur clé pour la régulation de gènes exprimés spécifiquement dans ces tissus et il joue un rôle prépondérant dans, entre autres, le métabolisme du glucose.

### **I. Au cours de l'embryogenèse et de la différenciation cellulaire :**

#### **1. Rôle dans l'embryogenèse et l'organogenèse :**

Le développement embryonnaire nécessite l'intervention, à un moment donné, de facteurs de transcription spécifiques. HNF-4 intervient ainsi dans l'organogenèse du foie, de l'intestin et des reins. Chez la drosophile, il existe un homologue de HNF-4 appelé HNF-4 (D). Des mutants de drosophile dont le locus de HNF-4(D) est muté, ne peuvent pas développer certains organes : le moyen intestin, les "fat bodies" et les tubules de Malpighie, qui sont les structures équivalentes à l'intestin, au foie, et au rein, chez les vertébrés (Zhong *et al.* 1993). Chez ces derniers, HNF-4 intervient aussi durant l'embryogenèse. Il a un rôle durant la formation de l'endoderme extra-embryonnaire, et dans la détermination des fonctions hépatiques et intestinales. En effet, chez la souris, les ARNm de HNF-4 sont retrouvés au stade 4.5 jours au niveau de l'endoderme primaire du blastocyste et au stade 5.5 jours dans les cellules de l'endoderme viscéral. La première apparition de HNF-4 dans les tissus embryonnaires, est détectée au stade 8.5 jours dans le foie et l'intestin primitif (Duncan *et al.* 1994). De plus, l'inactivation génique de HNF-4 provoque de sévères perturbations du déroulement de la gastrulation, conduisant à la mort de l'embryon dès le jour 10.5 (Chen *et al.* 1994). Il a été montré que HNF-4 est aussi impliqué dans les stades précoces du développement de *Xenopus*, en déterminant le destin de différentes régions de l'embryon. Ceci a lieu grâce à une coopération avec d'autres facteurs (Holewa *et al.* 1996).

Ainsi, plusieurs facteurs de transcription ont un rôle dans l'organogenèse du foie : HNF-1 (protéine à homéodomaine), C/EBP (protéine à "leucine zipper"), HNF-3 (protéine à "winged helix"), HNF-4, COUP-TFs (il existe COUP-TF I et II) et HNF-6 (protéine à homéodomaine contenant un domaine "cut").

Le foie primaire est formé entre les stades 8.5 et 9 jours de gestation chez la souris. Deux signaux indépendants sont nécessaires pour induire l'organogenèse hépatique primaire (Cereghini, 1996). Le premier provient du mésoderme pré-cardiaque qui stimule la prolifération de l'endoderme adjacent. Le deuxième événement permet à l'endoderme pré-hépatique de se différencier en lignées hépatiques. Ce deuxième signal provient de l'association entre l'endoderme antérieur et le mésenchyme. Ces inductions se font, soit grâce à des interactions cellule-cellule, soit grâce à des signaux diffusibles spécifiques. Après ces deux phases, l'endoderme hépatique prolifère pour former le foie primitif. Ces étapes de la formation hépatique ont été corrélées avec l'induction des différents facteurs de transcription présents en grande quantité dans le foie.

Ainsi, une hiérarchisation entre ces différents facteurs a été proposée. HNF-3 se trouve situé en haut de la hiérarchie. Il permet la régionalisation de l'endoderme (Levinson-Dushnik et Benvenisty, 1997). HNF-4, vHNF-1 et HNF-1 $\alpha$  apparaissent seulement au moment de l'organogenèse du foie. C/EBP (CCAAT/ enhancer-binding Protein) est exprimé relativement tardivement (Cereghini, 1996), il possède aussi la capacité de promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire. Cela laisse penser que C/EBP est plus impliqué soit dans la différenciation terminale, soit dans le maintien d'un état différencié non prolifératif (Figure 10).

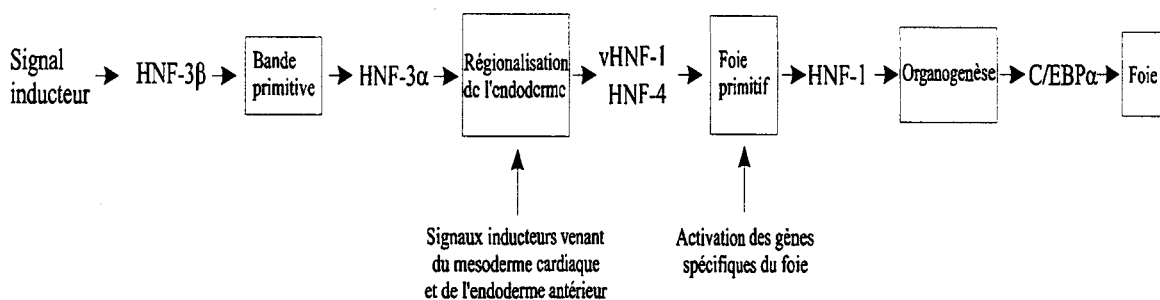


Figure 10. Hiérarchie des facteurs de transcription contrôlant le développement du foie (d'après Cereghini, 1996).

Des questions se posent alors : quels sont les facteurs qui régulent HNF-3, HNF-4, HNF-1, C/EBP (Figure 11). Le promoteur proximal de HNF-3 $\beta$  contient un site de fixation pour HNF-3, ce qui permet une autorégulation de ce gène. Il contient aussi un site de fixation pour la

famille de facteurs de transcription bZip C/EBP et un autre pour bZip PAR ("proline acid rich leucine zipper"). C/EBP n'est certainement pas impliqué dans l'induction de HNF-3 $\beta$  car son expression a lieu plus tard au cours du développement. Le promoteur de HNF-3 $\beta$  contient aussi un site de fixation pour HNF-6 (Samadani et Costa, 1996). HNF-6 a un rôle supposé dans les stades précoces du développement. De plus, une étude d'hybridation *in situ* sur des embryons de souris, montre que les transcrits de HNF-6 et HNF-3 $\beta$  sont colocalisés dans le foie pendant le développement de cet organe (Rausa *et al.* 1997). Néanmoins, HNF-3 $\beta$  et HNF-6 doivent contrôler les stades tardifs de la différenciation. Une autre étude montre que HNF-6 est aussi impliqué dans l'activation du gène de HNF-4 (Landry *et al.* 1997). En effet HNF-6 est capable de se fixer sur le promoteur de HNF-4 et leurs expressions sont concomitantes dans le foie. Cela suggère que HNF-6 joue un rôle dans le début du développement hépatique. Une étude récente (Duncan *et al.* 1998), réalisée dans des cellules embryonnaires, montre que HNF-3 $\beta$  est nécessaire à l'activation de l'expression des gènes de HNF-4 et de HNF-3 $\alpha$  et HNF-1.

Ce sont certainement les mêmes mécanismes et facteurs de transcription qui interviennent dans l'organogenèse de l'intestin, des reins et du pancréas. Cela n'exclue pas l'intervention d'autres facteurs de transcription.

## **2. Rôle de HNF-4 dans la différenciation :**

### 2.1 Différenciation des cellules hépatiques :

Différentes fonctions sont associées aux hépatocytes : la synthèse de la majorité des protéines plasmatiques, la régulation du métabolisme glucidique, lipidique, de l'urée, la formation de la bile mais aussi un rôle dans la détoxification des xénobiotiques. La synthèse de la majorité des protéines permettant ces fonctions, est régulée au niveau transcriptionnel. Les gènes de ces protéines sont activés par des facteurs de transcription. Ce sont ces mêmes facteurs qui sont impliqués dans les mécanismes de différenciation cellulaire, et aussi, comme nous l'avons vu précédemment, dans l'organogenèse.

Les Facteurs HNF-3, C/EBP, HNF-1 et HNF-4 interviennent dans la différenciation des cellules hépatiques, de plus HNF-1 et HNF-4 jouent un rôle crucial dans l'acquisition du phénotype cellulaire. Cela a été mis en évidence grâce à des expériences dans différentes

lignées. Ainsi la lignée cellulaire H5 est une lignée dédifférenciée qui a perdu ses fonctions hépatiques. Elle n'exprime plus HNF-4 et HNF-1 alors que C/EBP et HNF-3 eux le sont, donc la seule présence de ces deux derniers facteurs n'est pas suffisante pour maintenir l'expression des marqueurs de la différenciation hépatique. Par contre, la réexpression de HNF-4 $\alpha$  dans les cellules H5 permet l'activation de marqueurs hépatiques et l'activation du gène *hnf-1* (Späth et Weiss, 1997). Ce phénomène existe aussi dans une lignée d'hépatome dédifférencié C2 de rat, n'exprimant plus les facteurs HNF-1 et HNF-4, où la réexpression de l'ADNc de HNF-4 $\alpha$  rétablit le phénotype hépatique et l'expression de HNF-1 endogène (Kuo *et al.* 1992). Il faut noter qu'il existe au niveau du promoteur de HNF-4 un site de fixation de HNF-1, et un site de fixation de HNF-4 sur le promoteur de HNF-1. Cela suggère que ces deux facteurs sont reliés par des boucles de régulation, garantissant ainsi leur coexpression. Cependant, des études *in vivo* montrent que HNF-1 n'est pas nécessaire à l'expression de HNF-4, mais que son rôle serait d'assurer le maintien de cette expression. L'expression de HNF-1 dépend aussi à moindre degré de HNF-3 et AP-1 (jun/fos). Le site AP-1 permet la modulation de l'expression de HNF-1 via des signaux externes. HNF-1 est aussi capable de se fixer sur son propre promoteur. Selon certains auteurs, HNF-1 active sa propre expression en coopération avec HNF-4, et selon d'autres auteurs, il la réprime (Kritis *et al.* 1993; Miura et Tanaka, 1993). vHNF-1 (aussi appelé HNF-1 $\beta$ ) doit aussi intervenir dans cette boucle de régulation (Kritis *et al.* 1993; Miura et Tanaka, 1993). Le promoteur de vHNF-1 contient de plus des sites de fixation pour COUP-TFs, RAR-RXR et les facteurs de la famille Oct. vHNF-1 est exprimé plus tôt que HNF-1 (aussi appelé HNF-1 $\alpha$ ) au cours du développement. Cela est certainement dû à l'architecture de son promoteur, et surtout au fait que HNF-4 $\alpha$  n'est pas nécessaire à son expression. C/EBP $\alpha$  est capable de s'autoréguler, soit par une interaction directe avec son promoteur, soit par l'intermédiaire d'une activation par USF (Upstream Stimulatory Factor) chez l'homme. Cependant, la régulation la plus importante de C/EBP $\alpha$  est due à des modifications post-traductionnelles.

La différenciation hépatique (Figure. 11) est donc due à une combinaison entre tous les facteurs cités précédemment. Un facteur seul ne peut pas expliquer tout ce processus.

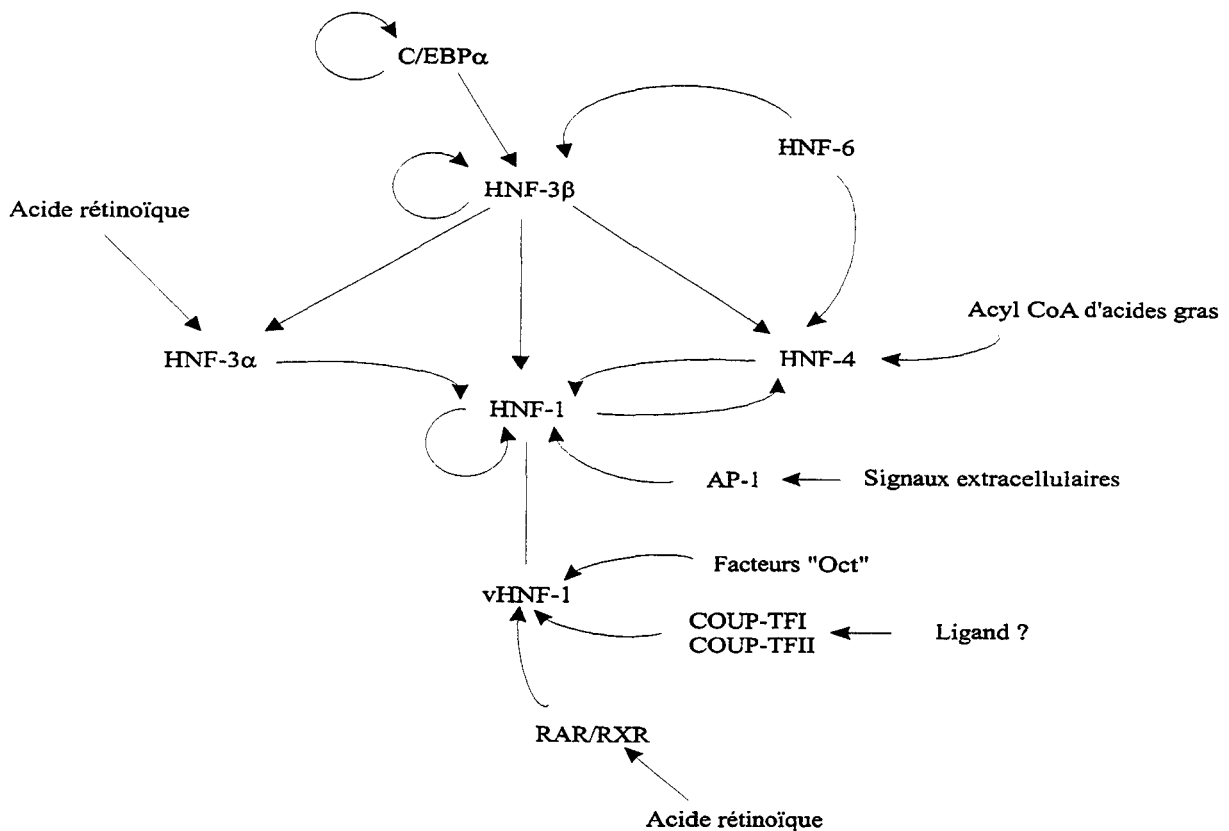


Figure 11. Boucles de régulation des différents facteurs de transcription intervenant dans la différenciation hépatique ( modifié d'après Cereghini, 1996).

## 2.2 Différenciation des cellules intestinales :

HNF-4, du fait de son expression précoce dans l'intestin, doit avoir un rôle important au cours de la différenciation des cellules de cet organe. Ainsi, les ARNm de HNF-4 sont détectés au jour 15 dans l'épithélium intestinal. Le rôle exact de HNF-4 dans la différenciation n'est pas encore documenté dans la littérature. Néanmoins, d'autres facteurs de transcription sont connus pour leur intervention dans ce processus. La protéine à homéodomaine CDX-1 est un facteur de transcription spécifique de l'intestin. Elle est exprimée au cours du développement intestinal, et elle a un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules de l'épithélium (Silberg *et al.* 1997). La protéine CDX-2 est impliquée dans les mêmes mécanismes (Suh et Traber, 1996). Le facteur BETA-2 intervient quant à lui dans la différenciation terminale des cellules de l'épithélium intestinal (Mutoh *et al.* 1998). L'inactivation génique de HNF-3β dans des embryons de souris (Weinstein *et al.* 1994) montre que ce facteur est nécessaire pour l'invagination de l'endoderme intestinal. HNF-3β est

donc impliqué dans la différenciation des cellules intestinales. Il a été montré que HNF-6 est présent dans les cellules intestinales HT-29 (Samadani et Costa, 1996). De plus, le facteur CDX-2 contient, au niveau de son promoteur, deux sites supposés de liaison de HNF-6. Samadani *et al* suggère que HNF-6 est impliqué dans la différenciation de l'épithélium intestinal via son interaction sur les promoteurs de HNF-3 $\beta$  et CDX-2. Sachant que HNF-6 est capable de se fixer sur le promoteur de HNF-4, il peut peut-être activer sa transcription au cours de la différenciation intestinale.

## **II. Contrôle de l'expression de divers gènes :**

L'étude de transactivation de gènes par HNF-4 $\alpha$  a été principalement effectuée sur les gènes exprimés dans le foie. Ainsi, HNF-4 $\alpha$  est capable de réguler la transcription de gènes intervenant dans les métabolismes lipidique, des acides aminés, glucidique et dans la synthèse des protéines sériques (Tableau II). Tous les gènes mentionnés dans le tableau II sont des cibles de HNF-4. Cela a été établi par la capacité de HNF-4 $\alpha$ 1 de rat à se fixer sur le promoteur de ces gènes et de l'activer. HNF-4 permet l'expression de ces gènes cibles au niveau du foie mais aussi de l'intestin, des reins ou du pancréas.

### **1 Rôle dans le transport et le métabolisme des lipides :**

#### 1.1 HNF-4 comme activateur de la transcription :

Les apolipoprotéines sont généralement synthétisées dans le foie et libérées dans la circulation sanguine quand elles sont associées avec des lipides pour former des complexes de densité variable appelés lipoprotéines. Il a été montré que HNF-4 est un important régulateur positif de l'expression de plusieurs gènes des apolipoprotéines.

**Lipides et transport du rétinol**

hApoCIII	-67/-85	5'-CGCTGGGCAAAGGTCACCT-3'
hApoAI	-195/-213	5'-GCA <u>GGGGTCAAGGGTTCAG</u> -3'
hApoAI	-117/-132	5'-TAGAGTTC <u>AAAGGATCA</u> -3'
hApoAII	-718/-736	5'-ACCAGGGTAAAGGTTGAAG-3'
hApoB	-63/-81	5'-AAA <u>GGTCCAAAGGGCGCCT</u> -3'
m,rCRBPII	-59/-77	5'-ACA <u>GAGTCAAAGGTCATAAA</u> -3'

**Coagulation sanguine**

hfactor IX	-42/-68	5'-TTGTACCAAAGTACAAG-3'
hFactor VII	-52/-68	5'-GACGGGCAAAGTTCTCT-3'
hFactor X	-45/-61	5'-CTGGAGCAAAGTCCACG-3'

**Autres protéines sériques**

hTransferrine	-71/-53	5'-GGGAGGTCAAAGATTGCCG-3'
hEPO	3499/3481	5'-GGTAGGTCGAGAGGTCAGA-3'
mTTR	-154/-136	5'-CTAGGCAAGGTTTCATATTT-3'
ha-1-AT	-106/-124	5'-ACAGGGGCTAAGTCCACTG-3'

**Métabolisme lipidique et stéréoïdien**

hMCAD	-326/-308	5'-CTCCGGGTAAAGGTGAAGG-3'
rFabpi	-85/-69	5'-AAGTTCAAAGTTCAGA-3'
rFabpi	-447/-432*	5'-AGGTTCAAAGTGCACA-3'
rACO	-555/-573	5'-ACCAGGAGAAAGGTCACGT-3'
mCYTP2A4	-61/-49	5'-AGACCAAAGTCCG-3'
rabCYP4A6	-741/-725*	5'-GTAGGACAAAGGCCAGG-3'
rabCYP4A6	-24/-6*	5'-ACTTGGGCAAGGGTCAGTG-3'
rCYP4A1	-24/-6*	5'-ATTTAGGCAAGAGGCAGAA-3'

**Métabolisme des acides aminés**

rTAT		
rOTC	-3583/-3601	5'-TACAGATCAAAGAGCAGCA-3'
rOTC	-115/-97	5'-TTAGGCTTAAAGTTCAGT-3'
rOTC(enh)	-15/-33	5'-AGGGGATCAAAGGTCCTAC-3'
rOTC(enh)	98/80	5'-AAAAGTTTAAAGTTCATCT-3'
	183/164	5'-TAGAGTTCAGAGGTTAAGC-3'

**Métabolisme du glucose**

rPEPCK	-436/-454	5'-CCACGGCCAAAGGTCATGA-3'
rL-PK	-127/-145	5'-TGGGGGCCAGAGTCCAGGA-3'

**Différenciation du foie**

mHNF-1a	-107/-89	5'-GCAAGGCTGAAGTCCAAAG-3'
XnLFB1/HNF-1	-270/-252	5'-TGGGGTCCAAAGTTCAGTA-3'

**Virus de l'hépatite**

hHBV enh I	GB element	5'-AACGGGGTAAAGGTTTCAGT-3'
hHBV enh II	-1679/-1664	5'-GAGTCCAAGAGTCTC-3'

**Site synthétique**

Direct repeat 1 (DR1) 5'-AGGTCAGAGGTCA-3'

**HNF-4 Consensus**

GGGTCAAAGGTCA  
A TGtggg Tctc  
c g

Tableau II : Gènes cibles de HNF-4. Localisation et séquence du site de fixation de HNF-4 sur les promoteurs de chacun des gènes (Sladek, 1994).

Ainsi, HNF-4 se fixe sur et active plus ou moins fortement les promoteurs de l'apolipoprotéine CIII (apoCIII), l'apoB, l'apoAII (Ladías *et al.* 1992), l'apoAI (Fuernkranz *et al.* 1994) l'apoAIV (Ktistaki *et al.* 1994). Un autre facteur de transcription est capable de se fixer sur les mêmes sites que HNF-4 sur ces promoteurs, il s'agit de COUP-TF qui lui réprime la transcription de ces gènes (Ladías *et al.* 1992; Ladías et Karathanasis, 1991; Ktistaki *et al.* 1994). Ainsi quand HNF-4 est présent en excès par rapport à COUP-TF, la transcription de ces gènes est activée, mais quand COUP-TF est en excès, la transcription est réprimée.

D'autres gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras sont des cibles de HNF-4. HNF-4 active la transcription du gène codant pour la chaîne moyenne de l'acyl-CoA déshydrogénase (MCAD). Il s'agit d'une enzyme mitochondriale qui catalyse la première étape de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Le site de fixation de HNF-4 sur le promoteur du gène de cette enzyme est aussi reconnu par RXR (Retinoic X Receptor) et à moindre degré par RAR (Retinoic *all trans* receptor)  $\alpha$  et  $\beta$  (Carter *et al.* 1993).

Le gène *Fabpi* code pour la protéine I-FABP (Intestinal Fatty Acid Binding Protein) participant au transport des ligands hydrophobes. HNF-4 et le facteur COUP-TFII sont capables de se fixer sur le promoteur de ce gène et de provoquer l'activation de la transcription (Rottman et Gordon, 1993).

HNF-4 active aussi les gènes de divers cytochromes (Yokomori *et al.* 1997; Strom *et al.* 1995). Ces cytochromes sont capables d'oxyder les stéroïdes, les acides gras, les prostaglandines et d'autres composés lipophiles non naturels comme des médicaments et des carcinogènes.

### 1.2 HNF-4 comme répresseur de la transcription :

HNF-4 est capable de réprimer la transcription de certains gènes. HNF-4 est alors en compétition avec l'hétérodimère PPAR/RXR pour la fixation sur les DR1.

Le gène de l'acyl-CoA oxydase (ACO) code pour une enzyme peroxysomale. Cette enzyme intervient au niveau de la première étape de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones, a été le premier facteur de transcription connu pour activer la transcription de l'ACO. Cette activation due à PPAR se fait en coopération avec RXR. HNF-4 peut se fixer sur le même site que PPAR/RXR sur le promoteur de l'ACO de rat mais avec une



affinité différente pour ce site (Silberg *et al.* 1997). HNF-4 active l'expression de ce gène, mais à moindre degré par rapport à PPAR. Il a été montré dans des expériences de transfection transitoire que HNF-4 réprime l'activation de PPAR, même en présence de proliférateur de peroxysomes. COUP-TF réprime aussi la transcription de ce promoteur. L'expression de l'hydratase-deshydrogénase, l'enzyme catalysant l'étape suivante dans la  $\beta$  oxydation est moins réprimée que celle de l'ACO par HNF-4 en absence de proliférateur des peroxisomes. Par contre en présence d'activateurs des peroxysomes, il existe une coopération entre HNF-4 et PPAR pour l'activation de ce gène.

L'utilisation des corps cétoniques est ajustée suivant la concentration sanguine en glucose. Si la glycémie s'abaisse, le taux d'insuline s'abaisse aussi et moins de glucose est disponible pour les muscles. C'est alors que les acides gras et les corps cétoniques sont exportés du foie vers le tissu musculaire ou ils serviront de source d'énergie. La 3-hydroxy 3-méthylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase) permet la formation de corps cétoniques. Elle permet la condensation de l'acétyl-CoA avec l'acétoacétyl-CoA pour former le 3-hydroxy 3-méthylglutaryl-CoA. PPAR peut se fixer sur le promoteur de la HMG-CoA synthase et permet l'activation de ce gène via les acides gras. HNF-4 réprime l'expression de ce promoteur en se fixant sur le même site que PPAR (Rodriguez *et al.* 1998). Il s'agit du même mécanisme que pour l'ACO. HNF-4 contribue donc à la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique.

## **2 Rôle dans le métabolisme des glucides :**

L'implication de HNF-4 dans ce métabolisme nous intéresse particulièrement, du fait du lien entre certaines mutations de HNF-4 et les diabètes non insulino-dépendants. A ce jour, il a été montré que HNF-4 régule les gènes de la L-pyruvate kinase (L-PK) et de la phosphoénol-pyruvate carboxykinase (PEPCK).

La L-PK catalyse la conversion du phosphoénol-pyruvate en pyruvate qui est l'étape terminale de la glycolyse. Les hormones et l'alimentation jouent un rôle important dans l'expression du gène de la L-PK. Ainsi, le glucose et l'insuline sont les activateurs les plus importants de cette expression. Le promoteur proximal de la L-PK contient un élément de réponse au glucose (GIRE). Ce promoteur est composé de quatre boîtes (notées L1 à L4) sur

lesquelles se fixent respectivement HNF-1, NF1, HNF-4 et USF (Kahn, 1997). La boîte L4 semble être responsable de la réponse positive au glucose et négative à l'AMPc (Kahn, 1997). Des études sur des souris transgéniques (Cuif *et al.* 1992), et sur des hépatocytes, montrent que les sites de liaison à USF et à HNF-4, quand ceux-ci sont maintenus dans le contexte du promoteur, sont nécessaires pour l'induction de la transcription par le glucose. Nous verrons par la suite qu'il existe une coopération entre HNF-4 et les facteurs de transcription se fixant sur le site L4 pour l'activation de ce gène. COUP-TF est aussi capable de se fixer sur la boîte L3 et réprime alors la transcription de ce gène. Nous avons déjà mentionné que la phosphorylation de HNF-4 joue un rôle inhibiteur dans l'activation de ce gène.

La PEPCK catalyse la synthèse du phospho-énol pyruvate à partir de l'acide oxaloacétique et inversement. Cette enzyme intervient surtout dans la néoglucogenèse. Son promoteur est plutôt complexe et permet la fixation de nombreux facteurs abondants dans le foie, comme C/EBP $\alpha$  et  $\beta$ , DBP, HNF-1, HNF-4 et probablement HNF-3 (Lemaigre et Rousseau, 1994). L'insuline diminue l'expression de la PEPCK, alors que le glucagon l'active.

Il existe peut-être d'autres gènes cibles de HNF-4 qui interviennent dans la glycolyse, comme GLUT-2, l'aldolase B, la glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase (Stoffel et Duncan, 1997) ou encore la glucokinase dont le promoteur contient trois sites potentiels pour HNF-4 (Lemaigre et Rousseau, 1994). Si cela est le cas, HNF-4 est vraiment un facteur déterminant dans le métabolisme du glucose, puisqu'il contrôlerait les premières et dernières étapes de ce métabolisme, même si bien sûr, il agit en coopération avec d'autres facteurs de transcription abondants dans le foie (Figure 12).

La glycolyse existe dans tous les tissus. Dans le foie, elle permet l'obtention de pyruvate et d'énergie. Dans les cellules  $\beta$  du pancréas, elle constitue en plus, la voie majeure pour la génération de signaux métaboliques qui déterminent la sécrétion d'insuline.

### **3. Rôle dans la synthèse des protéines sériques :**

HNF-4 participe à la régulation d'au moins trois des dix-huit protéines plasmatiques qui sont impliquées dans la cascade de la coagulation sanguine. Ces trois protéines sont les facteurs VII, IX et X dépendant de la vitamine K (Hung et High, 1996; Erdmann et Heim, 1995).

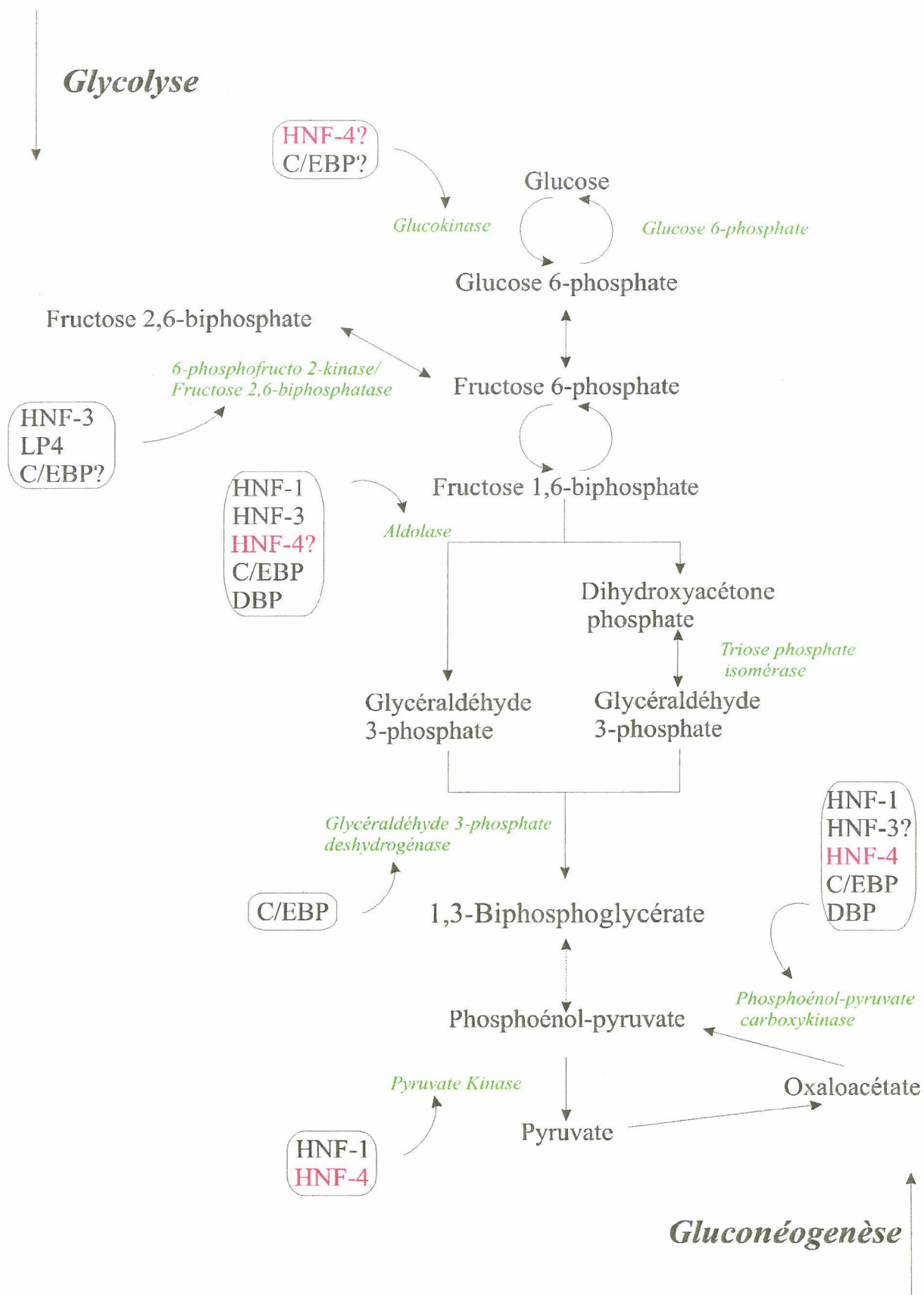


Figure 12. Voie de la glycolyse et de la gluconéogenèse et facteurs de transcription présents au niveau du foie intervenant dans la régulation des gènes de certaines enzymes impliquées dans ces voies métaboliques. Le facteur LP4 correspond au facteur HNF-6 (d'après Lemaigre et Rousseau, 1994).

La transferrine est essentielle pour la vie des vertébrés puisqu'elle a la capacité de fixer et de transporter le fer. Dans le foie, HNF-4 transactive le gène de la transferrine en se fixant sur le promoteur proximal (Hertz *et al.* 1996). La famille des facteurs C/EBP est aussi impliquée dans la régulation de ce gène. C/EBP  $\beta$  et  $\gamma$  sont en compétition avec HNF-4 pour l'activation de la transferrine, alors que C/EBP $\alpha$  active la transcription de façon indépendante de HNF-4.

La transthyrétine (TTR) fixe l'hormone thyroïdienne (T4) et la protéine liant le rétinol. TTR est aussi activé par HNF-4 (Costa *et al.* 1989). Il active aussi le gène de l'érythropoïétine, qui permet la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes, ou encore l' $\alpha$ 1-antitrypsine qui est un inhibiteur des protéases impliquées dans les mécanismes de l'inflammation. L' $\alpha$ 1-antitrypsine inhibe les excès d'élastase et de collagénase libérées par les leucocytes (Cereghini, 1996; Costa *et al.* 1989).

#### **4. Rôle dans le métabolisme des acides aminés :**

Le gène de la tyrosine amino-transférase permet de transformer la tyrosine en 4-hydroxyphényl-pyruvate et vice-versa. L'expression de ce gène est activée entre autre par HNF-4 et HNF-3 (Nitsch *et al.* 1993).

L'ornithine transcarbamylase (OTC) est l'une des cinq enzymes du foie participant au cycle de l'urée. HNF-4 se fixe sur deux sites au niveau du promoteur et deux sites au niveau de "l'enhancer" de ce gène. Cela entraîne une activation de la transcription. COUP-TF est capable de se fixer sur les mêmes sites que HNF-4, mais réprime la transcription de l'OTC (Kimura *et al.* 1993). C/EBP $\gamma$  est nécessaire pour avoir une activité transcriptionnelle maximale de ce gène.

L'arginase est l'enzyme qui catalyse la dernière étape du cycle de l'urée. Le gène de cette enzyme est réprimé par HNF-4, et cela sans liaison à l'ADN. Cet effet négatif est médié par Sp1, CTF/NF-1 ou encore C/EBP (Chowdhury *et al.* 1996).

## 5. Facteurs modulant l'activité de HNF-4 :

### 5.1 Synergie entre HNF-4 et d'autres facteurs de transcription :

Comme nous l'avons vu précédemment, HNF-4 intervient dans la différenciation cellulaire en coopération avec d'autres facteurs de transcription. Cette coopération intervient aussi dans la régulation de plusieurs gènes chez l'adulte.

HNF-4 est indispensable à l'expression des gènes des apolipoprotéines, cependant, il agit en synergie avec d'autres facteurs de transcription. Ainsi sur le promoteur de l'apoCIII, HNF-4 agit en synergie avec des facteurs ubiquitaires comme Sp1 (Talianidis *et al.* 1995). Un mécanisme similaire existe pour le promoteur de l'apoAI, l'activation de ce gène est due en partie à HNF-4 et HNF-3 $\beta$ . Ce dernier facteur se fixe sur le site B du promoteur de l'apoAI (Harnish *et al.* 1996). Sur le promoteur de l'apoB, il existe une coopération entre HNF-4 et C/EBP $\alpha$  (Metzger *et al.* 1993). Cette synergie joue un rôle essentiel dans l'expression du gène de l'apoB, même si d'autres facteurs de transcription comme HNF-1, HNF-3, COUP-TFII, sont aussi impliqués dans ce mécanisme.

Il existe aussi, au niveau du promoteur de la L-PK, une coopération entre HNF-4 qui se fixe sur la boîte L3 et les facteurs bHLH-LZ (leucine zipper) qui se fixent sur la boîte L4 (Moriizumi *et al.* 1998).

### 5.2. Rôle de l'alimentation :

Le régime alimentaire et plus particulièrement la teneur en acides gras de ce régime, est un facteur déterminant dans l'apparition et la progression de différentes pathologies comme l'athérosclérose, les hyperlipidémies, la résistance à l'insuline, l'hypertension, ou encore dans les défauts de la coagulation sanguine et certains cancers. Les effets de ces acides gras dépendent de la longueur de leur chaîne carbonée et de leur degré de saturation. HNF-4 $\alpha$  contrôle l'expression de gènes impliqués dans ces pathologies. Une étude récente a permis de montrer que les acides gras à longue chaîne, sous la forme de thioesters d'acyl-CoA modulent directement l'activité transcriptionnelle de HNF-4 $\alpha$  en se fixant sur son domaine de liaison au ligand (LBD). Cette fixation modifierait l'équilibre monomère/dimère de HNF-4 $\alpha$  ou modulerait l'affinité de HNF-4 $\alpha$  pour les promoteurs de ses gènes cibles. Ces thioesters d'acyl-CoA d'acides gras sont donc les ligands de HNF-4, les thioesters d'acides gras saturés à

14 ou 16 carbones seraient des agonistes de HNF-4, alors que ceux insaturés ( $\omega$ -3 et  $\omega$ -6) ou saturés à 18 carbones seraient des antagonistes (Hertz *et al.* 1998).

Deux études ont été réalisées sur des rats pour mettre en évidence l'influence de l'alimentation sur HNF-4. La première étude établit le lien entre le régime alimentaire et la phosphorylation de la boîte A de HNF-4 par la PKA. Comme nous l'avons vu précédemment, la phosphorylation par la PKA provoque une diminution de la liaison à l'ADN de HNF-4 (Viollet *et al.* 1997). Cette phosphorylation diminue quand l'alimentation est riche en carbohydrates, et elle augmente quand les rats sont à jeun ou quand ils prennent du glucagon. Dans la deuxième étude, le paramètre variable est la quantité de protéines contenues dans l'alimentation des rats. Cette étude (Marten *et al.* 1996) montre que la fixation à l'ADN de HNF-4 diminue quand l'alimentation est limitée en protéines. Cette diminution pourrait être due au niveau de phosphorylation de HNF-4.

Ces expériences montrent que suite à un repas, HNF-4 est activé. De plus une étude récente (Duncan *et al.* 1998) montre que l'insuline active la transcription des gènes de différents facteurs HNF, dont HNF-4 $\alpha$ .

HNF-4 régule donc une grande variété de gènes, mais cela implique l'intégration de nombreux signaux biologiques et la collaboration d'autres facteurs de transcription.

## Chapitre II : HNF-4 lié au diabète de type 2

HNF-4 $\alpha$  a été décrit comme génétiquement lié à la forme MODY 1 du diabète de type 2. Il est donc intéressant de définir les différentes formes de diabètes, et plus particulièrement les différents MODY.

### **A. Les diabètes :**

Le diabète sucré est une affection qui regroupe plusieurs catégories de syndromes dont le dénominateur commun est une élévation chronique de la glycémie à jeun et/ou en période postprandiale. Il est classique d'opposer les diabètes insulino-dépendant (DID ou diabète de type 1) et non insulino-dépendant (DNID ou diabète de type 2).

### **I. Généralités :**

#### **1. Les diabètes insulino-dépendants (DID) :**

Ce type de diabète survient plutôt chez les enfants ou avant l'âge de 20 ans. Il se traduit par une hyperglycémie et une acidocétose dues à un déficit en insuline. Ce défaut peut provenir de l'incapacité de l'individu à cliver la proinsuline. En effet la conversion de la proinsuline en insuline nécessite une protéolyse en des sites spécifiques. Si des mutations du gène de l'insuline apparaissent en ces sites de clivages, la conversion de la proinsuline échoue. Une production inadéquate d'insuline touche aussi les humains prédisposés à des réactions auto-immunes qui déclenchent la destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans et conduisent au tarissement de la production d'insuline. L'hyperglycémie résulte d'une surproduction hépatique (glucogénèse) et d'une sous-utilisation tissulaire périphérique du glucose. L'acidocétose découle d'une mobilisation accrue d'acides gras dans le tissu adipeux et de leur oxydation accélérée dans le foie. L'administration d'insuline fait régresser ces dérèglements.

#### **2. Les diabètes non insulino-dépendants (DNID) :**

La forme DNID survient plus volontiers chez les sujets de plus de 40 ans et en surpoids. Sur le plan clinique, ces diabètes sont dépourvus de potentiel cétogène et répondent

favorablement et durablement aux mesures diététiques (et/ou au traitement par antidiabétiques oraux).

Les causes exactes du DNID restent obscures mais il est évident qu'à l'instar de nombreuses maladies, l'apparition du diabète de type 2 dépend à la fois de facteurs génétiques et environnementaux. Sur le plan physiopathologique, le DNID est caractérisé par deux anomalies : un état d'insulino-résistance et des anomalies de sécrétion d'insuline endogène. L'insulino-résistance entraîne, au début de la maladie, une augmentation de la sécrétion insulinaire endogène qui est souvent la première anomalie. Cette insulino-résistance se retrouve au niveau des tissus pour lesquels le transport du glucose est sous la dépendance de l'insuline : muscle strié, coeur, tissu adipeux. Parmi ces tissus, c'est le tissu musculaire qui est le site principal de l'insulino-résistance. Cette réduction du captage musculaire du glucose empêche son oxydation par les cellules musculaires mais aussi son utilisation non oxydative, en particulier sur son stockage sous forme de glycogène. L'insulino-résistance se retrouve aussi au niveau du foie. Chez les sujets non diabétiques, l'insuline régule et freine la production hépatique du glucose. Chez les diabétiques de type 2, la résistance des hépatocytes à l'insuline se traduit par une augmentation de la production hépatique du glucose, laquelle contribue à l'entretien de l'hyperglycémie chronique. Cette augmentation de la quantité de glucose libérée par le foie est essentiellement liée à une augmentation de la néoglucogenèse à partir de lactate et de l'alanine. Dans un deuxième temps, la sollicitation excessive et permanente de la sécrétion d'insuline peut s'accompagner d'une diminution de la fonction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans.

De plus, l'hyperglycémie chronique peut conduire à des complications macrovasculaires (insuffisance coronarienne ou encore l'artérite des membres inférieurs pouvant conduire à des gangrènes), des microangiopathies (rétinopathie) et des polyneuropathies périphériques.

### 2.1. Facteurs prédisposants à l'apparition du diabète de type 2 :

⇒ *Les facteurs acquis :*

L'obésité joue un rôle majeur dans l'apparition des diabètes de type 2. Dans les surcharges pondérales communes, sans perturbation de la glycémie, un état d'insulino-résistance est habituellement observé, mais la glycémie reste normale dans la mesure où une sécrétion accrue d'insuline vient compenser la diminution de la sensibilité des tissus périphériques à



cette hormone. Le manque d'activité physique est aussi un facteur déterminant dans l'apparition des DNID. Ainsi, des enquêtes épidémiologiques pratiquées dans les îles de l'Océanie, ont montré que dans les populations qui évoluent vers la sédentarité par le biais d'une urbanisation croissante ou par le biais d'une élévation du niveau social, la prévalence du DNID augmente de manière significative (Monnier, 1995).

⇒ *Les facteurs génétiques et environnementaux:*

Le rôle des facteurs génétiques ne fait aucun doute dans les diabètes de type 2. La concordance quasi absolue de son apparition chez les jumeaux monozygotes et le risque élevé (près de 40%) de devenir diabétique si un de ses parents est atteint de diabète de type 2, sont autant de témoins du caractère génétique de la maladie. Toutefois, le mode de transmission génétique reste encore mal élucidé, bien que dans les populations des pays occidentaux, il semble que la maladie soit multifactorielle polygénique, les anomalies génétiques ne s'exprimant qu'en présence de facteurs environnementaux favorisants.

Ainsi des anomalies du transporteur du glucose 2 (GLUT-2) dans les cellules  $\beta$  pancréatiques ont été mises en évidence. La pénétration du glucose dans les cellules  $\beta$ , nécessaire à toute activation de l'insulino-sécrétion en situation physiologique, est conditionnée par la présence de la protéine membranaire appelée GLUT-2. Dans les diabètes de type 2, une diminution de près de 90% des transporteurs GLUT-2 a été observée dans les cellules  $\beta$ . Il n'a cependant jamais été établi qu'il existe des mutations sur le gène de *glut-2*. Par contre, des études effectuées sur des rats dont le pancréas a été enlevé à 90% (modèle d'étude pour l'hyperglycémie), montre que la perte de protéines GLUT-2 peut être expliquée en partie par une réduction du taux de transcription du gène *glut-2*, et par une réduction de la transcription de *pdx-1* (Zangen *et al.* 1997).

Le facteur de transcription PDX-1 (pancreatic et duodenal homeobox factor) est également impliqué dans d'autres mécanismes. Une étude a été réalisée chez des souris pour lesquelles *pdx-1* est invalidé spécifiquement au niveau des cellules  $\beta$ . Il apparaît que PDX-1 est indispensable pour le maintien du phénotype et pour la régulation de l'homéostasie du glucose dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Ahlgren *et al.* 1998). Le facteur PDX-1 est peut-être impliqué dans un autre mécanisme rencontré chez les personnes atteintes de diabète de type 2 : les dépôts amyloïdes. L'amyline, composée de 37 amino-acides, est normalement co-sécrétée

avec l'insuline. Les premières études expérimentales suggéraient que l'amyline inhibait la sécrétion de l'insuline et induisait une résistance à l'insuline au niveau des muscles squelettiques. Cependant un grand nombre d'expériences plus récentes ont montré que l'amyline est une troisième hormone pancréatique qui intervient dans l'homéostasie du glucose (Ludvik *et al.* 1997). La surexpression du gène de l'amyline doit contribuer au développement de la maladie. Sur le gène de l'amyline, il existe des éléments *cis*, nécessaires à l'expression  $\beta$  spécifique. Cette expression résulte de l'interaction entre des facteurs négatifs et positifs sur le promoteur de ce gène (Carty *et al.* 1997). PDX-1 permet d'obtenir l'expression  $\beta$  spécifique de l'amyline, mais les autres facteurs intervenant dans cette régulation ne sont pas encore connus. Une autre étude a montré que la surexpression isolée du gène de l'amyline n'est pas suffisante à elle seule pour former les dépôts d'amyloïde (Verchere *et al.* 1997). Il est capital de connaître ces facteurs afin d'établir des stratégies thérapeutiques pour préserver la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques chez les diabétiques de type 2.

L'exposition chronique de cellules  $\beta$  à des concentrations supraphysiologiques en glucose provoque, de plus, une diminution de la transcription du gène de l'insuline. Il a été montré que dans ces conditions, des cellules  $\beta$  en culture présentent une augmentation du taux de transcription du facteur de transcription C/EBP  $\alpha$ . Ce facteur est alors capable de réprimer la transcription du gène de l'insuline en séquestrant le facteur E47 (Lu *et al.* 1997). Ces mécanismes sont présents et entretenus dans des conditions d'hyperglycémie (notion de glucotoxicité).

Par contre il a été clairement établi, qu'un type particulier de diabète de type 2, le MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), est corrélé avec des mutations sur des gènes particuliers.

## **II. Le diabète de type MODY :**

Le diabète de type MODY (Maturity Onset Diabetes Of the Young) ou diabète non insulino-dépendant du sujet jeune est la forme monogénique de DNID la plus fréquente. Sa prévalence est d'au moins 2 à 5% des DNID (Velho et Froguel, 1998). Il s'agit d'un diabète qui débute avant l'âge de 25 ans (en réalité souvent avant l'âge de 15 ans) et qui présente une transmission autosomique dominante à forte pénétration (90%). Le phénotype MODY est caractérisé par une hyperglycémie chronique d'origine non auto-immune qui, dans les formes

les plus sévères, s'aggrave avec le temps et entraîne l'apparition de complications dégénératives tout comme le DNID à début plus tardif. Biologiquement, les patients MODY ont en général des concentrations normales ou basses d'insuline, malgré leur hyperglycémie chronique, témoignant d'une anomalie primitive de l'insulino-sécrétion (Velho et Froguel, 1996). Pour l'instant quatre gènes de susceptibilité au MODY ont été mis en évidence. Il s'agit du gène *hnf-4α* qui est associé au MODY 1, du gène de la glucokinase associé au MODY 2, du gène *hnf-1α* corrélé au MODY 3, et *pdx-1* au MODY 4 (Tableau III.).

	<b>MODY 1</b>	<b>MODY 2</b>	<b>MODY 3</b>	<b>MODY 4</b>
Locus	20q	7p	12q	13q
Gène	HNF-4α	Glucokinase	HNF-1α	IPF-1 (PDX-1)
Distribution (% de famille MODY)	Rare	(10-65%)a	(20-75%)a	Rare
Age du diagnostique	Post pubère	Enfance	Post-pubère	Adulte jeune
Défaut primaire	Pancréas/autre?	Pancréas/foie	Pancréas/rein/autre?	Pancréas/autre?
Sévérité du diabète	Sévère	Moyen	Sévère	Moyen?
Complications	Fréquentes	Rares	Fréquentes	Non déterminées

Tableau III : Caractéristiques des différents MODY mis en évidence à ce jour (d'après Velho et Froguel, 1998).

a ; différentes distribution dans différentes familles.

Le rôle de ces gènes dans les formes tardives du DNID n'est pas clairement établi. Ces gènes ne semblent pas être des gènes majeurs du DNID. Ils pourraient, cependant, jouer un rôle mineur dans un contexte polygénique, ou jouer un rôle important dans certaines populations.

### 1. Le MODY 1 :

Le MODY 1 se caractérise par un défaut de sécrétion d'insuline induit par le glucose. Ceci est dû à un dysfonctionnement des cellules β du pancréas. Des études récentes ont mis en évidence 7 mutations dans le gène de HNF-4α liées au MODY1 (Figure 13).

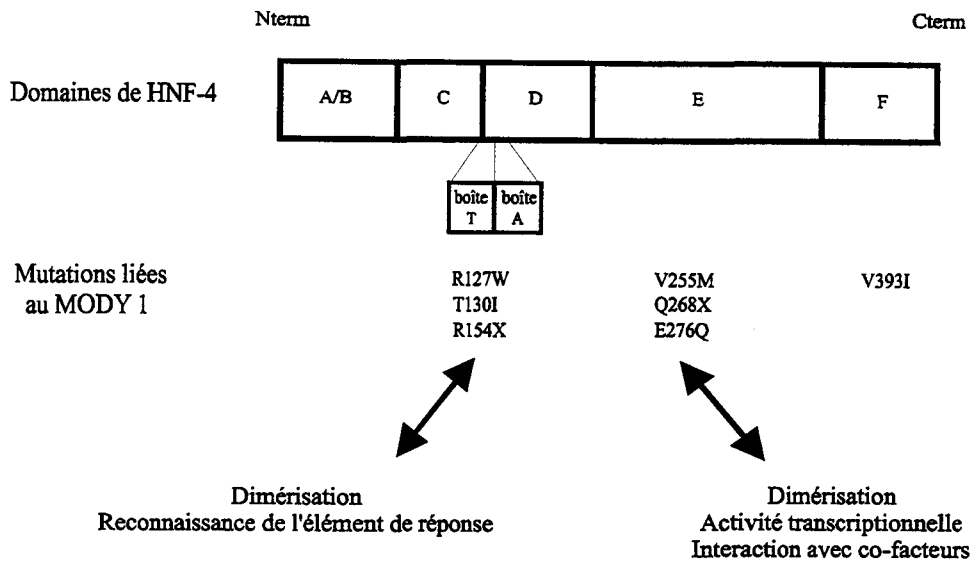


Figure 13. Représentation schématique des domaines de HNF-4 $\alpha$ . Localisation des mutations de HNF-4 $\alpha$  liées au MODY 1 et fonctions du récepteur qu'elles peuvent perturber. Les éventuelles conséquences de ces mutations n'ont été documentées que dans trois cas.

Dans le contexte du MODY 1 HNF-4 $\alpha$ , facteur de transcription, joue un rôle clé dans la régulation de gènes des métabolismes du glucose, du cholestérol et des acides gras. Il est ainsi essentiel au fonctionnement normal du foie, de l'intestin, des reins et des îlots  $\beta$  du pancréas. HNF-4 $\alpha$  est, de plus, un régulateur de HNF-1 $\alpha$ , ce dernier étant impliqué dans le MODY 3. Comme nous l'avons déjà vu, HNF-4 $\alpha$  est composé de 6 domaines, chacun d'eux conférant des propriétés particulières à la protéine. Les mutations découvertes se situent dans différents domaines de HNF-4 $\alpha$ . Certaines de ces mutations (Q268X et R154X) conduisent à la production de protéines tronquées (Lindner *et al.* 1997; Yamagata *et al.* 1996a). D'autres mutations ont été caractérisées, il s'agit de deux substitutions conservatives V255M et V393I (Moller *et al.* 1997; Hani *et al.* 1998), et trois substitutions non conservatives R127W, T130I, E276Q (Furuta *et al.* 1997; Bulman *et al.* 1997; Moller *et al.* 1997). Une étude génétique récente (Malecki *et al.* 1998) montre que la mutation V255M ne ségrège pas avec le phénotype MODY dans trois familles étudiées. Cette étude montre aussi, que l'acide aminé T130 est souvent substitué dans le groupe contrôle ou diabétique étudié, suggérant que ce variant n'a pas d'impact sur le MODY. Jusqu'à présent seulement trois études fonctionnelles ont été réalisées afin de corréler ces mutations avec un dysfonctionnement de HNF-4 $\alpha$ . Deux de ces études fonctionnelles ont été réalisées sur le mutant HNF-4 $\alpha$  Q268X. Cette mutation a

pour conséquence la production d'une protéine qui possède les domaines C et D (permettant la liaison à l'ADN) intacts, mais un domaine E (domaine de liaison au ligand) tronqué, et l'absence de l'AF2 (permettant la transactivation). Stoffel *et al* ont montré que HNF-4 $\alpha$  Q268X a perdu ses capacités de dimérisation, de fixation à l'ADN et de transactivation d'un gène cible (Stoffel et Duncan, 1997). L'étude de Sladek *et al* (Sladek *et al.* 1998) montre que HNF-4 $\alpha$  Q268X n'est plus localisé au niveau du noyau cellulaire. Chez l'hétérozygote, la production de HNF-4 fonctionnelle est réduite de moitié, ce qui induirait une baisse de transactivation de gènes cibles. L'étude de Stoffel indique que l'invalidation génique de HNF-4 $\alpha$  dans des cellules embryonnaires s'accompagne d'une diminution modérée de la transactivation de HNF-1 $\alpha$ . Par contre, cette extinction provoque une baisse de la transcription de gènes importants dans le métabolisme du glucose : GLUT-2, l'aldolase B, glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase, et L-PK (Stoffel et Duncan, 1997).

Notre étude portant sur la mutation V393I (Hani *et al.* 1998) montre que cette mutation entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle de gènes cibles. Cette mutation se trouve dans le domaine F de HNF-4 $\alpha$ , et il est connu que ce domaine possède la capacité de moduler l'activité transcriptionnelle de l'AF-2 (Iyemere *et al.* 1998 et travaux personnels). Sachant que HNF-4 $\alpha$  est présent en faible quantité dans le pancréas, la diminution de son activité peut avoir de graves conséquences sur l'expression de ses gènes cibles.

## **2. Le MODY 2 :**

Le MODY 2 est associé à des mutations dans le gène de la glucokinase (Velho et Froguel, 1998). Au moins 80 mutations différentes ont été décrites. Elles sont disséminées sur la majeure partie des régions codantes de ce gène (Velho *et al.* 1997). Ce diabète débute dès les premières années de la vie. L'hyperglycémie provient d'un défaut insulino-sécrétoire pancréatique dû à la glucokinase mutée, mais est aggravée par les anomalies hépatique du métabolisme du glucose. Chez l'homme, la sévérité du diabète est différente selon la nature des mutations en cause. Les mutations responsables d'une altération importante de l'activité de la glucokinase sont associées à une hyperglycémie plus importante que les mutations "mineures", bien que généralement le MODY par déficience en glucokinase soit une forme peu sévère de diabète.

La glucokinase est une enzyme clé de contrôle et d'intégration du métabolisme du glucose dans les cellules insulino-sécrétrices du pancréas endocrine et dans les hépatocytes (Figure 14).

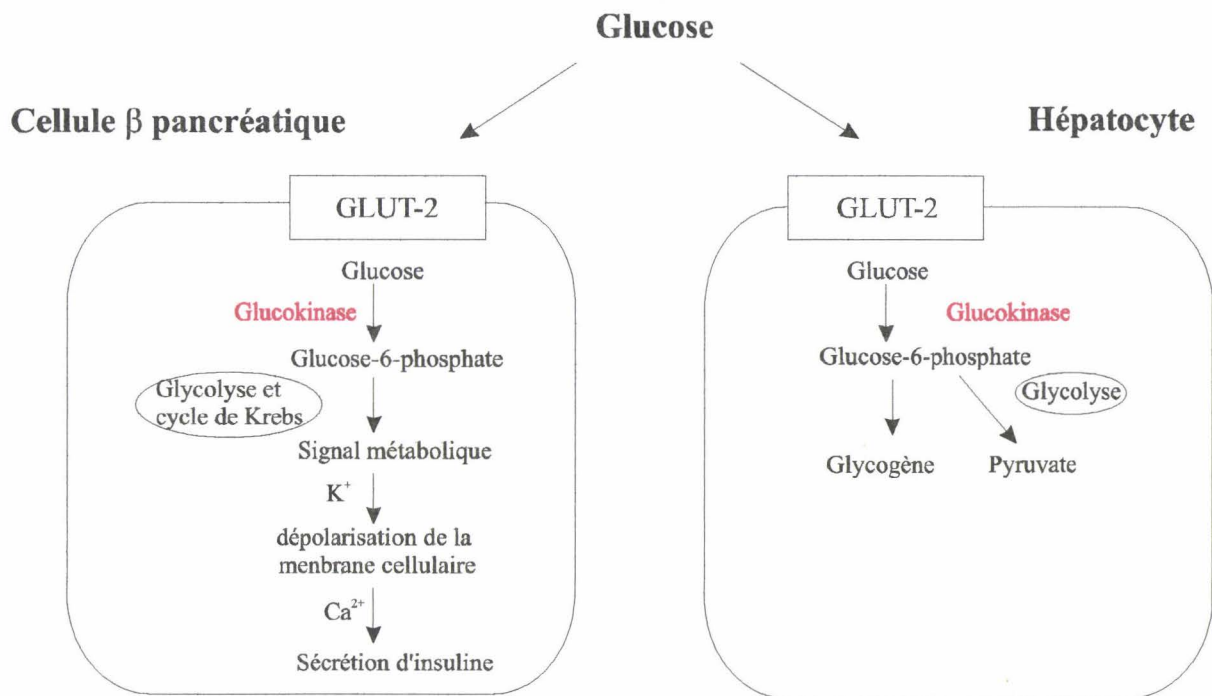


Figure 14. Fonction de la glucokinase dans les cellules β pancréatiques et dans les hépatocytes (D'après Velho et Froguel, 1996).

La phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate, catalysée par la glucokinase dans ces tissus, est la première étape du métabolisme cellulaire du glucose. Des études sur des glucokinases mutées et produites *in vitro*, ont montré que ces mutations diminuent l'activité enzymatique de phosphorylation du glucose (Gidh-Jain *et al.* 1993). Dans les cellules β pancréatiques, le métabolisme du glucose et l'insulino-sécrétion sont fortement dépendants de l'activité de l'enzyme. La diminution de l'activité enzymatique de la glucokinase entraîne une diminution de la sensibilité au glucose de ces cellules. Chez les sujets atteints de MODY 2, la sécrétion d'insuline est diminuée de moitié pour un niveau glycémique donné (Velho et Froguel, 1996). L'insulino-sécrétion en réponse à des stimuli non glucidiques est par contre normale, ce qui confirme que le défaut insulinosécrétoire associé à ces mutations est dû à une

reconnaissance défectueuse spécifique du "signal" glucose. Dans le foie, la glucokinase permet la phosphorylation du glucose postprandial. Chez les porteurs de mutations de la glucokinase, la synthèse postprandiale du glycogène hépatique est diminuée et la production hépatique de glucose est augmentée. Une insulino-résistance périphérique, probablement secondaire à l'hyperglycémie et/ou l'hypoinsulinémie, est souvent présente chez ces sujets. L'ensemble de ces données métaboliques observées chez l'homme a été confirmé chez la souris où l'activité de la glucokinase a été modulée par transgénèse (Efrat *et al.* 1994; Bali *et al.* 1995).

### 3. Le MODY 3 :

Le MODY 3 est associé à des mutations dans le gène de HNF-1 $\alpha$  (Yamagata *et al.* 1996b). HNF-1 $\alpha$  est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes hépatiques, pancréatiques, et d'autres tissus. Plus de 50 mutations différentes de HNF-1 $\alpha$  co-ségrègent avec le phénotype MODY 3 (Velho et Froguel, 1998). Ce type de MODY est caractérisé par un défaut de sécrétion de l'insuline, suggérant que HNF-1 $\alpha$  est impliqué dans le fonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques. Cependant, les mécanismes et les gènes cibles associés à ce dysfonctionnement des cellules  $\beta$  demeurent inconnus. Les patients atteints de MODY 3 progressent rapidement vers une intolérance au glucose. Le MODY 3 est une forme sévère de diabète non insulino-dépendant. Une autre étude génétique (Horikawa *et al.* 1997) a mis en évidence, dans une famille japonaise, des mutations dans le gène de HNF-1 $\beta$  qui sont associées avec le phénotype MODY. Quatre mutations ont été identifiées dont une non sens. Cette mutation non sens est associée avec une forme sévère de MODY : progression rapide vers un traitement à l'insuline et complications importantes. Cependant, Beards *et al.* (Beards *et al.* 1998) suggèrent que ce gène n'est pas souvent impliqué dans les diabètes de type MODY dans les familles britanniques.

### 4. Le MODY 4 :

Ce MODY est corrélé avec une mutation dans le gène de *pdx-1* (Stoffers *et al.* 1997). PDX-1, est un facteur de transcription à homéodomaine impliqué dans le développement du pancréas, mais aussi dans l'expression de gènes  $\beta$  spécifiques dont le gène de l'insuline. Chez

les patients, la mutation dans *pdx-1* entraîne l'expression d'une protéine qui possède une délétion dans son domaine de transactivation. De plus, ces patients présentent une tolérance au glucose soit normale, soit déficiente. Une étude récente montre que des souris chez lesquelles le gène *pdx-1* a été invalidé, ne forment plus de cellules  $\beta$  et développent un diabète (Ahlgren *et al.* 1998). Cependant, cette mutation dans le gène de *pdx-1*, n'a pas été retrouvée chez des sujets japonais ayant un diabète de type 2 (Stoffers *et al.* 1997).

Comme nous l'avons vu, le diabète de type 2, et plus particulièrement le MODY est souvent associé à un dysfonctionnement du pancréas. Il nous a donc paru intéressant de préciser les connaissances actuelles sur cet organe et plus particulièrement sur les facteurs de transcription intervenant au cours de son développement mais aussi dans le pancréas mature.

## **B. Facteurs de transcription pancréatiques :**

Le pancréas est un organe particulièrement important dans l'organisme, non seulement pour son rôle dans la synthèse et la sécrétion des enzymes pancréatiques, mais aussi pour la synthèse d'hormones intervenant dans la régulation du métabolisme glucidique. Deux pathologies importantes sont associées à cet organe : le diabète et le cancer du pancréas. Connaître et comprendre le rôle des facteurs de transcription intervenant dans le pancréas est donc d'un grand intérêt. Avant de les aborder, nous rappellerons brièvement l'organisation morphologique et fonctionnelle du pancréas.

### **I. Morphologie du pancréas :**

Le pancréas provient de la fusion de deux bourgeons embryonnaires se trouvant des côtés dorsal et ventral du duodénum. Le bourgeon ventral est adjacent aux diverticules hépatiques, et le bourgeon dorsal se trouve du côté opposé au tractus digestif (Slack, 1995).

Le pancréas (Figure 15) consiste en deux types différents de tissus glandulaires :

- Les cellules exocrines qui sécrètent des enzymes pancréatiques dans l'intestin.
- Les cellules endocrines qui sécrètent des hormones dans le sang.



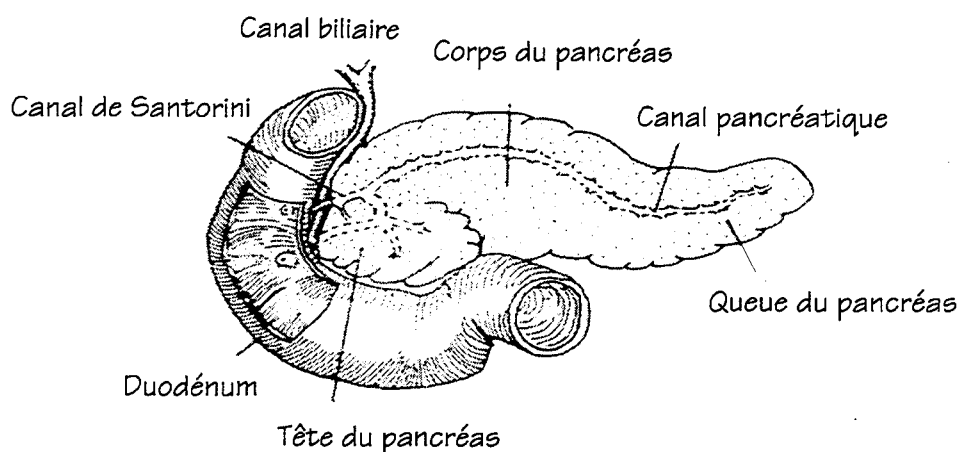


Figure 15. Le pancréas (d'après Slack, 1995)

### 1 Les cellules exocrines :

Elles sont disposées en nodules sphériques rassemblés en grappe appelés acini. Les cellules acineuses sont rangées le long des canicules qui se rassemblent en canaux plus grands pour former le canal pancréatique qui s'étend le long du pancréas pour se jeter dans le duodénum.

Beaucoup d'enzymes digestives incluant les protéases, lipases, et nucléases, sont synthétisées dans ces cellules. La plupart d'entre elles sont synthétisées sous la forme de proenzymes (ou zymogènes).

Zimogène	Enzyme actif	Substrat
Chymotrypsinogène	Chymotrypsine	Peptides
Trypsinogène	Trypsine	Peptides
Proélastase	Elastase	Peptides
Procarboxypeptidases	Carboxypeptidases A, B	Peptides
Prophospholipases A <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>	Phospholipides
	Amylase	Amidon/Glycogène
	Ribonucléase A	ARN
	Désoxyribonucléase	ADN

Tableau IV. Enzymes pancréatiques.

Une fois synthétisés par les cellules acineuses, les zymogènes vont s'accumuler dans des vésicules de sécrétions pour constituer les granules de zymogènes.

Le pancréas produit en plus d'autres enzymes digestives déjà actives (Tableau IV).

## **2. Les cellules endocrines :**

Au cours du développement, les cellules endocrines migrent à partir du système canalaire et se regroupent autour des capillaires pour former des amas isolés de cellules, dispersés dans le tissu exocrine. Ces amas de tissu endocrine sont appelés îlots de Langerhans. Ces îlots sont de tailles différentes et plus nombreux dans la queue du pancréas. Les îlots renferment différents types cellulaires, chacun étant responsable de la sécrétion d'un type d'hormones peptidiques :

- Les cellules  $\beta$  (ou B), qui sont majoritaires, permettent la sécrétion de l'insuline, mais aussi d'un autre peptide hormonal participant au contrôle de l'homéostasie glucidique, appelé amyline (IAPP).

- Les cellules  $\alpha$  (ou A ou A2) sécrètent le glucagon.

- Les cellules  $\delta$  (ou D ou A1) sécrètent la somatostatine.

- Les cellules PP (ou F) sécrètent le polypeptide pancréatique.

## **II. Les facteurs de transcription pancréatiques :**

Chaque type de cellules endocrines du pancréas est très spécialisé, et permet la synthèse d'une ou plusieurs hormones. Ceci implique qu'il existe des facteurs de transcription spécifiques de chaque type cellulaire. Pour isoler ces facteurs de transcription, différentes techniques ont été utilisées.

Ainsi, au niveau du promoteur du gène de l'insuline, il existe des régions riches en "A/T". Cette séquence a servi de sonde pour cloner les protéines qui sont capables de se fixer sur cette région chez le hamster (Jin et Drucker, 1996). Cette technique a permis de mettre en évidence des protéines à homéodomaine comme *lhx-1* (protéine à domaine LIM) et *cdx-3* (protéine caudale). L'identification d'autres protéines à homéodomains est basée sur la forte conservation des résidus d'acides aminés présents au niveau des hélices 3 et 1, entre ces

protéines (Jin et Drucker, 1996). Cette stratégie qui est basée sur des techniques de PCR, a permis d'isoler, à partir d'une banque d'ADNc de souris, d'autres facteurs comme STF-1/IPF-1/IDX-1/PDX-1 (Miller *et al.* 1994). Une approche similaire, par criblage d'une banque d'ADNc de cellules insulino-sécrétantes de hamster, a permis de mettre en évidence 8 autres gènes, qui n'étaient pas connus pour être exprimés dans les îlots (Rudnick *et al.* 1994). L'expression de ces gènes au niveau des cellules pancréatiques a été localisée par des techniques d'immunohistochimie. Des expériences du même type réalisées sur des coupes d'embryons de souris, ont montré que ces gènes sont aussi exprimés au cours du développement du pancréas. Certains de ces gènes ont été génétiquement invalidés chez la souris, afin de connaître leur rôle au cours de l'embryogenèse.

## **1 Les facteurs de transcription intervenant au cours du développement embryonnaire:**

### 1.1 les facteurs précoces :

Chez la souris, les cellules endocrines sont détectées à des stades précoces de la formation du pancréas, par contre les îlots ne se forment pas avant la fin de la gestation (Herrera *et al.* 1991). La formation et la différenciation du pancréas à partir du bourgeon endodermique nécessite une série de "signaux distincts". Ainsi l'expression de certains facteurs de transcription peut être corrélée avec le stade de développement du pancréas.

Chez la souris adulte, l'expression de la protéine PDX-1, encore appelé STF-1 (Leonard *et al.* 1993), IDX-1 (Miller *et al.* 1994), IPF-1 (Ohlsson *et al.* 1993), est trouvée dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, un peu dans les cellules  $\delta$ , et dans la muqueuse du duodénum. PDX-1 permet la transactivation du promoteur de l'insuline. Chez l'embryon de souris, l'expression de PDX-1 peut être détectée au stade 8.5 jours dans le bourgeon dorsal. Au stade 9 jours, son expression est détectée dans toutes les cellules du bourgeon pancréatique. De par son expression précoce, et sa localisation dans le pancréas, PDX-1 doit être le signal intrinsèque déterminant quelle région du bourgeon endodermique doit devenir le pancréas. Il activerait une série de gènes nécessaires à la morphogenèse et à la différenciation du pancréas (Ahlgren *et al.* 1996). De plus, il a été montré que chez la souris déficiente en PDX-1, la morphogenèse et la différenciation du bourgeon sont arrêtées. Stoffers *et al.* ont montré que PDX-1 a le même rôle chez l'homme (Stoffers *et al.* 1997).

HNF-3 $\beta$  (Hepatocyte nuclear factor 3), facteur de transcription appartenant à la famille des "forkhead" protéines, est connu pour son rôle important dans le développement de l'endoderme. Il possède un site de fixation sur le promoteur de *pdx-1*. Ce facteur est présent dans le pancréas mature au niveau des cellules exocrines et endocrines de type  $\beta$ . Différentes expériences (Wu *et al.* 1997) permettent de supposer que HNF-3 $\beta$  entraîne, au cours du développement, l'expression  $\beta$  spécifique de *pdx-1*. Ce mécanisme nécessite l'intervention de plusieurs facteurs de transcription dont PAX-4 (famille des facteurs à homéodomaine) et BETA-2 (Sharma *et al.* 1997). En effet, les souris invalidées pour le gène *pax-4* n'expriment pas PDX-1 dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Nitsch *et al.* 1993). Il est important de noter que le facteur de transcription HNF-6 (Hepatocyte nuclear factor 6) permet le maintien de l'expression de HNF-3 $\beta$  au cours de la morphogenèse et la différenciation du pancréas (Rausa *et al.* 1997). Le facteur ISL-1 (protéine à homéodomaine LIM) intervient lui aussi dans les stades précoces de la différenciation du pancréas. Il est nécessaire au développement du pancréas exocrine dorsal et à la génération de tous les types de cellules endocrines (Ahlgren *et al.* 1997). Prox-1 et Hox-11 sont aussi exprimés tôt dans le pancréas. Leur rôle au niveau de la différenciation des îlots n'est pas encore clairement établi.

### 1.2. Les facteurs tardifs :

D'autres facteurs de transcription interviennent plus tardivement, dans la spécialisation des cellules du pancréas. La famille de facteurs de transcription NKx2 (protéine à homéodomaine) intervient dans ce processus : Nkx6.1 pour la maturation des cellules  $\beta$  (Ahlgren *et al.* 1997), et Nkx2.2 pour les cellules  $\alpha$ ,  $\beta$  et PP (Sussel *et al.* 1998). La protéine Beta-2 (beta-cell E-Box trans-activator 2, appartenant à la famille bHLH) dont l'expression est limitée aux cellules  $\alpha$  et  $\beta$ , doit aussi avoir un rôle dans le développement et la différenciation de ces cellules. La protéine à homéodomaine Pax-6 est quant à elle, indispensable pour la morphogenèse et la formation d'un nombre normal des quatre types de cellules des îlots (Sander *et al.* 1997). PTF1 (pancreatic transcription factor 1) est lui essentiel pour la différenciation des cellules exocrines (Petrucco *et al.* 1990).

Le développement du pancréas nécessite donc l'intervention d'une combinaison de facteurs de transcription .

## 2. Les facteurs de transcription intervenant dans le pancréas mature :

Certains facteurs de transcription impliqués dans le développement du pancréas, le sont aussi dans la régulation de l'expression des gènes des hormones peptidiques et des enzymes du pancréas mature.

### 2.1. Dans les cellules endocrines :

Plusieurs facteurs de transcription (Tableau V) présents dans les cellules endocrines du pancréas, sont aussi exprimés dans d'autres cellules. La régulation des gènes des hormones peptidiques spécifiques des cellules endocrines, implique donc une coopération entre différents facteurs.

Facteurs de transcription		
classe	nom	distribution tissulaire
<b>bHLH</b>	E12/E47	ubiquitaire
	HEB	ubiquitaire
	Beta-2	îlots, cerveau
	Beta-3	îlots, poumon, rein, cerveau
<b>Homéodomaine</b>	PDX-1	îlots, duodénum
	Cdx-1	îlots, intestin, testicules
	Cdx-3	îlots, cellules intestinales
	HNF-1 $\alpha$	îlots, foie
	HNF-3 $\beta$	foie, poumon, pancréas
	Nkx 6.1	cellules $\beta$
	Nkx2.2	îlots, pancréas, cerveau
	alx3	îlots, pancréas, testicules
	Pax-4	cellules $\beta$
	Pax-6	embryon : îlots, système nerveux central, oeil, nez
	Prox 1	embryon : pancréas, foie, coeur, système nerveux central
	Hox 11	embryon : pancréas, rate, système nerveux central
	Brain-4	cerveau, neurones, cellules $\alpha$
<b>LIM homéodomaine</b>	Lmx-1	îlots, bourgeon ailaire
	Isl-1	îlots, neurones moteurs
	Lim 1	îlots, pancréas, cerveau, foie, testicules
<b>doigt de zinc</b>	Pur-1	ubiquitaire
	HNF-4	foie, intestin, rein, pancréas

Tableau V. Facteurs de transcription présents dans les cellules endocrines du pancréas. Famille à laquelle ils appartiennent et organes où ils sont exprimés (d'après Sander et German, 1997).

⇒ Au niveau des cellules  $\beta$  :

Le promoteur du gène de l'insuline est régulé par différents complexes protéiques (Figure 16).

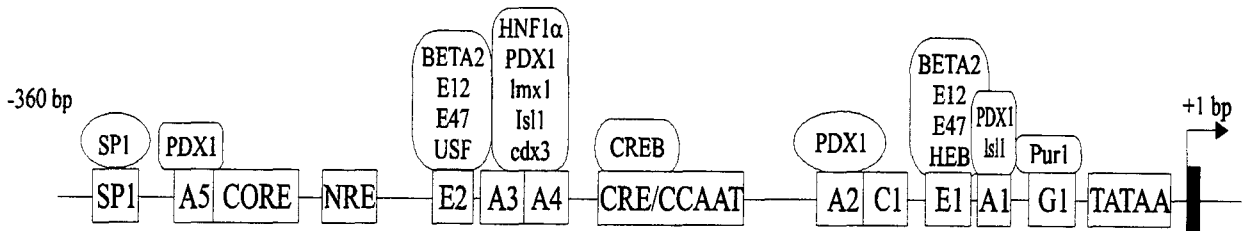


Figure 16. Position relative de certains éléments *cis* rencontrés sur le promoteur de l'insuline, et facteurs de transcription se fixant sur ces éléments (d'après Sander et German, 1997).

Les sites E fixent des facteurs de transcription appartenant à la famille des bHLH. Les sites A fixent plutôt des protéines à homéodomaine. La contribution relative de ces différentes protéines dans la transcription  $\beta$  spécifique du gène de l'insuline n'est pas claire. Il apparaît que ce n'est pas une seule protéine qui permet cette spécificité. Par exemple, la protéine PDX-1 (fixée sur les boîtes A) agit en synergie avec E47 et BETA2 (sur les boîtes E) pour activer ce promoteur (Lu *et al.* 1997).

Il existe une similitude entre les promoteurs des gènes de l'insuline, de l'amyline et de la glucokinase (ces protéines sont toutes synthétisées dans les cellules  $\beta$ ). De ce fait, ces promoteurs sont régulés par des protéines communes. Ainsi, le promoteur de l'amyline contient des régions riches en AT permettant la fixation de protéines à homéodomaine, comme ISL-1 qui en est l'un des activateurs de sa transcription (German *et al.* 1992).

HNF-4  $\alpha$  est présent en plus faible quantité dans les cellules  $\beta$  pancréatiques que dans le foie ou l'intestin (Miquerol *et al.* 1994). Il est connu que HNF-4 est un activateur des gènes de la L-Pyruvate kinase (L-PK) et de HNF-1 dans les cellules hépatiques. Au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques, HNF-1 $\alpha$  est un activateur du promoteur de l'insuline (Emens *et al.* 1992) et de la L-PK, une enzyme clé du métabolisme du glucose. HNF-4 a donc un rôle certain dans l'activation de ces gènes dans ces cellules. Stoffel *et al.* ont montré récemment que dans l'endoderme viscéral de "corps embryonnaire", l'expression d'autres protéines enzymatiques ou non, jouerait un rôle essentiel dans le métabolisme, et serait sous le contrôle de HNF-4 $\alpha$  : le transporteur de glucose 2 (GLUT-2), l'aldolase B et la glyceraldéhyde 3-phosphate

deshydrogénase (Stoffel et Duncan, 1997). Le site de fixation de HNF-4 $\alpha$  sur le promoteur des gènes de ces protéines n'a pas encore été identifié.

⇒ Au niveau des cellules  $\alpha$  :

Le proglucagon est exprimé, entre autres, dans les cellules  $\alpha$  pancréatiques. Des peptides dérivés du proglucagon sont obtenus par des modifications post-traductionnelles. Le glucagon apparaît être le dérivé ayant l'activité biologique la plus importante en régulant l'homéostasie du glucose. La région en 5' du gène du proglucagon contient deux "enhancers" (appelés G3 et G2), un élément de réponse à l'AMPc et un promoteur îlot-spécifique (G1). Les régions G3 et G2 sont les séquences d'ADN permettant l'inhibition de la transcription du gène induite par l'insuline et HNF-3 $\beta$ . La région proximale G1 interagit majoritairement avec des protéines présentes dans les îlots, et cela confère l'expression cellule  $\alpha$  spécifique du proglucagon (Philippe *et al.* 1988). Des expériences ont montré que cette expression est due à une ou plusieurs protéines à homéodomaine (Jin et Drucker, 1996; Laser *et al.* 1996). Ainsi, la protéine cdx2/3 se fixe sur G1 et permet la transcription du proglucagon dans les cellules  $\alpha$ . Le facteur de transcription neuronal à domaine Pou, Brain4 est présent en grande quantité dans le pancréas spécifiquement au niveau des cellules  $\alpha$ . De plus il interagit aussi sur l'élément G1 et permet l'activation de la transcription (Hussain *et al.* 1997).

⇒ Au niveau des cellules  $\delta$  :

La transcription de la somatostatine est aussi dépendante d'une association entre différents facteurs de transcription. Elle dépend entre autre de PDX-1, mais aussi de Isl-1. Ce dernier fonctionne en synergie avec CREB (cAMP responsive element binding protein) (Leonard *et al.* 1992).

## 2.2. Dans les cellules exocrines :

PTF-1 est connu pour avoir un rôle primordial dans l'expression des enzymes pancréatiques, comme l'élastase, la chymotrypsine, l' $\alpha$  amylase, la trypsine. L'activation des gènes de ces enzymes requiert néanmoins d'autres facteurs de transcription. Les protéines HNF-3 $\beta$  et  $\gamma$  sont capables de se fixer sur le promoteur du gène de l' $\alpha$ -amylase 2 mais leur rôle dans le contrôle de la transcription de ce promoteur n'est pas clair. Deux hypothèses ont

été émises. Le site de fixation de HNF-3 sur ce gène étant proche de la boîte TATA, HNF-3 permettrait le recrutement de composantes de la machinerie basale de la transcription. L'autre possibilité est que HNF-3 permet de stabiliser un nucléosome, de donner une conformation favorable à la chromatine, permettant ainsi les contacts entre les domaines d'activation de différents facteurs (dont PTF1) (Cockell *et al.* 1995). La régulation des gènes des cellules exocrines est aussi due à une combinaison entre les facteurs de transcription cités et certainement d'autres non encore identifiés.

Il est important d'élucider la régulation des gènes dans le pancréas afin de trouver des cibles potentielles pour soigner le diabète ou encore le cancer du pancréas.

HNF-4, à côté de son rôle bien documenté dans le foie et l'intestin, apparaît aussi être un des acteurs du jeu complexe des régulations impliquées dans le contrôle de l'activité du pancréas.



# Résultats-Discussion

Les recherches que nous avons effectuées au cours de ces trois années comportent deux grands axes.

Le premier axe de recherche concerne l'étude des différentes isoformes de HNF-4. Notre étude a porté d'abord sur leur expression au cours de la différenciation des cellules intestinales, afin de mieux comprendre leur rôle au cours de l'acquisition du phénotype intestinal. Ayant observé des variations de l'expression des isoformes au cours de ce processus, nous nous sommes orientée vers une étude plus fonctionnelle, ceci afin de déterminer si ces isoformes présentent des différences d'activité transcriptionnelle sur plusieurs gènes cibles.

La découverte par les généticiens de mutations du gène de HNF-4 $\alpha$  chez des sujets atteints de la forme MODY-1 du diabète non insulino-dépendant nous a amené à développer un deuxième axe de recherche. Il a pour objectif de déterminer si ces mutations affectent les propriétés fonctionnelles de HNF-4 $\alpha$ . Nous voulions rechercher un lien entre les données génétiques et l'apparition d'un éventuel défaut fonctionnel de HNF-4 $\alpha$  qui engendrera une dérégulation de ses gènes cibles impliqués dans le métabolisme du glucose et par conséquent dans l'expression de l'insuline.

## **A. Expression et activité des isoformes de HNF-4 :**

### **I. Expression des isoformes de HNF-4 et différenciation de lignées cellulaires humaines à phénotype intestinal.**

La différenciation cellulaire nécessite l'intervention, à un moment précis, de facteurs de transcription permettant l'activation de gènes spécifiques suivant le type cellulaire. Comme nous l'avons vu précédemment, parmi ces facteurs de transcription, HNF-1 et HNF-4 jouent un rôle crucial durant la différenciation des cellules hépatiques. Il existe une corrélation entre le stade de différenciation hépatique et l'expression de HNF-1 et HNF-4. Bien que HNF-4 soit également exprimé dans le rein, l'intestin et le pancréas, son rôle dans la différenciation des cellules de ces tissus n'était pas documenté.

Aucune étude de l'expression de HNF-4 dans la différenciation des cellules hépatiques ne s'est intéressée à l'expression de ses différentes isoformes au cours de ce processus. Pourtant ces isoformes présentent des variations de séquence en acides aminés surtout au niveau des domaines A/B et F. Il est aussi très probable que ces variations structurales entre ces isoformes entraînent des différences dans l'activation de gènes cibles, via peut-être l'interaction avec des cofacteurs. Il paraissait donc intéressant de déterminer si ces isoformes sont impliquées de manière différente dans la différenciation cellulaire.

De plus, dans cette étude nous avons inclus la détermination du rapport HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$ . En effet, il a été montré que dans des cellules hépatiques, des carcinomes hépatocellulaires et des carcinomes de cellules humaines rénales, HNF-1 $\beta$  est exprimé dans les cellules dédifférenciées et différenciées. Par contre, HNF-1 $\alpha$ , qui est seulement exprimé dans les cellules différenciées, apparaît être un marqueur de la différenciation cellulaire.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressée à l'expression des isoformes de HNF-4 et à la détermination du rapport HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  au cours de la différenciation de lignées cellulaires humaines ayant un phénotype intestinal.

#### **1. Stratégie :**

Nous avons utilisé une approche par RT-PCR pour déterminer l'expression des différentes isoformes. L'expression de toutes les isoformes est obtenue en utilisant des oligonucléotides reconnaissant la séquence conservée du domaine E. Des oligonucléotides reconnaissant les

zones variables de HNF-4 (domaine A/B et F) permettent, par contre, de déterminer l'expression spécifique de chaque isoforme. Ces études ont été réalisées sur deux lignées cellulaires humaines :

- Les cellules Caco-2, qui ont un phénotype entérocytaire après différenciation. Cette dernière se produit spontanément au cours de la culture après confluence. Nous avons donc comparé l'expression des différents facteurs à différents jours de la culture.

- La lignée HT-29 qui, selon les conditions de culture, présente des phénotypes différents. Lorsque les cellules sont traitées avec du methotrèxate, elles se différencient en cellules muco-sécrétantes (HT-29 MTX). En absence de glucose, elles acquièrent un phénotype entérocytaire (HT-29 G<sup>-</sup>), tandis que les cellules HT-29 non traitées demeurent à 98% non différenciées.

## **2. Résultats :**

Les résultats de cette étude ont fait l'objet de la publication suivante :

Suaud, L., Joseph, B., Formstecher, P., et Laine, B. mRNA expression of HNF-4 isoforms et of HNF-1 alpha/HNF-1 beta variants et differentiation of human cell lines that mimic highly specialized phenotypes of intestinal epithelium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 235(3):820-825, 1997.

## mRNA Expression of HNF-4 Isoforms and of HNF-1 $\alpha$ / HNF-1 $\beta$ Variants and Differentiation of Human Cell Lines That Mimic Highly Specialized Phenotypes of Intestinal Epithelium

Laurence Suaud, Bertrand Joseph, Pierre Formstecher, and Bernard Laine<sup>1</sup>

Unité 459 INSERM, Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté de Médecine de Lille, 59045 Lille cedex, France

Received May 28, 1997

The mRNA expression of HNF-4 isoforms and the ratio of HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  variants in cell lines representing highly specialized phenotypes of human intestinal epithelium were studied by RT-PCR. A strong rise in expression of HNF-4 isoforms  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4 and  $\gamma$  correlates with commitment into highly differentiated enterocyte-like phenotype of Caco-2 cells which best mimic enterocytes, whereas only isoform  $\alpha$ 4 expression is high in the less differentiated HT-29 G<sup>-</sup> cells. These increased expressions are not encountered in the highly differentiated mucous-secreting HT-29 MTX cells. Differentiation into highly specialized enterocyte-like Caco-2 cells and mucous-secreting HT-29 MTX cells is accompanied by a moderate rise in HNF-1 without change in the ratio of its variants. Our data corroborate those of Späth *et al.* (*Mol. Cell. Biol.*, 1997, 17, 1913) in hepatoma cells and suggest that HNF-4 isoforms  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4 and  $\gamma$  play a major role in the differentiation of enterocytes. © 1997 Academic Press

Cellular differentiation results from a programmed equipment of transcription factors which activate genes specifically in the considered cell and at a given time. Among transcription factors, HNF-1 and HNF-4 play a crucial role in differentiation of hepatic cells (1,2). In rat hepatoma-human fibroblast hybrids, the expressions of HNF-1 and HNF-4 are perfectly correlated with differentiated hepatic functions since these factors are extinguished in the dedifferentiated hybrids and reexpressed only in the cells showing reexpression of the hepatic phenotype.

HNF-4 belongs to the hormone nuclear receptor superfamily (3), the members of which exhibit a structure comprising six functional domains named A to F (4).

HNF-4 controls a large number of genes and plays a crucial role in organogenesis (5-7). Formation of a homodimer and phosphorylation are important functional characteristics of HNF-4 (8-10). Five isoforms of human HNF-4 have been described up to now. As shown in Fig. 1, by comparison with isoform  $\alpha$ 1, isoforms  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 4 exhibit an insertion of ten amino acid residues in the F domain and isoform  $\alpha$ 4 displays a second insertion of thirty amino acid residues in the domain A/B (11,12). Isoform  $\alpha$ 3 (also called HNF-4 C) has a completely different F domain (13). The  $\alpha$  isoforms differ only in these insertions, they are the products of the same gene whereas isoform  $\gamma$  is the product of an other gene (12). The HNF-1 transcription factor family consists of two closely related variants of the same homeoprotein HNF-1 $\alpha$  and HNF-1 $\beta$  (also called HNF-1 and v-HNF-1, respectively). They are encoded by different genes but share extensive identity in their DNA binding domain (2,14). Three isoforms (named A, B and C) of each HNF-1 variant have been reported (14). Isoforms of HNF-4 and HNF-1 can exhibit different transactivation potentials (12,14,15), therefore, the knowledge of their expression during the differentiation of cells is of great interest. In the above-mentioned study showing a correlation between HNF-4 expression and the differentiated state of hepatic cells, the existence of the various HNF-4 isoforms had not yet been reported and only all the HNF-4 isoforms taken together were considered. On the other hand, from expression studies of HNF-1 $\alpha$  and HNF-1 $\beta$  in hepatoma cells (16), hepatocellular carcinomas or hepatoblastomas (17) and human renal cell carcinomas (18), it appears that HNF-1 $\beta$  is persistently expressed in dedifferentiated as well as in differentiated cells whereas HNF-1 $\alpha$  is expressed only in differentiated cells.

HNF-4 and HNF-1 are also expressed in the intestine. A gradient of expression of HNF-1 $\alpha$  detected along the vertical axis of the intestine (from crypt to villus tip) suggests that this transcription factor is required

<sup>1</sup> Corresponding author, Fax: 0320626884; e-mail: blaine@biserte.lille.inserm.fr.

for differentiation of intestinal cells (19). The expression of the isoforms A, B and C of HNF-1 $\alpha$  and HNF-1 $\beta$  has been studied in several coloncarcinoma cells (14), but the HNF-4 expression and the HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  ratio modulation in relationship to the differentiation states of these cells are not documented. This paper describes the expression pattern of the various HNF-4 isoforms and the HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  ratio in relationship to the differentiation states of cell lines that mimic highly specialized phenotypes of human intestinal epithelium, with the aim to gain insights into the involvement of these transcription factors in the onset of intestinal phenotype.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture.** Caco-2 cells (ATCC HTB37), parental HT-29 cells (referred to as HT-29 STD), HT-29 mucous-secreting cells (HT-29 MTX) and HT-29 enterocyte-like cells (HT-29G<sup>-</sup>) which derive from human colorectal carcinomas were obtained from Drs T. Lesuffleur and A. Zweibaum (Unité INSERM 178, Villejuif, France) and grown as previously described (20). Caco-2 cells which spontaneously differentiate into enterocyte-like cells after confluence (which occurs at day 5 of culture) were harvested at days 4, 10, 15 and 27 after seeding. The differentiation state of these cells was checked by alkaline phosphatase activity measured in the cell homogenates. The HT-29 cell line grown in standard conditions (HT-29 STD) is composed of more than 95% undifferentiated cells whereas HT-29 cells selected by adaptation to 10<sup>-5</sup> M methotrexate (HT-29 MTX) and HT-29 cells selected by glucose deprivation (HT-29G<sup>-</sup>) differentiate into mucous-secreting cells and enterocyte-like cells after confluence, respectively (20,21); cells were harvested 21 days after seeding when they display maximum differentiation patterns (20). The differentiation state of these two cell lines was checked by mucous secretion and morphological criteria, respectively.

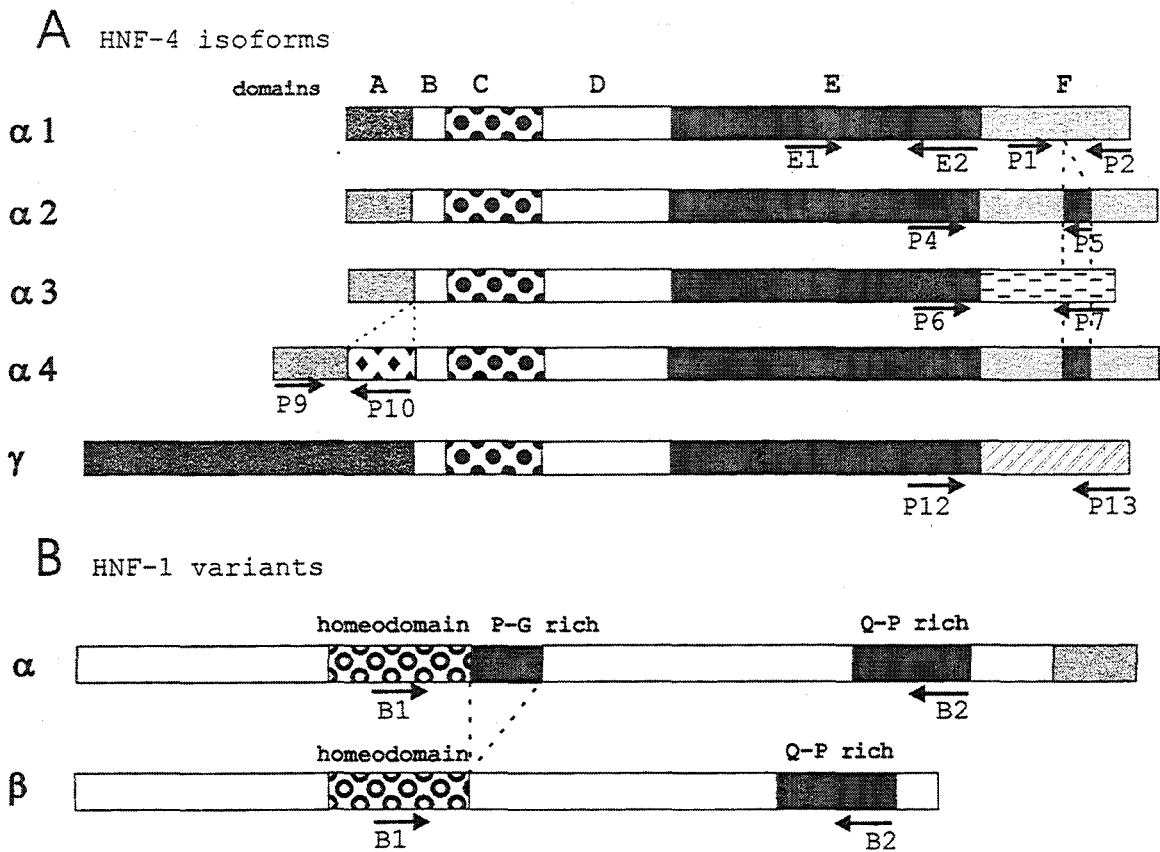
**RNA isolation, cDNA synthesis and PCR amplification.** Total RNAs were isolated as in (22). The cDNAs were synthesized as described in (23) with the M-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO BRL). PCR amplification was performed with a 2 $\mu$ l aliquot of reverse transcriptase reaction product [except to amplify the HNF-4 isoforms  $\alpha$ 3 (3 $\mu$ l) and  $\alpha$ 4 (4 $\mu$ l)], in a total volume of 25 $\mu$ l and in the presence of 0.2  $\mu$ M dNTP, 0.4 $\mu$ M primers and 1.25 U Taq DNA Polymerase (Promega) and using an annealing step at 57°C for 1 min. The number of cycles was such that amplification of the product was linear with respect to the amount of the respective input cDNA. Gel electrophoretic analyses, Southern blotting and hybridization of blots were performed as in (23). To normalize RNA, the acidic ribosomal phosphoprotein P0 (ARP P0) (24) was used in preference to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or to actin because their expressions decrease during growth of the cells studied here. In addition, the expression of ARP P0 has been shown to be independent of the cell growth conditions (25).

## RESULTS

**Strategy.** In this work we have used a semi-quantitative RT-PCR based method which allows to compare the relative amounts rather than the absolute amounts of a given molecule in cells exhibiting different phenotypes. This approach has been successfully used in expression studies of various transcription factors (6,14,26,27) and its accuracy has been verified by RNase protection experiments in the former cited

study. To study the expression of HNF-4 isoforms, we took advantage of the fact that their nucleotide sequences are highly conserved in domain E but highly variable in domain F. Therefore, as shown in Fig. 1A, choosing two primers (E1 and E2, Table I) in strictly conserved sequences of domain E allowed us to amplify simultaneously all the HNF-4 isoforms. On the other hand the isoforms  $\alpha$ 3 and  $\gamma$ , which have F domains with completely different sequences by comparison with that of isoforms  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 4, are specifically amplified using the primers P6+P7 and P12+P13, respectively. The three isoforms  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 4 are amplified simultaneously using primers P1 and P2 hybridizing to sequences placed upstream and downstream of the insertion of 30 nucleotides present in isoforms  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 4, yielding PCR products of 260 bp for the isoform  $\alpha$ 1 and of 290 bp for isoforms  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 4. The two isoforms  $\alpha$ 2+ $\alpha$ 4 are amplified together using the primers P4 and P5, the latter hybridizing to the sequence inserted in these isoforms. On the other hand, the isoform  $\alpha$ 4 is individually amplified using the primers P9 and P10, the latter hybridizing to the insert of 90 nucleotides within its A/B domain. We did not attempt to determine the expression of the three isoforms of HNF-1 $\alpha$  and HNF-1 $\beta$ , but instead focussed our study on the HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  ratio which appears to be correlated with the differentiation states of hepatic and renal cells (see the introduction). For this purpose we managed a strategy adapted from that described in (17). HNF-1 $\alpha$  and HNF-1 $\beta$  are simultaneously amplified using primers hybridizing to sequences common to their cDNAs: primer B1 in the homeodomain and primer B2 in the glutamine-proline rich region (Q-P rich) of the trans-activation domain (2); their amplification products are easily distinguished because the lack of the proline-glycine rich region (P-G rich) in HNF-1 $\beta$  results in a PCR product of 636 bp for HNF1 $\beta$  compared to 702 bp for HNF-1 $\alpha$  (Fig. 1 B). Although the isoform HNF-1 $\beta$ C, lacking the P-G rich region, is not amplified with our primers, the HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  ratio is reliable because this isoform represents only a minor species in Caco-2 and HT-29 cells (14). The sequences of the internal oligonucleotides (Table I) used to reveal the amplification products were chosen according to the following purposes: oligonucleotides E3 and B3 recognize sequences common to every isoform of HNF-4 and HNF-1, respectively whereas oligonucleotides P8, P11 and P14 specifically hybridize to HNF-4 isoforms  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 and  $\gamma$ , respectively. The oligonucleotide P3 hybridizes to the isoforms  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 4.

**Study with Caco-2 cells.** Caco-2 cells differentiate spontaneously after confluence, therefore, the expressions of the HNF-4 isoforms and of the HNF-1 variants at days D10, D15 and D27 were compared to the one at day D4 (undifferentiated state) taken as reference (Fig. 2). The band corresponding to the acidic ribosomal



**FIG. 1.** Schematic representation of the human HNF-4 isoforms and HNF-1 variants and strategy to determine their expression. Localization of the primers used for RT PCR assays (see Table I) is shown below each type of molecule. Different drawings in HNF-4 A/B and F domains reflect differences in sequences.

phosphoprotein ARP P0 remained constant (Fig. 2, line 1). The intensity of the band after 25 PCR cycles and corresponding to all HNF-4 isoforms increased from D4 to D27 (line 2). The methodology which consists in performing a lower number of PCR cycles (20 cycles) more significantly indicated this rise: a band after 20 PCR cycles was detected at D15 and D27 but was very faint at D10 and could not be detected at D4. When analyzing isoforms  $\alpha 2 + \alpha 4$  (line 3), a significant increase of the band after 28 PCR cycles was observed at days D15 and D27; here again, the band detected after a lower number of PCR cycles (23 cycles) at D15 and D27 could not be detected in the samples from the cells harvested earlier. Similar results were obtained when amplifying either the isoforms  $\alpha 1 + \alpha 2 + \alpha 4$  (data not shown) or the isoform  $\alpha 4$  alone, except that in this latter case, the intensity of the band decreased at D27 (Fig. 2, line 5). For the isoform  $\alpha 4$ , using a phosphorImager apparatus, we have estimated a 5-fold increase of the band after 35 PCR cycles from D4 to D15. In fact, the isoform  $\alpha 4$  is weakly expressed since the detection of its PCR product from cells grown for 4 days required 35 PCR cycles performed with a double amount of reverse transcription product ( $4\mu\text{l}$ ) versus 28 PCR cycles

(with  $2\mu\text{l}$ ) for isoforms  $\alpha 2 + \alpha 4$ . Taking into account the much larger amplification required to detect the isoform  $\alpha 4$  alone (logarithmic increment of amplification between 28 and 35 PCR cycles), we assume that analysis of the isoforms  $\alpha 2 + \alpha 4$  after 28 PCR cycles actually represents the  $\alpha 2$  isoform expression. When amplifying the isoforms  $\alpha 1 + \alpha 2 + \alpha 4$ , we were able to visualize on the gel stained with ethidium bromide, a faint band of size 260 bp corresponding to isoform  $\alpha 1$  in addition to the band of 290 bp corresponding to isoforms  $\alpha 2 + \alpha 4$  (Fig. 2, insert). After blotting and hybridization with the internal oligonucleotide P3 (Table I), visualization of the band of 260 bp was always hampered by the much stronger band of 290 bp. Therefore, in Caco-2 cells, expression of isoform  $\alpha 1$  is very low. Furthermore, the expression of isoform  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$  remained constant during differentiation (Fig. 2, insert and line 4, respectively). The expression of HNF-4  $\gamma$  and HNF-1  $\alpha$  and  $\beta$  rose from D10 onwards (Fig. 2, lines 6 and 7, respectively). Using a phosphorImager apparatus, from D4 to D27 we have estimated a 5-fold increase of the intensity of the HNF-4  $\gamma$  band and a 3.5-fold increase of the intensities of the HNF-1 $\alpha$  and HNF-1 $\beta$  bands taken together, however we observed

TABLE 1  
Oligonucleotides Used as PCR Primers and to Quantify PCR Products

Amplified molecules	Name	Primers	Sequences of primers	Positions	References
ARP PO	A1	upper	GGAAGGCTGTGGTGCTGATGG	223-243	(24)
	A2	lower	AAGGAGAAGGGGGAGATGTTG	611-631	(24)
	A3	internal	GTGTTACCAAGGAGACCTCACTGAGATC	342-371	(24)
HNF-4 all isoforms	E1	upper	CTGCTCGGAGCCACAAAGAGATCCATG	677-703*	(11, 12)
	E2	lower	ATCATCTGCCACGTGATGCTCTGCA	1023-1047*	(11, 12)
	E3	internal	GAGTCATACTGGCGATCGTTGATGTAGTCCTCCAA	947-981*	(11, 12)
HNF-4 $\alpha 1+2+4$	P1	upper	CGTGTGACCTGCACCCTCACCTGATG	1155-1174	(11)
	P2	lower	GTCGGATCCCCAGCGGCTTGTAGAT	1412-1430	(11)
	P3	internal	CAACACAATGCCACTCACCTCAGCAAC	1209-1234	(11)
HNF-4 $\alpha 2+4$	P4	upper	TGGCAGATGATCGAGCAGATC	1037-1057	(11)
	P5	lower	GGTCGGGGCCACTCACACATC	1260-1240	(11)
	P3	internal	CAACACAATGCCACTCACCTCAGCAAC	1209-1234	(11)
HNF-4 $\alpha 3$	P6	upper	CGTGGATCCTGGCAGATGATCGAGCAGATC	1035-1057	(11)
	P7	lower	GACGGATCCTCTAGACAGGTTAAGCAACTGTC	1250-1231	+
	P8	internal	ACTGTGTGAGGCCTGTCTCCT	1185-1164	(13)
HNF-4 $\alpha 4$	P9	upper	CATGGACATGGCCGACTACAGTGCT	129-154	(12)
	P10	lower	ACGGAGCTCGTCTCCCTGTGGAGAACTGTC	307-325	(12)
	P11	internal	TTGTTGCCGCTGCGTCTGCCAGATTGAGG	240-269	(12)
HNF-4 $\gamma$	P12	upper	GCCCACTGCAGAGCATCAC	2663-2683	(12)
	P13	lower	GACTGATGCTTGGTTTGCAGCTA	2953-2975	(12)
	P14	internal	GGTCCCATGTCAACACTGGTTTCATGCAGAC	2856-2885	(12)
HNF-1 $\alpha$ +HNF-1 $\beta$	B1	upper	TAGTGGAGGAGTGCACACAGGGC	718-739‡	(35, 36)
	B2	lower	TGGGAGAACTGGACGGGCTG	1401-1420‡	(35, 36)
	B3	internal	CACGGAGGTGCGTGTCTACAACCTGGTTTGC	800-829	(35, 36)

\* Positions in HNF-4  $\alpha 2$  isoform.

† Personal result.

‡ Positions in HNF-1 $\alpha$ A.

only a slight increase in the HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  ratio (4.5 to 6.0 from D10 to D27, the value of HNF-1 $\beta$  at D4 and after 23 cycles is too low to be precisely quantified).

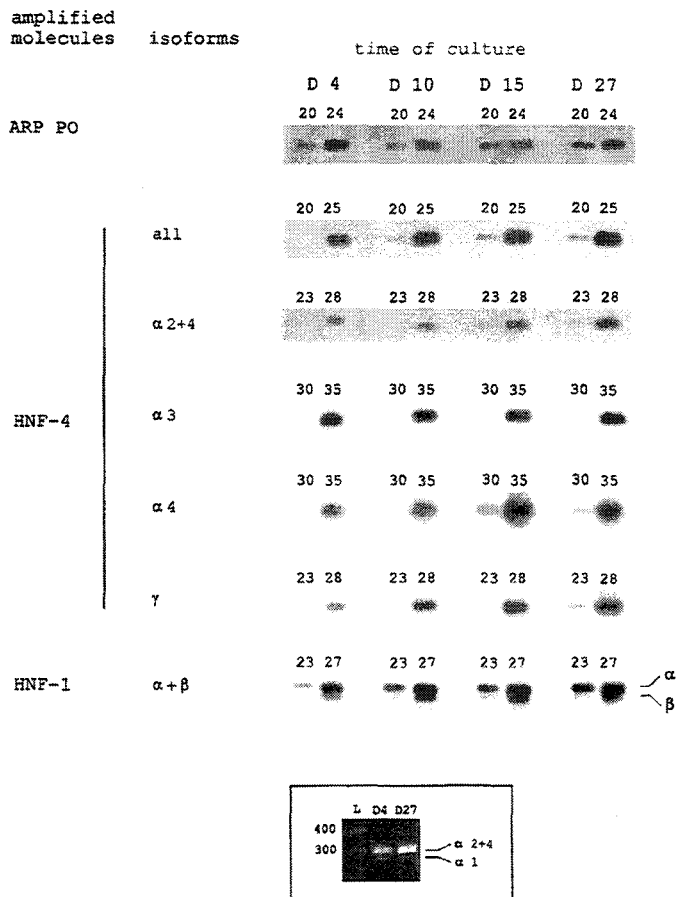
*Study in HT-29 cells.* As differentiation of HT-29 cells depends on the culture conditions, the expressions of HNF-4 and HNF-1 isoforms in the two differentiated HT-29 MTX and HT-29 G<sup>-</sup> cell lines (mucous-secreting and enterocyte-like, respectively) were compared to that in the undifferentiated HT-29 STD cell line taken as reference (Fig. 3). The expression of the HNF-4 isoforms did not show significant differences except for HNF-4  $\alpha 4$  and  $\gamma$ . Expression of isoform  $\alpha 4$  was very high in HT-29 G<sup>-</sup> and low in HT-29 MTX cells (line 5). As the intensity of the band corresponding to the isoforms  $\alpha 2+\alpha 4$  is similar in the three types of HT-29 cells (line 3), and taking into account that the isoform  $\alpha 4$  represents a very minor species in these cells, we assume that the expression of isoform  $\alpha 2$  is similar in the three cell lines. Expression of isoform  $\gamma$  is slightly lower in both HT-29 MTX and HT-29 G<sup>-</sup> cells when compared to that in HT-29 STD cells (line 6). Expression of HNF-1 $\alpha$  and  $\beta$  was moderately higher in HT-29 MTX but was similar in HT-29 G<sup>-</sup> and HT-29 STD cells (line 7). We did not observe any significant change in the HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  ratio (equal to 2.0) in the three cell lines.

## DISCUSSION

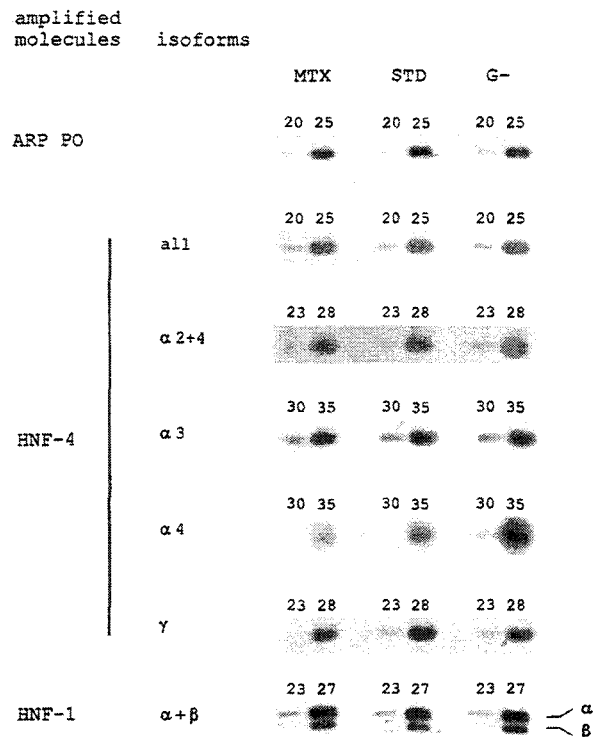
In this study we have used two cellular models which differentiate into enterocyte-like cells and one model that differentiates into mucous-secreting cells. More precisely, with respect to morphological criteria (brush-border microvilli) and lower levels of enterocytic specific hydrolase activities, HT-29 G<sup>-</sup> cells display a less differentiated enterocyte-like phenotype than Caco-2 cells that more closely resemble enterocytic cells of the small intestine epithelium (28). The differentiation of Caco-2 cells is accompanied by increased expression of HNF-4 isoforms  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  and  $\gamma$  and both HNF-1 $\alpha$  and HNF-1 $\beta$  whereas in the less differentiated HT-29 G<sup>-</sup> cells, only a high amount of HNF-4  $\alpha 4$  is found. HNF-4 isoforms expression in the well differentiated mucous-secreting HT-29 MTX and Caco-2 cells are very different. These striking data are reminiscent to the fact that in the intestine, the absorptive enterocytes displaying a brush border and the mucous-secreting goblet cells acquire, early after the initial stem cell division, highly specialized phenotypes due to different pathways of differentiation. The moderate rise in the expression of HNF-1  $\alpha$  and  $\beta$  is the only change shared in the well differentiated HT-29 MTX and Caco-2 cells. It is worth pointing out that the HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  ratio is not sig-



nificantly modified during the differentiation of these intestine-like cells. Thus, the significant change in HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  ratio reported during dedifferentiation of hepatocellular or renal cellular models (16-18) is not found in the cellular models studied here. Recently it has been shown that HNF-4 but not HNF-1 expression overcomes repression of hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells and that HNF-4 is a positive regulator of its own expression, thus arguing that HNF-4 is sufficient to establish heritable expression of many parameters of the hepatic differentiated state (29). On the other hand, lack of gut formation in a *Drosophila* mutant with a chromosome deletion spanning the HNF-4 locus supports an essential role of HNF-4 in early gut formation (30). Furthermore, during early development of mouse embryos, HNF-4 expression is restricted to visceral endoderm from which the intestine as well as the liver are derived (6). These data together with our results suggest a major



**FIG. 2.** Expression of the HNF-4 isoforms and the HNF-1 variants in relationship to differentiation of Caco-2 cells. Numbers given above PCR bands correspond to the number of PCR cycles. Insert represents PCR products of the HNF-4 isoforms  $\alpha 1 + \alpha 2 + \alpha 4$  loaded on an ethidium bromide stained gel. Values given on the left hand indicate the sizes of DNA ladder fragments.



**FIG. 3.** Expression of the HNF-4 isoforms and the HNF-1 variants in relationship to differentiation of HT-29 cells. Numbers given above PCR bands correspond to the number of PCR cycles.

role of HNF-4 in differentiation of enterocytes, and this role may be mainly played by isoforms  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  and  $\gamma$ .

Most of the transactivation studies by HNF-4 have been performed with the rat HNF-4 isoform  $\alpha 1$ , but this isoform represents only a minor species in Caco-2 and HT-29 cells as well as in the human hepatoma cell HepG2 (11) and in rat liver (31). Furthermore, transactivation by HNF-4 has been studied on numerous promoters expressed in liver but only on three promoters expressed in intestine (32-34). Taking into account that isoforms  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  and  $\gamma$  are strongly induced during the enterocytic differentiation process, investigation of their role on transactivation of promoters expressed in enterocytes of the intestinal epithelium appears to be of great interest.

**ACKNOWLEDGMENTS**

O. Moreau and B. Hémon are acknowledged for their technical assistance in cell cultures. The authors are indebted to G. Huet, A. Zweibaum and M. Lacasa for choice of cellular models and for critically reading the manuscript and valuable discussions. Inserm U 459 belongs to and is supported by IFR 22 (CH et U de LILLE, Centre Oscar Lambret, Inserm and Université de Lille II). This work was supported by grant 2550 from the Association pour la Recherche sur le Cancer and from the Fondation pour la Recherche Médicale. Suaud L. is a fellowship of the grant 96500129 from the Région Nord-Pas de Calais and the Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille.

## REFERENCES

1. Griffio, G., Hamon-Benais, C., Angrand, P. O., Fox, M., West, L., Lecoq, O., Povey, S., Cassio, D., and Weiss, M. C. (1993) *J. Cell Biol.* **121**, 887-898.
2. Cereghini, S. (1996) *FASEB J.* **10**, 267-282.
3. Sladek, F. M., Zhong, W., Lai, E., and Darnell, J. E., Jr. (1990) *Gene and Develop.* **4**, 2353-2365.
4. Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R. M. (1995) *Cell* **83**, 835-839.
5. Holewa, B., Pogge, V., Strandmann, E., Zapp, D., Lorenz, P., and Ryffel, G. U. (1996) *Mech. Dev.* **54**, 45-57.
6. Duncan, S. A., Nagy, A., and Chan, W. (1997) *Development* **124**, 279-287.
7. Sladek, F. M. (1994) Liver Gene Expression, p. 207, Landes R.G. Co, Austin, Texas.
8. Jiang, G., Nepomuceno, L., Hopkins, K., and Sladek, F. M. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5131-5143.
9. Jiang, G. and Sladek, F. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1218-1225.
10. Ktistaki, E., Ktistakis, N. T., Papadogeorgaki, E., and Talianidis, I. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9876-9880.
11. Chartier, F. C., Bossu, J. P., Laudet, V., Fruchart, J. C., and Laine, B. (1994) *Gene* **147**, 269-272.
12. Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., and Ryffel, G. U. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 925-931.
13. Kritis, A. A., Argyrokastritis, A., Moschonas, N. K., Power, S., Katrakili, N., Zannis, V. I., Cereghini, S., and Talianidis, I. (1996) *Gene* **173**, 275-280.
14. Bach, I., and Yaniv, M. (1993) *EMBO J.* **12**, 4229-4242.
15. Ringeisen, F., Rey-Campos, J., and Yaniv, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25706-25711.
16. Cereghini, S., Yaniv, M., and Cortese, R. (1990) *EMBO J.* **9**, 2257-2263.
17. Ninomiya, T., Hayashi, Y., Saijoh, K., Ohta, K., Yoon, S., Nakabayashi, H., Tamaoki, T., Kasuga, M., and Itoh, H. (1996) *J. Hepatology* **25**, 445-453.
18. Sel, S., Ebert, T., Ryffel, G. U., and Drewes, T. (1996) *Cancer Lett.* **101**, 205-210.
19. Serfas, M. S., and Tyner, A. L. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**, 506-513.
20. Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., and Zweibaum, A. (1990) *Cancer Res.* **50**, 6334-6343.
21. Lesuffleur, T., Kornowski, A., Augeron, C., Dussaulx, E., Barbat, A., Laboisie, C., and Zweibaum, A. (1991) *Int. J. Cancer* **49**, 731-737.
22. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
23. Joseph, B., Lefebvre, O., Méreau-Richard, C., Danzé, P.-M., Belin-Plancot, M.-T., and Formstecher, P. (1997) *Blood* [in revision]
24. Rich, B. E., and Steitz, J. A. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4065-4074.
25. Laborda, J. (1991) *Nucl. Acids Res.* **19**, 3998.
26. Miquerol, L., Lopez, S., Cartier, N., Tulliez, M., Raymondjean, M., and Kahn, A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 8944-8951.
27. Byers, M., Kuiper, G. J. M., Gustafsson, J.-A., and Park-Sarge, O.-K. (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**, 172-182.
28. Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E., and Louvard, D. (1991) Intestinal Absorption and Secretion: The gastrointestinal System IV, p. 223, Amer. Physiol. Soc., Bethesda, MD.
29. Späth, G. F., and Weiss, M. C. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1913-1922.
30. Zhong, W., Sladek, F. M., and Darnell, J. E. J. (1993) *EMBO J.* **12**, 537-544.
31. Hata, S., Tsukamoto, T., and Osumi, T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 211-213.
32. Ginsburg, G. S., Ozer, J., and Karathanasis, S. K. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 528-538.
33. Ochoa, A., Bovard-Houppermans, S., and Zakin, M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1210**, 41-47.
34. Rottman, J. N., and Gordon, J. I. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 11994-12002.
35. Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M., and Cereghini, S. (1991) *EMBO J.* **10**, 1445-1457.
36. Bach, I., Galcheva-Gargova, Z., Mattei, M.-G., Simon-Chazottes, D., Guénet, J.-L., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1990) *Genomics* **8**, 155-164.

### 3. Discussion :

Depuis la parution de cette étude, d'autres isoformes de HNF-4 $\alpha$  ont été découvertes (Furuta *et al.* 1997). De plus la classification de ces isoformes a changé, en particulier l'isoforme que nous appelions  $\alpha$ 4 correspond maintenant à  $\alpha$ 5. Au vue de ces nouvelles données, il est nécessaire de réactualiser notre étude.

Le tableau VI résume, selon les oligonucléotides utilisés, l'expression des isoformes suivant l'ancienne (article) et la nouvelle nomenclature.

Oligonucléotides	Isoformes amplifiées	
	Selon l'article	Selon les nouvelles données
E1/E2	HNF-4 $\alpha$ et $\gamma$	HNF-4 $\alpha$ et $\gamma$
P1/P2	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2, $\alpha$ 4 <sup>a</sup>	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2, $\alpha$ 4, $\alpha$ 5 <sup>b</sup>
P4/P5	$\alpha$ 2, $\alpha$ 4	$\alpha$ 2, $\alpha$ 5
P6/P7	$\alpha$ 3	$\alpha$ 3, $\alpha$ 6
P9/P10	$\alpha$ 4	$\alpha$ 4, $\alpha$ 5, $\alpha$ 6
P12/P13	$\gamma$	$\gamma$

Tableau VI : Amplification des isoformes suivant les changements de la nomenclature, et la découverte de nouvelles isoformes de HNF-4 $\alpha$ .

a, b : L'amplification par ce couple d'oligonucléotides permet l'obtention de deux bandes de 260pb et 290pb.

a : dans l'article, la bande à 260pb correspond à  $\alpha$ 1, et celle à 290pb à  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 4.

b : suivant les nouvelles données, la bande à 260pb correspond à  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 4 et celle à 290pb correspond à  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 5.

Les résultats réactualisés pour les cellules Caco-2, sont résumés, dans la figure 16. Au cours de la différenciation cellulaire :

⇒ L'expression de l'ensemble des isoformes de HNF-4 $\alpha$  et  $\gamma$  augmente.

⇒ L'expression des isoformes  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 6 est faible et constante .

⇒ L'expression de  $\alpha$ 2+ $\alpha$ 5 augmente fortement.

⇒ L'expression de  $\alpha$ 4+ $\alpha$ 5+ $\alpha$ 6 augmente jusqu'au jour 15. Sachant que celle de  $\alpha$ 4 et  $\alpha$ 6 est faible et constante au cours de la différenciation, l'augmentation de l'expression

de  $\alpha 4 + \alpha 5 + \alpha 6$  reflète une augmentation de  $\alpha 5$ . La visualisation de la bande correspondant essentiellement à  $\alpha 5$  nécessite d'effectuer cinq cycles de PCR de plus que pour visualiser celle correspondant à  $\alpha 2 + \alpha 5$ . Donc l'expression de  $\alpha 2$  est beaucoup plus forte que celle de  $\alpha 5$ .

⇒ L'augmentation de l'expression de HNF-4  $\gamma$  est intermédiaire entre celle de  $\alpha 2$  et celle de  $\alpha 5$ .

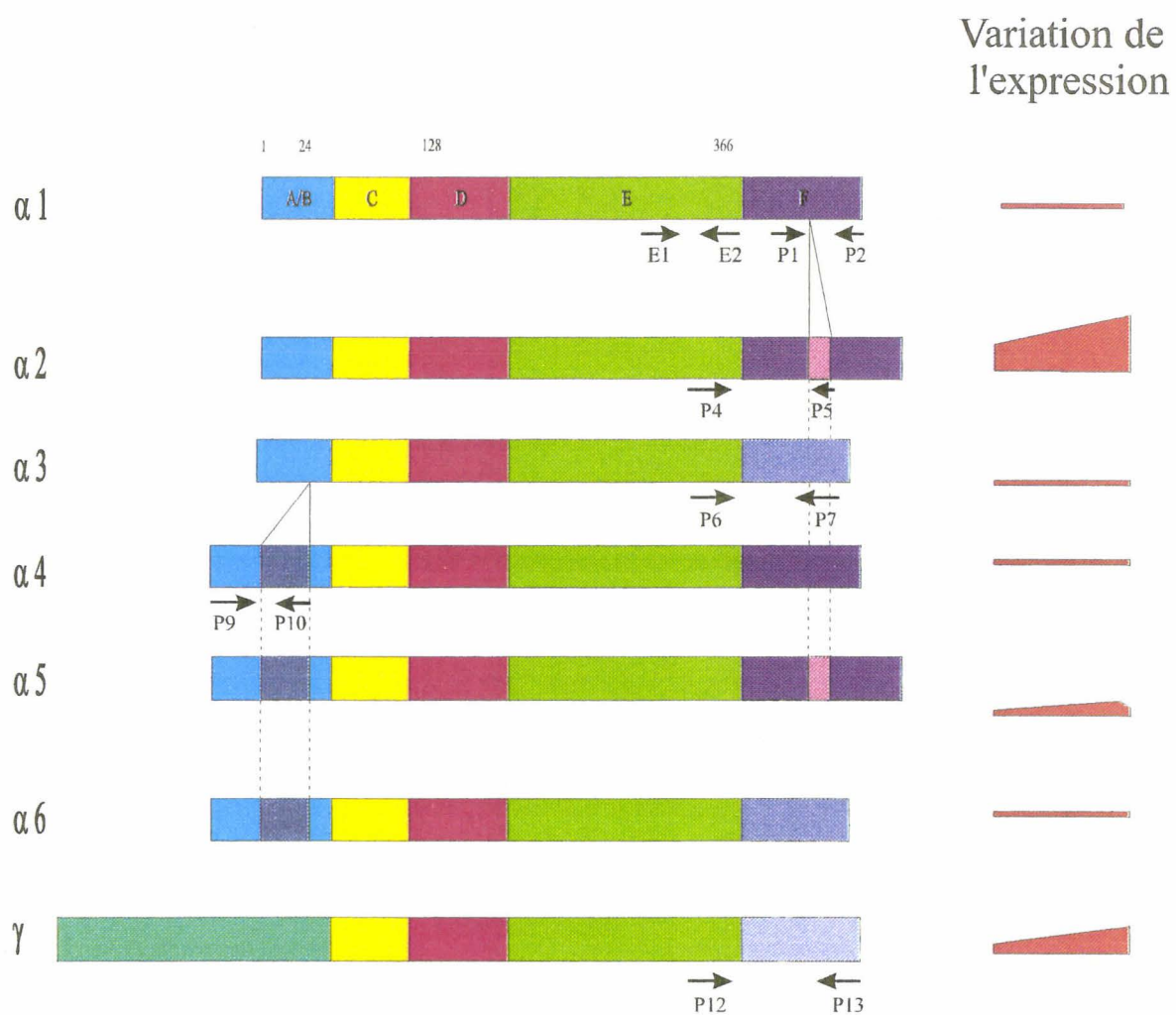


Figure 16. Variation de l'expression de HNF-4 $\alpha$  et  $\gamma$  au cours de la différenciation des cellules Caco-2. La position des oligonucléotides utilisés est indiquée.

Dans les cellules Caco-2, l'isoforme majoritaire est HNF-4  $\alpha 2$ . La différenciation de ces cellules s'accompagne d'une augmentation forte de l'expression de HNF-4  $\alpha 2$ , mais aussi à moindre degré, de HNF-4  $\alpha 5$  et  $\gamma$ .

Dans les cellules HT-29 G, l'expression de HNF-4  $\alpha 5$  varie. Notons que dans ces cellules qui acquièrent un phénotype entérocytaire moins bien caractérisé que celui des cellules Caco-2, l'expression de HNF-4  $\alpha 2$  et  $\gamma$  ne varie pas. Ce résultat suggère que ce sont les isoformes  $\alpha 2$  et  $\gamma$  qui joueraient un rôle essentiel dans l'acquisition du phénotype entérocytaire. Pour le vérifier, il sera intéressant d'obtenir des transfectants stables de cellules Caco-2 contenant un plasmide produisant des ARN antisens de chacune de ces isoformes. Les transfectants stables ne devraient plus se différencier en cellules entérocytaires.

Nous avons donc mis en évidence que la différenciation entérocytaire des cellules Caco-2 s'accompagne d'une augmentation d'expression d'un nombre limité d'isoformes de HNF-4 : principalement l'isoforme  $\alpha 2$  et à moindre degré  $\alpha 5$  et  $\gamma$ . Il faut noter qu'il existe, dans le foie de rat et les cellules hépatiques humaines HepG2, une prépondérance de l'isoforme  $\alpha 2$  sur celle de  $\alpha 1$  et  $\alpha 4$  (Hata *et al.* 1995; Chartier *et al.* 1994). Par contre cette prépondérance ne semble pas exister dans les cellules pancréatiques (Miquerol *et al.* 1994). Une autre étude montre chez la souris que l'isoforme HNF-4  $\alpha 7$  est exprimée majoritairement dans les cellules embryonnaires (Nakhei *et al.* 1998). Chez l'adulte, HNF-4  $\alpha 7$  est abondante dans l'estomac. Il en est de même pour RAR $\beta$  (Zelent *et al.* 1991). Il existe trois isoformes de RAR $\beta$ , RAR $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$ . RAR $\beta 2$  est fortement exprimé dans les cellules embryonnaires. Il doit donc avoir un rôle important dans les stades précoces du développement. Par contre, RAR $\beta 1$  et  $\beta 3$  sont majoritairement exprimés dans le fœtus et dans le cerveau de la souris adulte. Les auteurs suggèrent que ces isoformes sont impliquées dans le développement du système nerveux central.

La différenciation cellulaire est en fait le résultat de l'expression de gènes spécifiques d'une cellule à un moment donné. HNF-4 transactive spécifiquement, dans un nombre limité de types cellulaires, un nombre élevé de gènes impliqués dans de nombreux métabolismes. Nous pouvons donc imaginer, que l'activation de gènes spécifiques, permettant à une cellule d'acquérir un phénotype différencié, est assurée par les isoformes de HNF-4 dont l'expression augmente au cours de la différenciation. Cela nous a conduit à comparer les "capacités" transcriptionnelles des différentes isoformes de HNF-4.

## **II. Modulation de l'activité de l'AF-2 via le domaine F :**

Les régions les plus variables dans les isoformes de HNF-4, sont les domaines A/B et F. Notre étude porte sur le domaine F. Nous avons recherché le rôle de ce domaine dans l'activité transcriptionnelle de ce facteur.

### **1. Stratégie :**

Pour cette étude nous avons utilisé deux approches.

La première a pour objectif d'étudier le rôle du domaine F sur le récepteur entier. Nous avons utilisé plusieurs constructions qui possèdent les mêmes domaines A à E, mais des domaines F différents, c'est à dire provenant des différentes isoformes.

La deuxième approche consiste à déterminer le rôle du domaine F sur la fonction de transactivation de l'AF-2. Pour cela nous avons utilisé différentes constructions qui comportent le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (protéine de levure) associé avec la région AF-2 de HNF-4 et des domaines F de différentes origines.

Cette dernière approche nous a permis de mettre en évidence un effet répresseur du domaine F sur l'activité de l'AF-2. Cela nous a conduit, d'une part à contrôler l'effet répresseur sur le "core récepteur" comprenant les domaines A à E. Pour cela nous avons comparé les activités transcriptionnelles de HNF-4  $\alpha 2$  humain avec HNF-4  $\Delta F$  (c'est à dire délété du domaine F). D'autre part, nous avons cherché à déterminer si cet effet répresseur est dû à un encombrement stérique du motif AF-2 AD par le domaine F. Pour cela, nous avons remplacé le domaine F par un peptide de 12 résidus d'acides aminés (construction HNF-4 Fu).

### **2. Résultats :**

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article suivant :

The activity of the activation function 2 of the human nuclear receptor HNF-4 $\alpha$  is differently modulated by F domains from various origins.

Suaud Laurence, Formstecher Pierre et Laine Bernard

**The activity of the Activation Function 2 of the human Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF-4 $\alpha$ ) is differently modulated by F domains from various origins.**

SUAUD Laurence, FORMSTECHEP Pierre and LAINE Bernard <sup>§</sup>

Unité 459 INSERM, Laboratoire de Biologie Cellulaire,

Faculté de Médecine H. Warembourg, LILLE, France

<sup>§</sup> corresponding author :

B. Laine

U 459 INSERM, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université H. Warembourg

1 Place de Verdun, F 59045 LILLE France

Fax : 03 20 62 68 84

E-mail : [blaine@lille.inserm.fr](mailto:blaine@lille.inserm.fr)

short title : Modulating effects of HNF-4 F domains.

**Abbreviations**

aa, amino acid ; AF-2, activation function 2 ; AF-2 AD, activation function 2 activation domain ;

EMSA, electrophoretic mobility shift assay ; HNF-, Hepatocyte Nuclear Factor.

## ABSTRACT

The Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF-4) is a member of the nuclear hormone receptor superfamily which plays an important role in the regulation of several genes involved in numerous metabolic pathways. HNF-4 contains a DNA-binding domain located in domain C and two activation function domains designated AF-1 and AF-2 located in domains A/B and E, respectively. The seven isoforms of human HNF-4 termed  $\alpha 1$  to  $\alpha 6$  and  $\gamma$  differ mainly by their A/B and F domains. The high sequence variability of the F domain led us to investigate whether this domain modulates the transcriptional activity of HNF-4. Using constructs having the same core-receptor and different F domains, we observed that the F domains of HNF-4 modulate the transactivating activity of the full-length HNF-4. A more precise analysis using HNF-4 $\alpha$  activation function AF-2 fused to GAL4 protein and various F domains demonstrated that F domains of isoforms  $\alpha 3$  and  $\gamma$  exhibited inhibitory effects on the activation function AF-2 but the extents of their inhibition behaviours were weaker than that of HNF-4 $\alpha 2$  F domain which has been previously reported. The presence of domain F results in a decreased interaction with the coactivator GRIP1. For a given F domain, the modulating effects on the full-length HNF-4 as well as on the AF-2 depended on the target promoters. Our results suggest that the presence of domain F results in conformation changes in HNF-4 AF-2 or in its spatial environment which likely modify the interaction of the AF-2 activation domain with cofactors and transcription factors bound to cis-elements of the target promoters.



## INTRODUCTION

The transcription factor HNF-4 is a member of the nuclear hormone receptor superfamily and plays an important role in the regulation of several genes involved in numerous metabolic pathways [1,2]. HNF-4 gene disruption experiments in mouse embryos [3,4] as well as HNF-4 overexpression in developing *Xenopus* larvae [5] have documented its crucial role in embryogenesis. The perfect correlation between HNF-4 expression and differentiation of hepatic and enterocytic-like cells indicates the role of HNF-4 in cell differentiation [6,7]. Like other nuclear hormone receptors, HNF-4 has a modular structure consisting of six distinct domains with defined functions and called A to F from the N-terminal to the C-terminal ends. Seven isoforms of human HNF-4 have been described up to now. By comparison with isoform  $\alpha 1$ , isoforms  $\alpha 2$  and  $\alpha 5$  (using the nomenclature as given by Furuta *et al* [8]) exhibit an insertion of ten amino acids (aa) in the F domain and isoform  $\alpha 5$  displays an additional insertion of thirty amino acids in the domain A/B [8-10]. This latter insertion is also encountered in isoforms  $\alpha 4$  and  $\alpha 6$  [8]. Isoform  $\alpha 3$  has a completely different F domain [11]. These  $\alpha$  isoforms are products of the same gene and arise from alternative splicing of the HNF-4 $\alpha$  mRNA, whereas HNF-4 $\gamma$  is the product of another gene and exhibits numerous sequence differences in the A/B and F domains [10].

HNF-4 behaves as a homodimer which binds to a direct repeat 1 response element [12] and with a weaker affinity to a direct repeat 2 response element [13]. Phosphorylation affects DNA-binding and transactivation potential of HNF-4 $\alpha 1$  [14,15].

Nuclear hormone receptors have two transactivation function regions, the first one, denoted AF-1, is ligand-independent and located in the domain A/B whereas the second one, denoted AF-2, is ligand-dependent and located in the domain E. The transactivation function AF-2 comprises a highly conserved module  $\phi\phi XE\phi\phi$  ( $\phi$  corresponding to hydrophobic residues and

X to a non-conserved amino acid) denoted AF-2 AD which displays an amphipatic  $\alpha$  helix structure [16]. The AF-2 AD module is likely to interact with proteins that are distinct from basal transcription factors and are thought to act as transcriptional coactivators or corepressors (for a review see [17]). The AF-2 AD of HNF-4 $\alpha$  is essential for the transcriptional activity of AF-2 which appears to be a complex domain requiring the presence of the sequence 128-366 (spanning domains D and E) for full activity [18]. The AF-2 of HNF-4 is involved in direct protein-protein interactions with other transcription factors such as COUP TF-I and HNF-1 [19,20] and with the coactivator CBP [21]. The functional role of the F domain of nuclear receptors remains unclear, nevertheless a role for this domain has been documented in several reports. First, the F domain of estrogen receptor exhibits an important role in modulating the magnitude of gene transactivation by estrogens and antiestrogens, and in determining the effectiveness of antiestrogens in suppressing estrogen-stimulated transactivation of genes [22]. Second, two RAR mutants, differing only by the presence or absence of the F domain, exhibit a significant difference in transactivation potential [23]. According to Hadzopoulou-Cladaras *et al* [18], the F domains of rat HNF-4 $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 exhibit an inhibitory effect on HNF-4 $\alpha$  transcriptional activity. We have recently shown that a mutation resulting in the Val393Ile substitution, which is located in the F domain of human HNF-4 $\alpha$  and cosegregates with the MODY 1 form of diabetes, impairs the transactivation activity of the protein [24]. The F domain of HNF-4 is the most variable domain among isoforms within a same species such as human or among different species. The proximity of F domain to the AF-2 AD module prompted us to investigate how its high sequence variability modulates the transcriptional activities of full-length HNF-4 and of its activation function AF-2.

## EXPERIMENTAL

### Plasmid constructions :

*1 HNF-4 isoforms and chimeras.* Human HNF-4 $\alpha$ 2 cDNA [9] and rat HNF-4 $\alpha$ 1 cDNA [1] were cloned in the *Eco*RI site of pSG5. In all constructs, positions are given taking the adenine of initiator methionine at position 1. In the course of screening a human liver cDNA library [9], 5' truncated cDNA of HNF-4 $\alpha$ 3 was isolated and used to clone the full-length human HNF-4 $\alpha$ 3 in pSG5 with the following strategy: the fragment *Msc*I (position1082)-*Bam* HI (polylinker of the pSG5) in the pSG5 HNF-4 $\alpha$ 2 construct, was replaced by the corresponding fragment from HNF-4 $\alpha$ 3. This fragment, spanning sequence 1047-1357 of isoform  $\alpha$ 3, was prepared by PCR using the primer couple 1/2 (Table I). The chimera Ch-hu F $\gamma$ , consisting of the domain F of human HNF-4 $\gamma$  fused in frame to domains A through E of human HNF-4 $\alpha$ 2, and the chimera Ch-rat F $\alpha$ 1, consisting of the domain F from rat HNF-4 $\alpha$ 1 fused in frame to domains A through E of human HNF-4 $\alpha$ 2, were generated using a similar strategy. Fragments 2043-2349 of hu HNF-4 $\gamma$  [10] and 1082-1400 from rat HNF-4 $\alpha$ 1 [1] were synthesised with primer couples 3/4 and 1/5, respectively. The human HNF-4 $\alpha$ 2 cDNA was also cloned in the *Eco*RI site of the pcDNA3 vector (Invitrogen). To generate the pDNA HNF-4  $\Delta$ F (amino acids 1-369), the fragment -25/+1126, prepared by PCR using the HNF-4 $\alpha$ 2 cloned in pUC 19 as matrice and oligonucleotides 16 and 13, was inserted in the *Eco*RI / *Xba*I sites of the pcDNA3 vector. The pcDNA HNF-4 Fu was prepared in a similar way using the antisense primer 17 where the stop codon has been omitted in order to use a stop codon TAG present in the pcDNA vector, then introducing the peptide Ser-Arg-Gly-Pro-Tyr-Ser-Ile-Val-Ser-Pro-Lys-Cys-OH in frame with the sequence 1-369 of HNF-4 $\alpha$ .

*2 Reporter constructs.* The human apolipoprotein CIII (apoCIII) promoter (-1400/ +21) previously cloned in the pBLCAT5 plasmid [24] was prepared by PCR using the primer couple 6/7 (Table I). The *Kpn*I-*Hind*III fragment was inserted in the *Kpn*I and *Hind*III restriction sites of the pGL3 luciferase reporter vector (Promega). The mouse HNF-1 promoter (-281/+14) was

prepared by PCR using the primer couple 8/9 with the mouse HNF-1 promoter (*Pst*I -1300/*Nhe*I +157) as DNA template and cloned in the *Kpn*I and *Hind*III restriction sites of the pGL3 vector. Double-stranded kinased oligonucleotides encompassing the HNF-4 response elements from human apoAII gene (site J, denoted AIIJ, nucleotides -735 to -716), and from human apoCIII gene (site B, denoted CIIIB, nucleotides -96 to -61) and ending with *Bam*HI and *Bgl*II sites were cloned as multi-copies in the same orientation into the pIC 20H vector. To generate the plasmids (AIIJ)<sub>x4</sub>-TATA and (CIIIB)<sub>x2</sub>-TATA, the *Sac*I/*Xba*I fragment containing either four copies of AIIJ site or two copies of CIIIB site, respectively, were subcloned in the *Sac*I and *Nhe*I restriction sites of the TATA box Luc vector [25]. Alternatively, a *Hind*III/*Hind*III fragment of the pIC 20H vector containing three copies of AIIJ site was inserted in the *Hind*III restriction site of pBLCAT4 reporter vector containing the minimal thymidine kinase (TK) promoter (-105/+51), to generate the (AIIJ)<sub>x3</sub>-TK vector.

**3 GAL4-HNF-4 chimeras.** GAL4 hu HNF-4 $\alpha$  AF-2 AD (A355-S369) was generated by inserting a double-stranded kinased oligonucleotide (oligonucleotides 10 and 11) encompassing the sequence 1082-1126 of hu HNF-4 $\alpha$  cDNA into the *Bam*HI and *Xba*I sites of the pGAP vector [26], expressing the DNA binding domain (aa 1 through 147) of the yeast GAL4 protein. The fragments encompassing the HNF-4 $\alpha$  AF-2 AD flanked with the F domains of either HNF-4 $\alpha$ 2 (residues 355-465), HNF-4 $\alpha$ 3 (residues 355-408) or HNF-4 $\gamma$  (residues 681-774) were prepared by PCR with the primer couples 10/5, 10/15 and 10/4, respectively. These fragments were cloned into the *Bam*HI and *Xba*I sites of the pGAP vector to generate the plasmids GAL4 AF-2 AD F $\alpha$ 2, GAL4 AF-2 AD F $\alpha$ 3 and GAL4 AF-2 AD F $\gamma$ , respectively. Fragments encompassing the hu HNF-4 $\alpha$  AF2 alone (residues 128-369) or flanked with F domains of either HNF-4 $\alpha$ 2 (residues 128-465), HNF-4 $\alpha$ 3 (residues 128-408) or HNF-4 $\gamma$  (residues 128-369 from HNF-4 $\alpha$ 2 linked to residues 696-774 from HNF-4 $\gamma$ ) were prepared by PCR with the primer couples 12/13,

12/5, 12/15 and 12/4, respectively. PCR to prepare this latter fragment was performed using the chimera Ch-hu F $\gamma$  as DNA template. These fragments were cloned into the *Bam*HI and *Xba*I sites of the pGAP vector to generate the plasmids GAL4 AF-2, GAL4 AF-2 F $\alpha$ 2, GAL4 AF-2 F $\alpha$ 3 and GAL4 AF-2 F $\gamma$ , respectively. The two luciferase reporter constructs (GAL) $\times$ 5 TATA LUC [27] and UAS $\times$ 2 LUC [28] contain 5 and 2 copies of the GAL4 binding element upstream of the TATA box and the thymidine kinase promoter, respectively. All PCR fragments used in these constructs were generated with the *Pfu* DNA polymerase (Stratagene) and all constructs were verified by DNA sequencing analysis.

Cell culture and transient transfection assays. COS-1 and HepG2 cells (  $2 \times 10^5$  cells per 35 mm dishes) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and containing 4.5 g/l glucose. Cells were transfected by the polyethyleneimine method (Euromedex, France) using 500 ng of reporter plasmid and 250 ng of HNF-4 expression vector according to the manufacturer's recommendations. To normalise for differences in transfection efficiencies a CMV-driven  $\beta$  GAL expression plasmid was transfected simultaneously. Luciferase assays were performed as indicated in [25].

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs). Nuclear extracts were prepared from transfected COS-1 cells ( $3 \times 10^6$  cells per 100 mm dishes, 10  $\mu$ g of appropriate expression plasmid). Nuclei and nuclear extracts were prepared as indicated in [29]. Protein concentrations were determined by the Bradford assay (Bio Rad) according to the manufacturer's recommendations. DNA-protein complexes formed with the indicated labelled oligonucleotides were studied by EMSA performed in 1x TEA buffer [29]. The specificity of the retarded bands was ascertained by competition with the corresponding unlabelled oligonucleotides.

In vitro protein-protein interaction assays. Growth and expression, in the bacterial strain JM 109, of glutathione S-transferase-GRIP1 was performed using the pGEX 2TK GRIP1 vector coding

for the sequence 730-1121 [30]. Pull-down assays were performed as described [30] using the immobilised GST-GRIP1 and <sup>35</sup>S labelled HNF-4 $\alpha$ 2 or its deletion mutants HNF-4 $\Delta$ F and HNF-4 Fu, which were synthesised *in vitro* with the TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega).

Secondary structure predictions. The secondary structures of F domains of HNF-4 isoforms were predicted using the Antheprot computer software developed by Deléage *et al* [31]. This software utilises the algorithms of Chou Fasman, Garnier *et al*, Levin *et al*, Deléage *et al* and Gibrat *et al* of which the references are indicated in [31]. Only structures predicted by at least three of these algorithms were considered in the joint prediction of secondary structures presented in Fig. 5.

## RESULTS

Domain F modulates the transactivating activity of HNF-4 $\alpha$ . To test how the high variability of primary structure of F domain can affect the transactivating potential of HNF-4, we have prepared four constructs containing the A through E domains of human HNF-4 $\alpha$ 2 and differing in the F domains (Fig. 1A). Two constructs correspond to human HNF-4 isoforms  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3. When compared to HNF-4 $\alpha$ 2, the F domain of HNF-4 $\alpha$ 3 strongly differs in size (40 versus 98 amino acids) and in sequence with only three common residues [11]. The two other constructs are chimeras consisting of domains A through E of HNF-4 $\alpha$ 2 linked to the domain F from either rat HNF-4 $\alpha$ 1 (denoted Ch-rat F $\alpha$ 1) or human HNF-4 $\gamma$  (denoted Ch-hu F $\gamma$ ). These F domains show significant sequence differences when compared to that of human HNF-4 $\alpha$ 2: in rat HNF-4 $\alpha$ 1 five conservative substitutions and four non conservative substitutions occur in addition to a deletion of 10 amino acids [32]. The F domain of human HNF-4 $\gamma$  exhibits 15 conservative substitutions, 31 non-conservative substitutions and 17 deletions [10]. By using these constructs, it is possible to determine the influence of various F domains on the transactivating activity of the core receptor.

Transactivation efficiencies of these HNF-4 isoforms and chimeras are shown in Fig. 1B. On the apoCIII promoter, the various isoforms and chimeras exhibited similar transactivation potential except the chimera Ch-hu F $\gamma$  which appeared to be slightly more efficient. When compared to isoform  $\alpha$ 2, stronger transactivation potentials of the chimera Ch-hu F $\gamma$  were also observed on (CIIIB)x2-TATA and (AIIJ)x3-TK promoters. Compared to HNF-4 $\alpha$ 2, HNF-4 $\alpha$ 3 exhibited marked differences which varied from one promoter to the other one : transactivating activities of HNF-4 $\alpha$ 3 were markedly weaker (about 50%) on HNF-1, (CIIIB)x2-TATA and (AIIJ)x4-TATA promoters but were similar on the apoCIII promoter and twice stronger on the (AIIJ)x3-TK promoter. The fact that these changes for a given isoform or chimera depended on the promoters suggests that differences in transactivating activities from one isoform or chimera to the other one were not due to differences in their expression. To verify this assumption, we could not use Western blotting assays due to the lack of proper antisera : the HNF-4 $\alpha$ 455 antisera has been raised against the very C terminal peptide of rat HNF-4 $\alpha$ 1 [1] and cannot recognize F domains of isoforms  $\alpha$ 3 and  $\gamma$ . So, expression of HNF-4 isoforms and chimeras was checked, as already performed [33], by EMSA assays, taking advantage of the fact that DNA-binding activity of HNF-4 is not affected by F domain. Indeed, DNA-binding activities of full-length HNF-4 and of HNF-4 mutants lacking part or all of the F domain have been reported to be identical [18]. Results presented in Fig. 1C did not show significant differences in intensities of the retarded bands, indicating that differences in transactivation cannot be explained by differences in protein amounts. Therefore, our results clearly indicated that the F domain of HNF-4 differently modulates the transactivating activity of this nuclear receptor and that this modulation depends on the origin of the F domains and of target promoters.

Domain F modulates the activity of the activation function AF-2 of HNF-4 $\alpha$ . Given the proximity of the F domain to the activation function AF-2, we further wanted to test whether the

influence of the F domain on the transactivation activity of HNF-4 core-receptor could result from a direct modulation of the activity of the AF-2. In fact, HNF-4 exhibits a close amino-acid sequence similarity with RXR $\alpha$ , another nuclear receptor [34]. The activation function AF-2 of RXR $\alpha$  includes an AF-2 AD module displaying an autonomous transcriptional activity [16]. The structural similarities between HNF-4 and RXR $\alpha$  prompted us to test the effects of HNF-4 F domains on both proximal AF-2 AD module and full-length AF-2. Therefore the AF-2 AD (residues A355-S369) or the full-length AF-2 (residues I128-S369) of HNF-4 $\alpha$ 2, linked or not to various HNF-4 F domains, were fused to the yeast GAL4 DNA-binding domain. The study was focused on the F domains of HNF-4 isoforms  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 and  $\gamma$  (Fig. 2A) which displayed the largest differences in transactivation when tested in the full-length HNF-4 context (Fig.1). These GAL4-HNF-4 chimeras bind to GAL4 response elements placed upstream of the TATA box or TK promoter, eliminating potential complications arising from altered dimerization and DNA binding activities of HNF-4-derived molecules in which some sequences have been deleted. On the GAL4-TATA box, no transactivation activity was detected with the GAL4-AF-2 AD module with or without F domains (Fig. 2B). Using a longer fragment (W340-S369), corresponding to that used in the study of the thyroid hormone receptor AF-2 AD [35], neither gave any transactivating activity (data not shown), a result consistent with that of Hadzopoulou-Cladaras *et al* [18]. These results indicate that, whatever its length, HNF-4 AF-2 AD module does not exhibit autonomous transactivation activity, a feature shared with that of the estrogen receptor [36], whereas the AF-2 AD of the thyroid hormone receptor and of the retinoic acid receptors RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  are able to transactivate autonomously [16,35]. On the GAL4-TATA box, no significant difference in transactivating activities was observed between GAL4 AF-2 F $\alpha$ 3 and GAL4 AF-2 F $\gamma$ , whereas GAL4 AF-2 F $\alpha$ 2 exhibited a weaker activity (Fig. 2B). On the GAL4-TK promoter, the three constructs with F domains from isoforms  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 and  $\gamma$  exhibited



significant differences in activities (Fig. 2B). Therefore, our results indicate that the HNF-4 AF-2 activity is differently modulated by F domains from various origins. In addition, similarly to the effects of F domains on the transactivating activities of the HNF-4 core-receptor (domains A through E), the effects of F domains on the AF-2 depended on the target promoters. Indeed, compared to GAL4 AF-2 F $\alpha$ 3, GAL4 AF-2 F $\gamma$  exhibited a similar activity on the GAL4-TATA box but a stronger activity on the GAL4-TK promoter. EMSA performed with the GAL-4 binding sequence as DNA probe (Fig. 2C) showed that the weaker transactivation activities of GAL4 AF-2 F $\alpha$ 2 on the two promoters are not due to a lower expression of the protein, in addition, we repeatedly obtained a very faint band with the GAL4 AF-2 F $\alpha$ 3, which is probably due to an instability of the protein in the nuclear extracts but not in the intact cells since its activity was at least equal to that of the GAL4 AF-2 F $\gamma$  on the TATA box .

Comparison of transactivating activities of GAL4 AF-2 fused to the various F domains with those of GAL4 AF-2 without F domain (Fig. 2B) showed that the three F domains studied exhibited inhibitory effects on AF-2 activity. The strongest inhibitory effect was observed with HNF-4 $\alpha$ 2 F domain. Different results were reported concerning the inhibitory effect of HNF-4 $\alpha$ 2 F domain in the context of full-length HNF-4 : upon removal of F domain, Hadzopoulou-Cladaras and co-workers observed a 8-fold increase in HNF-4 activity whereas Kristis and co-workers did not observe any change in activity [11,18]. In addition, Hadzopoulou-Cladaras and co-workers have suggested that HNF-4 $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 F domains may mask critical residues of the AF-2 for interaction with a cofactor [18]. This led us to compare the activities of human HNF-4 $\alpha$ 2 with those of two mutants where F domain has been either deleted (construct denoted HNF-4  $\Delta$ F in Fig. 3A) or replaced by a short peptide with the unrelated sequence Ser-Arg-Gly-Pro-Tyr-Ser-Ile-Val-Ser-Pro-Lys-Cys-OH (construct denoted HNF-4 Fu in Fig. 3A). Replacement of HNF-4 $\alpha$ 2 F domain, which is 98 aa-long, by a 12 aa-long peptide should give insight into this

assumption. In order to compare our results with those of Hadzopoulou-Cladaras *et al*, these constructs were prepared in the pDNA3 vector, a parent vector to that used by these authors. On the HNF-4 responsive elements linked to the TATA box [(CIIIB)2x TATA box and (AIIJ)4x TATA box], HNF-4 $\alpha$ 2 and HNF-4  $\Delta$ F exhibited similar activities in COS 1 and HepG2 cells (Fig. 3B and C, respectively). HNF-4  $\Delta$ F activities were slightly stronger than those of HNF-4 $\alpha$ 2 on apoCIII and HNF-1 promoters (157% and 180%, respectively) in COS 1 cells (Fig. 3B) and lower differences of activities between these two constructs were observed in HepG2 cells (Fig. 3C). So, our results showing moderate inhibitory effects of HNF-4 $\alpha$ 2 F domain in the context of HNF-4 core-promotor are closer to those of Kristis *et al* [11] than to those of Hadzopoulou-Cladaras *et al* [18]. These discrepancies with the results of these latter authors are not due to cell models since on apoCIII promoter, the transactivating activities of HNF-4 $\alpha$ 2 and HNF-4  $\Delta$ F were identical in C33 cells (data not shown). Unexpectedly, when compared to HNF-4  $\Delta$ F, HNF-4 Fu exhibited transactivating activities markedly weaker on all the tested promoters except on the (CIIIB)2x TATA box in HepG2 cells (Fig 3C). When compared to HNF-4 $\alpha$ 2, HNF-4 Fu exhibited weaker transactivating activities except on HNF-1 and apoCIII promoters in COS-1 cells and (CIIIB)2x TATA box in HepG2 cells. These differences in transactivating activities were not due to differences in protein expression as shown in Fig. 3D.

The involvement of the AF-2 AD activation domain of several hormone nuclear receptors in protein-protein interactions with coactivators led us to check whether HNF-4 $\alpha$ 2 F domain and the peptide Fu impair the interaction of HNF-4 with the coactivator GRIP1. With this aim, pull-down experiments were performed with the immobilised GST-GRIP1 and labelled HNF-4 $\alpha$ 2 or its two deletion mutants depicted in Fig. 3A. A strong interaction was observed between GRIP1 and HNF-4  $\Delta$ F (Fig. 4). When compared to HNF-4  $\Delta$ F, HNF-4 $\alpha$ 2 gave a faint band and HNF-4 Fu gave a band of intermediate intensity (Fig. 4). Quantification of the bands and normalization

to the inputs (1/20 of proteins used in pull-down assays) indicated that the amounts of HNF-4  $\Delta$ F, HNF-4 Fu and HNF-4 $\alpha$ 2 bound to GRIP1 were 100%, 60% and 12%, respectively. These results showed that interaction of HNF-4 with GRIP1 is markedly impaired by the HNF-4 $\alpha$ 2 F domain and by the peptide Fu but that HNF-4 Fu interacts more efficiently than HNF-4 $\alpha$ 2 with GRIP1.

## DISCUSSION

The high sequence variability of the F domain of HNF-4 led us to investigate whether this domain can modulate the transcriptional activity of this nuclear receptor. We have observed that F domains of the various HNF-4 isoforms modulate the transactivating activity of the HNF-4 core-receptor (domains A through E) and exhibit inhibitory effects on the activation function AF-2. An inhibitory effect of rat HNF-4 $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 F domains has previously been reported [18,33]. Our results extend these observations by demonstrating that F domains of isoforms  $\alpha$ 3 and  $\gamma$  also repressed the activity of the activation function AF-2 to different extents. In addition, we observed that, for a given F domain, the modulating effects on the HNF-4 core-receptor as well as on the activation function AF-2 depended on the target promoters.

In the rat HNF-4 $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2, the inhibitory function has been attributed to a short repression sequence located in the C-terminus (aa 430-441) [33]. This sequence is lacking in the F domains of HNF-4  $\alpha$ 3 and  $\gamma$ , suggesting that another mechanism is involved in the repression activity of F domains of these isoforms. Similarly, the involvement of an additional mechanism in the repression activities of F domains of isoforms  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 can be inferred from the observation that the amino-terminal half of these F domain (aa 369-410) also exhibited a repression effect on HNF-4 core-receptor [18]. The AF-2 AD module located at the extreme C-terminus of AF-2 is known to play a main role in transactivating activities of nuclear receptors and to be a site of interactions with cofactors [17]. In addition, HNF-4 AF-2 has been shown to

be involved in direct protein-protein interactions with other transcription factors such as COUP-TFs and HNF-1 [19,20] or with the coactivator CBP [21]. From the observation that the HNF-4 deletion mutant (aa 1-410) having only the amino-terminal half of F domain exhibited transactivation activity intermediate between those of full-length HNF-4 (aa 1-465) and its mutant lacking the complete F domain (aa 1-370), a model involving masking of the surface close to the AF-2 has been proposed [18]. Indeed, given their proximity to the AF-2 AD module, it is tempting to speculate that a large F domain will impinge more strongly than a small one on the surface of interaction with effectors that mediate the transcriptional activity. But in fact, there is no direct relation between the length of F domains and activities of both HNF-4 core-receptor and its activation function AF-2. Constructs with HNF-4 $\alpha$ 3 F domain (40 aa-long) exhibited weaker transactivating activities than constructs with HNF-4 $\gamma$  F domain (81 aa-long) in the context of full-length HNF-4 on three out of the five tested promoters (Fig. 1) as well as in the context of GAL4 chimeras on the thymidine kinase promoter (Fig. 2). Furthermore, the peptide Fu, in construct HNF-4 Fu, exhibited a strong inhibitory effect (compare the activities of HNF-4  $\Delta$ F and HNF-4 Fu in Fig. 3). The effect of peptide Fu is not due to its short length which is identical to that of the truncated F domain spanning only the first 12 aa of HNF-4 $\alpha$ 1 F domain in the construct HNF-4 1-380 used by Iyemere *et al* since these authors showed that this latter construct and HNF-4 1-368 (lacking the complete F domain) exhibited identical transactivation activities [33]. On the other hand, peptide Fu impaired the interaction of HNF-4 core-receptor with the coactivator GRIP1. The peptide Fu contains 3 identical aa and exhibits 2 conservative substitutions when compared to the repressor motif of the C-terminal end of rat HNF-4 $\alpha$ 1 F domain [33] (Fig. 3E). These residues are placed at positions where mutations completely disrupt the repressor domain activity ([33] and Fig. 3E). In addition, among these 5 aa residues, mutation of residues at positions 920 and 923 in progesterone receptor abolished the repressive behaviour

of this motif [37], thus underlining the crucial role of these residues in this repressive function. This sequence similarity probably accounts for the very weak transcriptional activities of HNF-4 Fu. Curiously, HNF-4 Fu, which interacted more strongly with the coactivator GRIP1 when compared to HNF-4 $\alpha$ 2, exhibited weaker transactivating activities. We cannot exclude that the very strong repressive behaviour of HNF-4 Fu may also be due to a stronger interaction with a corepressor, as suggested for the repressor domain of the progesterone receptor [37].

Interestingly, the effects of F domains on transcriptional activities depended on the nature of target promoters (Fig. 1 and 2). Similar observations have been reported by Hadzopoulou-Cladaras *et al* in the context of HNF-4 core-promoter : the activity of their mutant HNF-4 1-410 was close to that of HNF-4 $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 on apoCIII promoter but was close to that of the mutant lacking the complete F domain on apoB promoter [18]. These authors also reported that the repressing activity of HNF-4 $\alpha$ 2 F domain was stronger on apoCIII than on apoB promoters (8-fold and 3-fold, respectively). It is worth pointing out that the repressive effects of F domain were more pronounced on the complex promoters (HNF-1 and apoCIII) than on promoters constituted with only HNF-4 responsive elements linked to the TATA box (Fig. 3). Similarly, compared to HNF-4 $\alpha$ 2, HNF-4 $\alpha$ 3 exhibited significant differences in transactivating activities on the HNF-4 responsive element from the apoAII gene linked to the thymidine kinase promoter or the TATA box (Fig. 1). This suggests that F domains modulate the contribution of transcription factors bound to the cis elements of the target promoters in the complex interplay of interactions between HNF-4 and other effectors. Therefore it appears that F domains may play a role in modulating protein-protein interactions between HNF-4, coactivators or corepressors and transcription factors bound to the promoter through changes in the conformation of the activation function AF-2. Synergies between HNF-4 and other transcription factors have already been documented [38,39] and support this assumption. The effects of F domains may occur through

structural constraints modifying the environment in the vicinity of critical residues of the AF-2. Such structural constraints likely result from differences in secondary structures of the F domains as predicted by five algorithms (see Materials and Methods). In isoform  $\alpha 3$  F domain, the amino-terminal half has a high potential to form three consecutive  $\beta$  turns and the carboxy-terminal half is likely in a coil structure (Fig. 5). The F domains of human and rat HNF-4 $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  have a high potential to form one short  $\alpha$  helix and two  $\beta$  sheet strands whereas the F domain of HNF-4 $\gamma$  would be significantly more structured with a high  $\alpha$  helix content in its C-terminal third and two  $\beta$  sheet strands in the median part (Fig. 5).

Our results together with other recent studies on different nuclear receptors [22,23,40] underline that F domain is not as inert for nuclear receptor function as previously thought. Furthermore, very recently, it has been shown that different isoforms of a single nuclear hormone receptor class differ markedly in their interactions with corepressors, which can account for their different activities [41]. The expression patterns of HNF-4 isoforms vary from one tissue to another one [10,11,42]. In addition, we have shown that expression of several HNF-4 isoforms also varies during cell differentiation [7]. Therefore, the different transactivation activities of HNF-4 isoforms, which mainly differ in their F domains, most probably have a physiological impact on the cell life.

Acknowledgements. S. Lasvergnas and A. Berthier are acknowledged for their technical assistance. The authors are indebted to F. Sladek, S. Cereghini, P. Lefebvre and M.R. Stallcup for providing the rat HNF-4  $\alpha 1$  cDNA, the mouse HNF-1 promoter, the TATA box-pGL3 plasmid and the pGEX 2TK GRIP1 (730-1121), respectively and to P.-A. Defossez for providing the pGAP and (GAL4) $\times 5$ -TATA box plasmids. They kindly acknowledge P. Lefebvre for critically reading the manuscript. Inserm U 459 belongs to and is supported by IFR 22 (CH et U

de LILLE, Centre Oscar Lambret, Inserm and Université de Lille II). This work was supported by grant 2550 from the Association pour la Recherche sur le Cancer and from the Fondation pour la Recherche Médicale. Suaud L. is a fellowship of the grant 96500129 from the Région Nord-Pas de Calais and the Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille.

## REFERENCES

1. Sladek, F.M., Zhong, W., Lai, E., and Darnell, J.E., Jr. (1990) *Genes Dev.* **4**, 2353-2365
2. Sladek, F.M. (1994) in *Liver gene expression* (Tronche, F. and Yaniv, M., eds.) pp. 207-230, Landes R.G. Co. Austin, Tex.
3. Chen, W.S., Manova, K., Weinstein, D.C., Duncan, S.A., Plump, A.S., Prezioso, V.R., Bachvarova, R.F., and Darnell, J.E.J. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2466-2477
4. Duncan, S.A., Nagy, A., and Chan, W. (1997) *Development* **124**, 279-287
5. Holewa, B., Pogge, V., Strandmann, E., Zapp, D., Lorenz, P., and Ryffel, G.U. (1996) *Mech. Dev.* **54**, 45-57
6. Späth, G.F. and Weiss, M.C. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1913-1922
7. Suaud, L., Joseph, B., Formstecher, P., and Laine, B. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **235**, 820-825
8. Furuta, H., Iwasaki, N., Oda, N., Hinokio, Y., Horikawa, Y., Yamagata, K., Yano, N., Sugahiro, J., Ogata, M., Ohgawara, H., Omori, Y., Iwamoto, Y., and Bell, G.I. (1997) *Diabetes* **46**, 1652-1657
9. Chartier, F.C., Bossu, J.P., Laudet, V., Fruchart, J.C., and Laine, B. (1994) *Gene* **147**, 269-272
10. Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., and Ryffel, G.U. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 925-931

11. Kritis, A.A., Argyrokastritis, A., Moschonas, N.K., Power, S., Katrakili, N., Zannis, V.I., Cereghini, S., and Talianidis, I. (1996) *Gene* **173**, 275-280
12. Jiang, G., Nepomuceno, L., Hopkins, K., and Sladek, F.M. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5131-5143
13. Fraser, J.D., Martinez, V., Straney, R., and Briggs, M.R. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 2702-2707
14. Ktistaki, E., Ktistakis, N.T., Papadogeorgaki, E., and Talianidis, I. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9876-9880
15. Viollet, B., Kahn, A., and Raymondjean, M. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4208-4219
16. Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., and Chambon, P. (1994) *EMBO J.* **13**, 5370-5382
17. Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richer, J.K., Takimoto, G.S., and Tung, L. (1996) *Mol. Endocrinol.* **10**, 1167-1177
18. Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C., and Ladias, J.A.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 539-550
19. Ktistaki, E. and Talianidis, I. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2790-2797
20. Ktistaki, E. and Talianidis, I. (1997) *Science* **277**, 109-112
21. Yoshida, E., Aratani, S., Itou, H., Miyagishi, M., Takiguchi, M., Osumu, T., Murakami, K., and Fukamizu, A. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 664-669
22. Montano, M.M., Müller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B.S. (1995) *Mol. Endocrinol.* **9**, 814-825
23. Tate, B.F., Allenby, G., Perez, J.R., Levin, A.A., and Grippo, J.F. (1996) *FASEB J.* **10**, 1524-1531



24. Hani, E.H., Suaud, L., Boutin, P., Chèvre, J.-C., Durand, E., Philippi, A., Demenais, F., Vionnet, N., Furuta, H., Velho, G., Bell, G.I., Laine, B., and Froguel, P. (1998) *J. Clin. Invest.* **101**, 521-526
25. Dao-Phan, H.P., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**, 962-972
26. Defossez, P.-A., Baert, J.-L., Monnot, M., and de Launoit, Y. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 4455-4463
27. Chang, C. and Gralla, J.D. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7469-7475
28. Collingwood, T.N., Butler, A., Tone, Y., Clifton-Bligh, R.J., Parker, M.G., and Chatterjee, V.K.K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13060-13065
29. Bossu, J.-P., Chartier, F.L., Fruchart, J.-C., Auwerx, J., Staels, B., and Laine, B. (1996) *Biochem. J.* **318**, 547-553
30. Ding, X.F., Anderson, C.M., Ma, H., Hong, H., Uht, R.M., Kushner, P.J., and Stallcup, M.R. (1998) *Mol. Endocrinol.* **12**, 302-313
31. Deléage, G., Clerc, F.F., and Roux, B. (1989) *CABIOS* **5**, 159-160
32. Hata, S., Inoue, T., Kosuga, K., Nakashima, T., Tsukamoto, T., and Osumi, T. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1260**, 55-61
33. Iyemere, V.P., Davies, N.H., and Brownlee, G.G. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 2098-2104
34. Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stéhelin, D. (1992) *EMBO J.* **11**, 1003-1013
35. Baretino, D., Vivanco Ruiz, M.M., and Stunnenberg, H.G. (1994) *EMBO J.* **13**, 3039-3049
36. Cavallès, V., Dauvois, S., Danielian, P.S., and Parker, M.G. (1994) *Proc. Natl. Sci. USA* **91**, 10009-10013
37. Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12195-12199

38. Talianidis, I., Tambakaki, A., Toursounova, J., and Zannis, V.I. (1995) *Biochemistry* **34**, 10298-10309
39. Metzger, S., Halaas, J.L., Breslow, J.L., and Sladek, F.M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16831-16838
40. Nichols, M., Rientjes, J.M.J., and Stewart, A.F. (1998) *EMBO J.* **17**, 765-773
41. Wong, C.-W. and Privalsky, M.L. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5724-5733
42. Miquerol, L., Lopez, S., Cartier, N., Tulliez, M., Raymondjean, M., and Kahn, A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 8944-8951
43. Taraviras, S., Monaghan, A.P., Schütz, G., and Kelsey, G. (1994) *Mech. Dev.* **48**, 67-79

Table I : PCR primers used for the preparation of constructs

<b>N°</b>	<b>Sequences</b>
1	5'-TCGAGCAGATCCAGTTCATCA-3'
2	5'-GACGGATCCTCTAGACAGGTTAAGCAACTTGC-3'
3	5'-CTGCTTGGAGCTACAAAGAGATCCATG-3'
4	5'-TAACAGCACCAATGAAGAAG-3'
5	5'-GTCGGATCCCCAGCGGCTTGCTAGAT-3'
6	5'-ACG TGG CCAAAATTGACAATCTACTTCAG-3'
7	5'-CGTGGATCCTCTAGAGTGCCGTTCTGAAGTAAACAC-3'
8	5'-CACGGTACCACTTTCTCAGGCCTC-3'
9	5'-GAAAATCTCGCCAAGCTCC-3'
10	5'-GATCCGCCAAGATTGACAACCTGTTGCAGGAGATGCTGCTGGGAGGGTCCT-3'
11	5'-CTAGAGGACCCTCCCAGCAGCATCTCCTGCAACAGGTTGTCAATCTTGGCG-3'
12	5'-CTAGGATCCATCAGCACTCGAAGGTCAAG-3'
13	5'-CGTTCTAGATTAGGACCCTCCCAGCAGCAT-3'
14	5'-CTAGGATCCATCAGCACTCGAAGGTCAAG-3'
15	5'-AGTTCTAGAGGCACAGACAGGTTAAGC-3'
16	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
17	5'-CGTTCTAGAGGACCCTCCCAGCAGCAT-3'

Legends to figures

**Fig. 1, Modulation of transactivating activities of full-length HNF-4 by its F domain.**

Panel A : schematic representation of HNF-4 isoforms and chimeras, the four constructs in pSG5 vector contain the A through E domains of HNF-4 $\alpha$ 2 and F domains from various origins which are depicted by different drawings. Human HNF-4 $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3 correspond to natural isoforms whereas Ch-rat F $\alpha$ 1 and Ch-hu F $\gamma$  correspond to chimeras containing F domains from rat isoform  $\alpha$ 1 and human isoform  $\gamma$ , respectively. Panel B, reporter assays. The effects of F domains were analysed on five different promoters : human apoCIII promoter (apoCIII), mouse HNF-1 promoter (HNF-1), apoCIII and apoAII HNF-4 responsive elements upstream of the TATA box [(CIIIB)2x-TATA and (AIIJ)4x-TATA, respectively] and apoAII HNF-4 responsive element upstream of the thymidine kinase promoter [(AIIJ)3x-TK]. These promoters (500ng) were cotransfected in COS-1 cells with 250 ng of either non-programmed pSG5 or pSG5 programmed with the various HNF-4 isoforms or chimeras indicated in the left part. For calculation of the fold activation, the reporter activities were divided by the reporter activity obtained with the promoter cotransfected with the non-programmed pSG5 within each set of tested promoters. The error bars represent the standard deviation of  $\beta$  galactosidase normalized reporter activities from three experiments performed in triplicates. Panel C, expression levels of HNF-4 isoforms and chimeras. COS-1 cells were transfected with 10  $\mu$ g of the appropriate expression plasmids per 100-mm plate. The amounts of HNF-4 isoforms and chimeric proteins were analysed by EMSA : nuclear extracts (3 $\mu$ g) were incubated with 0.2ng of <sup>32</sup>P-labelled CIIIB and the DNA-protein complexes were resolved by PAGE in TAE buffer at 4°C.

**Fig. 2, Modulation of the AF-2 activity by the F domains.** Panel A : schematic representation of the constructs used : chimeras expressing the yeast GAL4 DBD (1-147) fused to the HNF-4 $\alpha$  AF-2 AD (355-369) or the HNF-4 $\alpha$  AF-2 (128-369) and F domains of various origins, depicted

by different drawings. Panel B: reporter assays. COS-1 cells were transiently transfected with 500ng of the (GAL4)x5 TATA box or (GAL4)x2 thymidine kinase promoter- luciferase reporter plasmids (GAL4-TATA and GAL4 TK, respectively) and 250 ng of the vectors expressing the chimeras. The error bars represent the standard deviation of  $\beta$  galactosidase normalized luciferase activities from three experiments performed in triplicates. Panel C : expression levels of GAL4 chimeras. COS-1 cells were transfected as indicated in the Experimental section with the chimeras presented in panel A. Nuclear extracts (6 $\mu$ g) were incubated with 0.2 ng of  $^{32}$ P labelled UAS 17MX ds-oligonucleotide carrying the GAL-4 DNA binding sequence [28] and DNA-protein complexes were resolved by PAGE as in Fig. 1C.

**Fig. 3, Transactivating activities of full-length HNF-4 $\alpha$ 2 and of its deletion mutants.** Panel A : schematic representation of constructs : HNF-4 $\alpha$ 2 and its mutants where F domain was either deleted (HNF-4  $\Delta$ F) or replaced by a 12-aa long peptide (HNF-4 Fu). Panels B and C : activities in COS-1 and HepG2 cells, respectively. The transactivating activities of constructs depicted in panel A were studied on mouse HNF-1 (HNF-1) and human apoCIII (apoCIII) promoters and on promoters constituted with HNF-4 responsive elements of apoAII and apoCIII genes upstream of the TATA box [(AIIJ)x4-TATA and (CIIIB)x2-TATA, respectively]. For calculation of the fold activation, the reporter activities were divided by the reporter activity obtained with the promoter cotransfected with the non-programmed pDNA3 vector within each set of tested promoters. The error bars represent the standard deviation of  $\beta$  galactosidase normalized luciferase activities from three experiments performed in triplicates. Note the different scales in the ordinates. D, expression levels of HNF-4 deletion mutants. COS-1 cells were transfected with 10  $\mu$ g of the appropriate expression plasmids per 100-mm plate. The amounts of HNF-4 $\alpha$ 2 and its mutants HNF-4  $\Delta$ F and HNF-4 Fu were analysed by EMSA : nuclear extracts (3 $\mu$ g) were incubated with 0.2ng of  $^{32}$ P-labeled CIIIB and the DNA-protein complexes were resolved by PAGE in TAE

buffer at 4°C. E, sequence similarities between repressor domains. Rat HNF-4 $\alpha$ 1 and human progesterone receptor (PR) repressor domains (boxed sequences) are from [33]. Full line and dotted line represent mutations which completely and partially disrupt the repressor domain activity, respectively [33].

**Fig. 4, In vitro interaction of HNF-4 $\alpha$ 2 and of its deletion mutants with the coactivator GRIP1.** <sup>35</sup>S labeled HNF-4 $\alpha$ 2 and its deletion mutants were incubated with bacterially-expressed GST-GRIP1 bound to glutathione-Sepharose (GST-Sepharose) beads. After extensive washing of beads, input and bound proteins were analyzed by SDS-PAGE. The input lanes represent 5% of proteins used in pull-down experiments. Proteins were visualized by autoradiography and quantified on a Phosphor Imager.

**Fig. 5, Prediction of secondary structures of F domains from HNF-4 isoforms.** F domains from rat HNF-4 $\alpha$ 1 (rat  $\alpha$ 1), human HNF-4 $\alpha$ 2 (hu  $\alpha$ 2 ), human HNF-4 $\alpha$ 3 (hu  $\alpha$ 3) and human HNF-4 $\gamma$  (hu  $\gamma$ ) . For convenience of alignment of primary structures, the insertion of ten amino acids in HNF-4 $\alpha$ 2, which does not give rise to predicted secondary structure, is presented above the sequence common to isoforms  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2. The joint predicted structures obtained from five methods using the Antheprot program [31] are presented. The highly conserved motif  $\phi\phi XE\phi\phi$  encompassed in the AF-2 AD module is boxed. Positions of amino acids of the F domains are given taking as first residue the glycine corresponding to the first codon of the ninth exon which codes for the amino-terminal half of the F domains [43]. Helices, chevrons and broken lines represent  $\alpha$  helices,  $\beta$  sheet strands and  $\beta$  turns, respectively.

Figure 1.

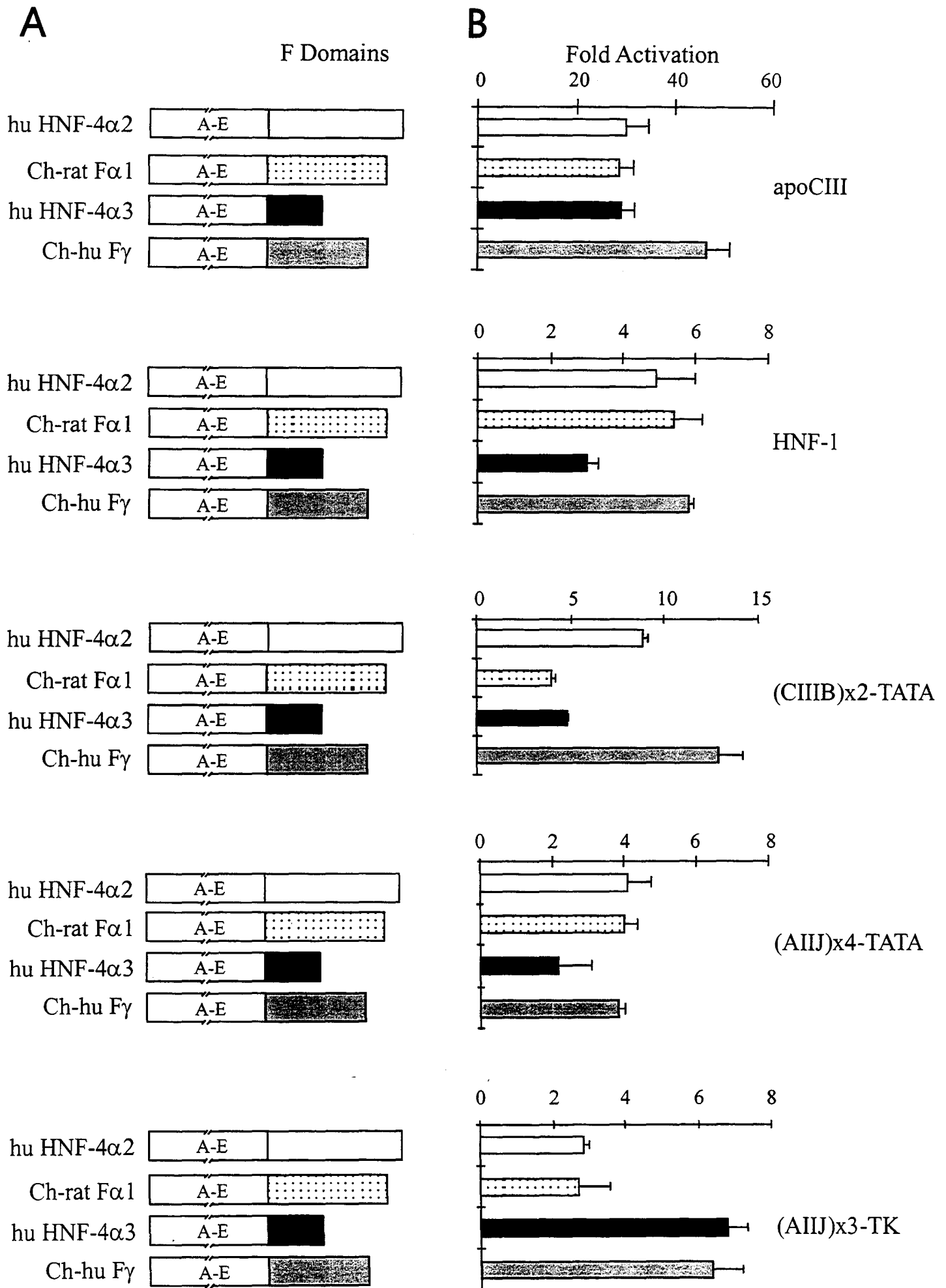


Figure 1.

C

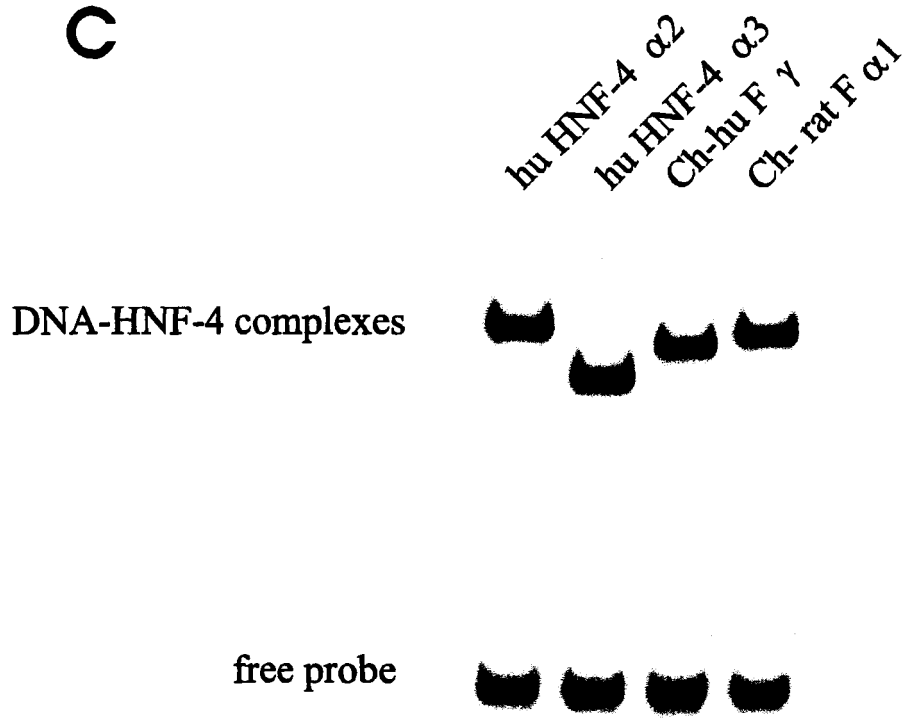
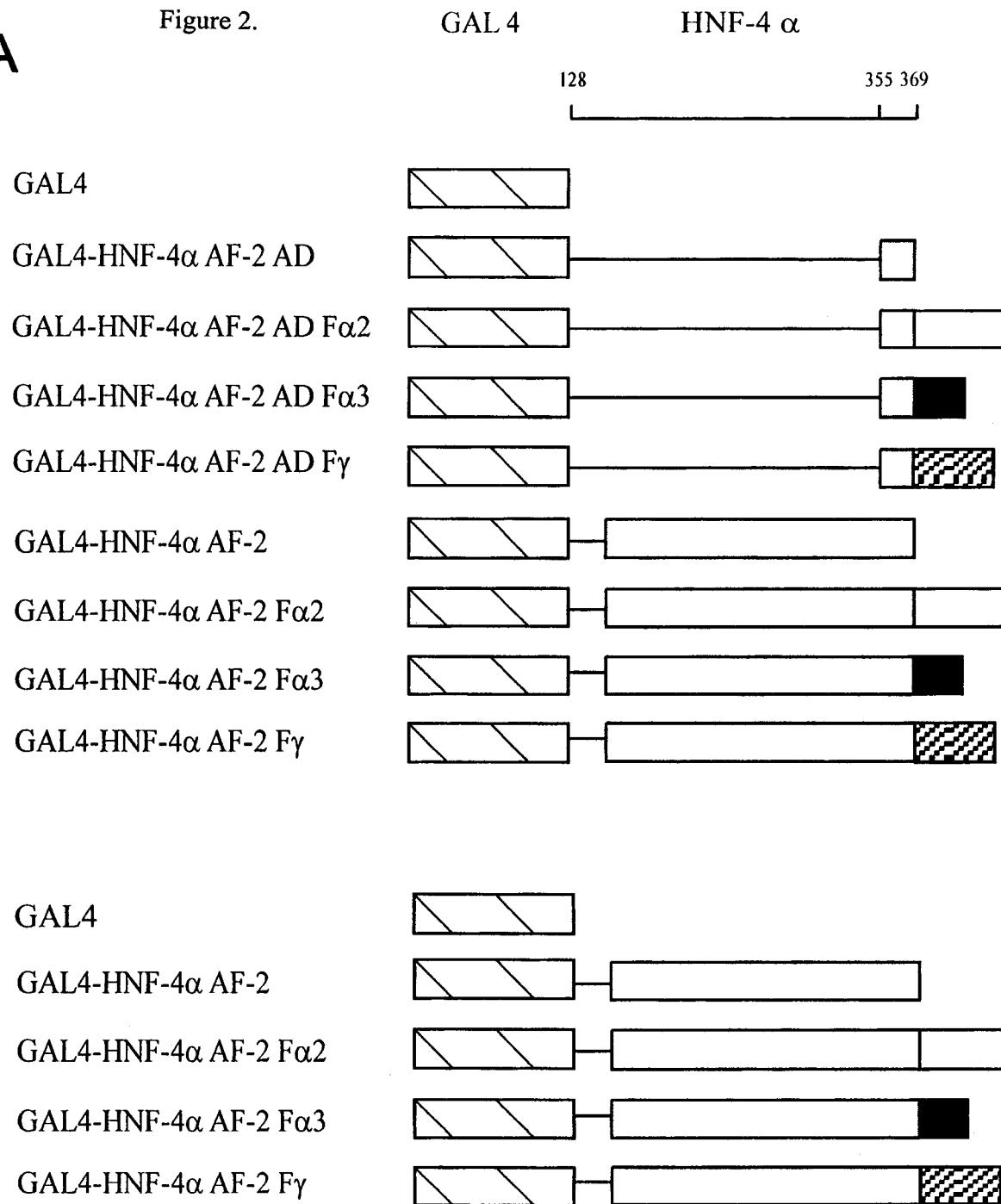




Figure 2.

**A**



**B**

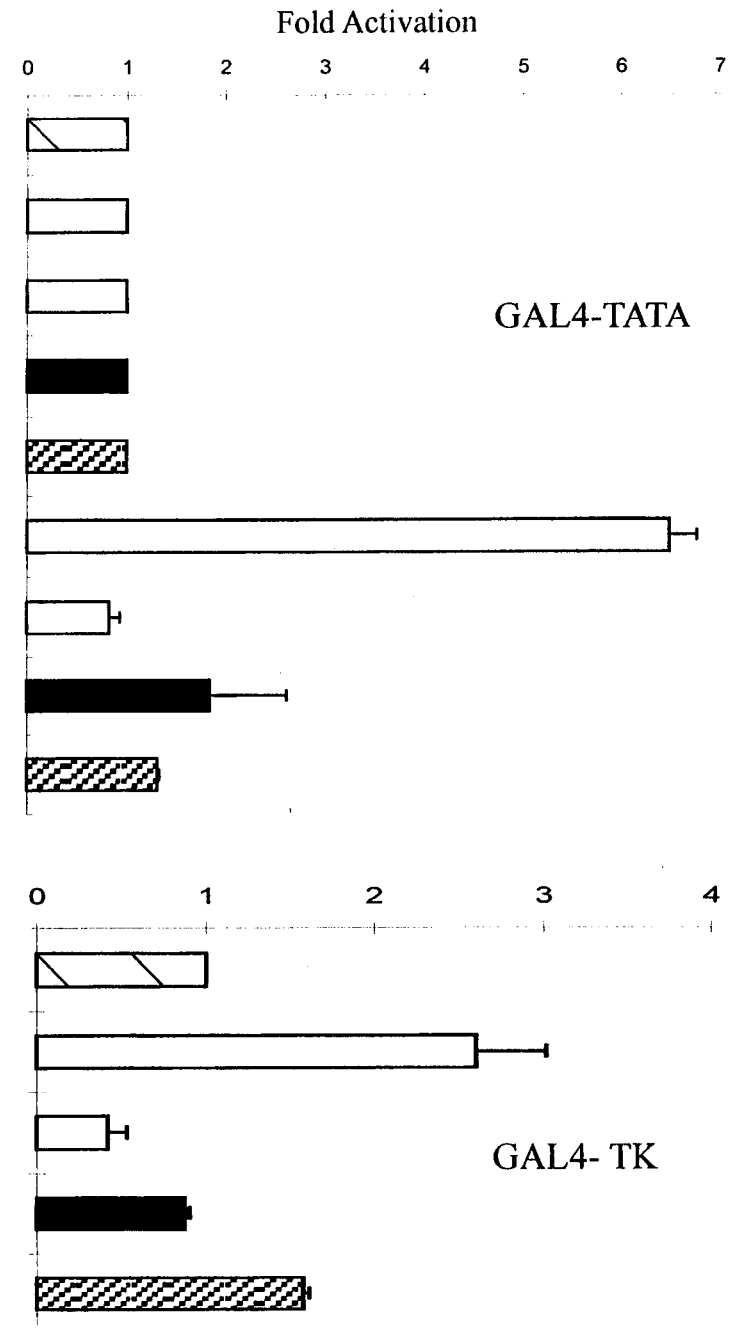


Figure 2.

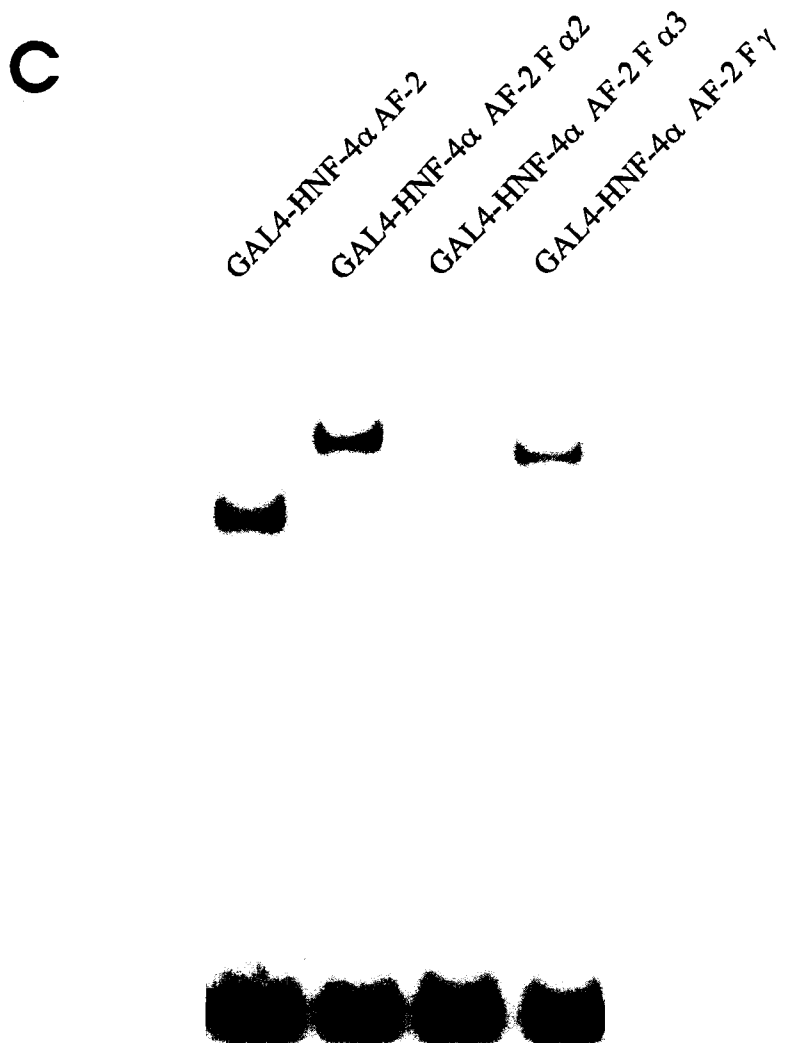
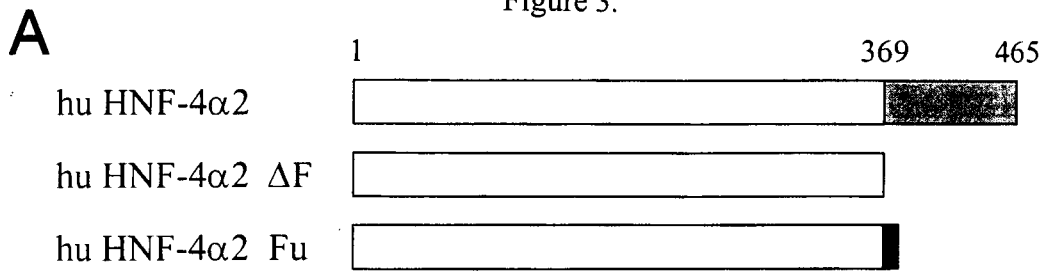
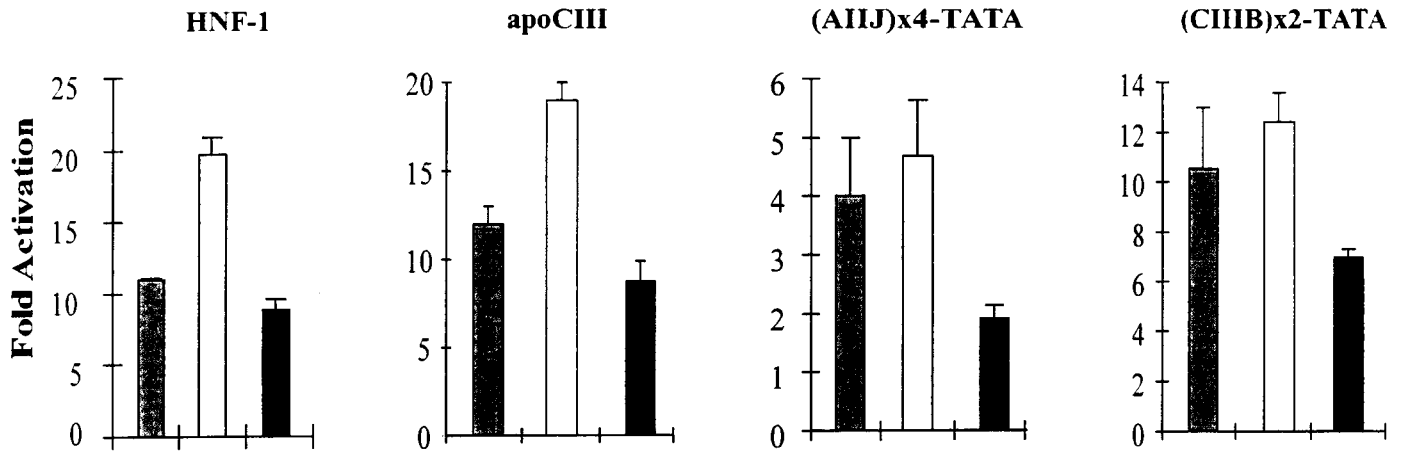


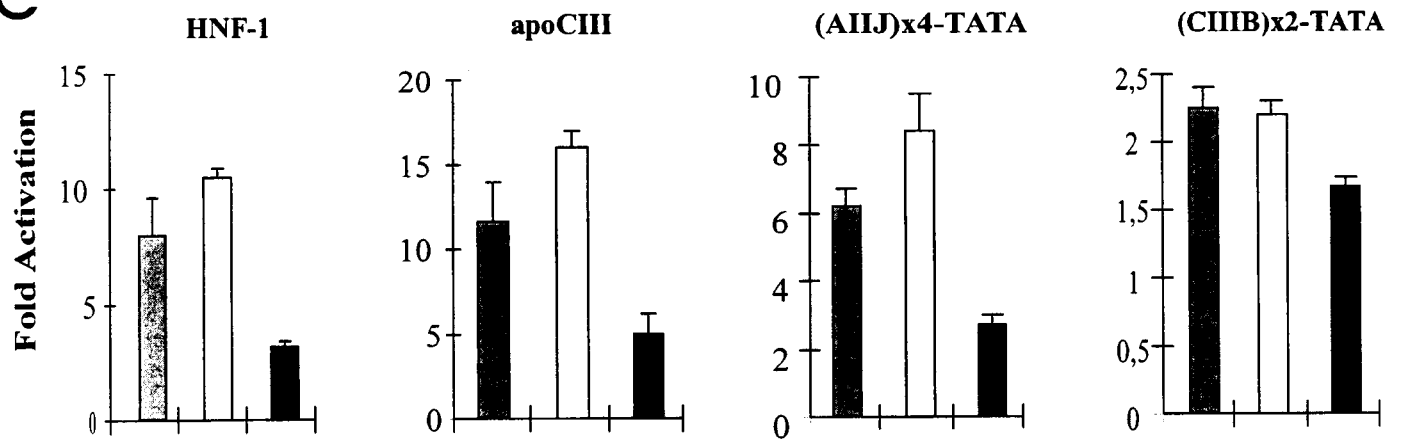
Figure 3.



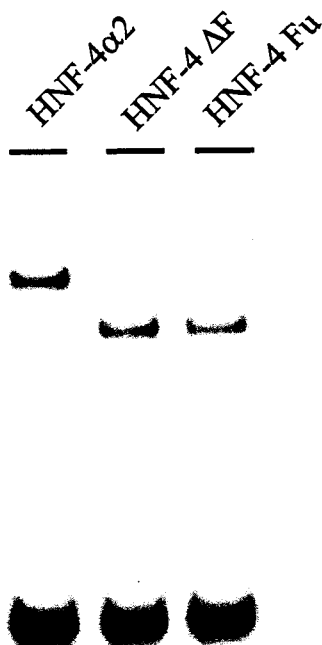
**B**



**C**



**D**



**E**

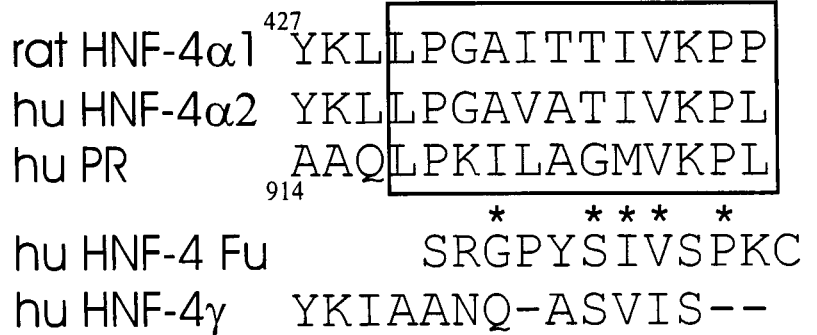


Figure 4.

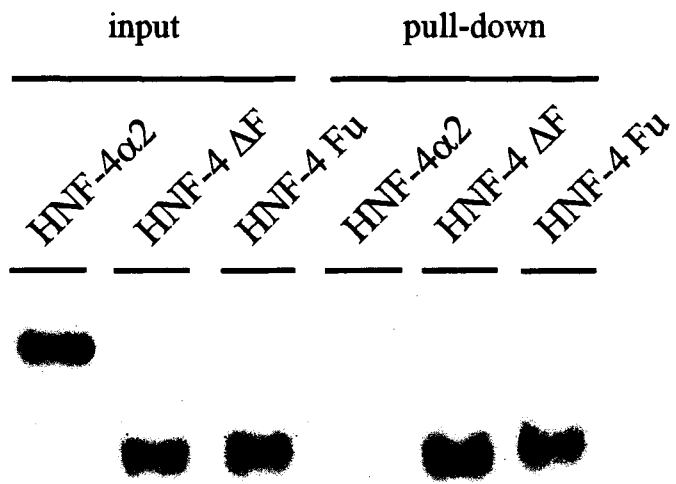
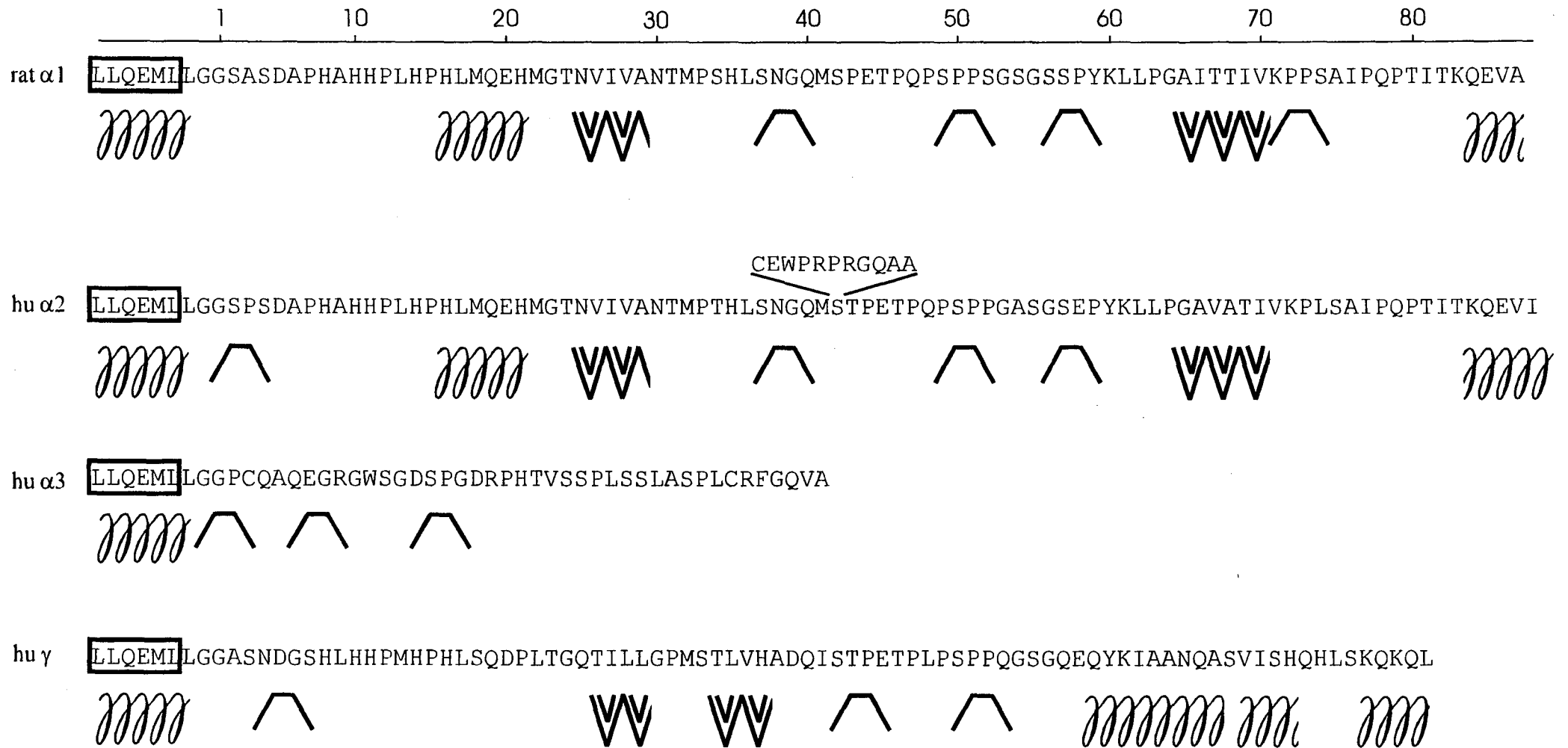


Figure 5.



### 3. Discussion :

Cette étude nous a permis de montrer que :

⇒ Le domaine F module l'activité transcriptionnelle du "core récepteur" et du domaine d'activation AF-2 de HNF-4. Cette modulation varie avec l'origine du domaine F et dépend du gène cible.

⇒ Le domaine F des isoformes de HNF-4 humain ont la capacité de réprimer l'activité transcriptionnelle de son domaine d'activation AF-2. Cette activité répressive, qui avait été décrite pour HNF-4  $\alpha 2$ , est aussi observée pour  $\alpha 3$  et  $\gamma$ .

⇒ Ce phénomène de répression n'est pas dû à un encombrement stérique de l'AF-2 AD par le domaine F.

Iyemere *et al* (Iyemere *et al.* 1998) ont montré que la région située entre les résidus d'acides aminés 428 à 441 du domaine F de HNF-4  $\alpha 1$  de rat porte la fonction répressive. Cette séquence en acides aminés n'est pas présente chez HNF-4  $\gamma$  et  $\alpha 3$ . Cela suggère qu'il existe un autre mécanisme permettant la répression de l'activité transcriptionnelle.

Nous pouvons nous demander si la construction HNF-4 Fu, qui présente une activité de répression élevée, ne possède pas les résidus d'acides aminés essentiels à ce mécanisme. Des résultats préliminaires, montrent que les isoformes de HNF-4, ainsi que HNF-4  $\Delta F$  interagissent différemment avec le coactivateur GRIP1 : plus le domaine F est répresseur, plus l'interaction avec GRIP1 est faible. Cela suggère que le domaine F est capable d'influencer l'interaction de HNF-4 avec les coactivateurs, et par conséquent d'influencer l'activité transcriptionnelle. Il sera donc intéressant de mesurer l'interaction entre GRIP1 et la construction HNF-4 Fu.

Notons que dans le contexte de l'AF-2, le domaine F de l'isoforme  $\alpha 2$  a une activité répressive plus forte que celle du domaine F de  $\alpha 3$ . Pourtant dans le contexte du récepteur entier, l'activité de l'isoforme  $\alpha 3$  est plus faible que celle de l'isoforme  $\alpha 2$  sur trois des cinq promoteurs étudiés ( HNF-1, (CIIIB)x2TATA et (AIIJ)x4TATA). Cela suggère un rôle du domaine F sur l'AF-1, ou sur la synergie AF-2-AF-1. La forte différence d'activité transcriptionnelle entre HNF-4  $\alpha 2$  et  $\alpha 5$  humain (Drewes *et al.* 1996) qui ne diffèrent que par l'espacement entre les AF-1 et AF-2, du à l'insertion de 30 résidus d'acides aminés dans le domaine A/B de HNF-4  $\alpha 5$ , est un argument en faveur d'une synergie entre ces domaines d'activation. Une synergie entre l'AF-1 et l'AF-2 du récepteur aux oestrogènes a été mise

en évidence (Berrevoets *et al.* 1998). Cette synergie permet une activation plus efficace de l'AF-2 AD du AR avec le coactivateur TIF-2.

Ces expériences ont été réalisées sans ligand (thioesters d'acides gras). Il sera intéressant d'effectuer ces expériences en présence de ces molécules afin de déterminer si le domaine F possède toujours dans ces conditions la capacité de réprimer l'activité transcriptionnelle. Il a déjà été montré que le domaine F participe à la réponse aux antioestrogènes (Montano *et al.* 1995; Nichols *et al.* 1998).

Les résultats de Xu *et al* suggèrent que le motif répresseur contenu dans le domaine F de PR est impliqué dans l'interaction avec un corépresseur (Xu *et al.* 1996). Nous pouvons aussi envisager que le domaine F de HNF-4 puisse intervenir dans l'association avec des corépresseurs. Suivant la structure du domaine F, la force de ces interactions pourrait être plus ou moins élevée.

## B. Les mutants de HNF-4 $\alpha$ liés au MODY 1 :

Des études génétiques ont montré qu'il existe un lien entre des mutations dans le gène de HNF-4 $\alpha$  et la forme MODY 1 du diabète de type 2. Comme nous l'avons vu précédemment, deux types de mutations ont été mises en évidence, d'une part des mutations non sens conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée (R154X et Q268X), d'autre part des mutations ponctuelles entraînant la substitution conservative ou non d'un acide aminé (R127W, T130I, V255M, E276Q et V393I).

Nous nous sommes intéressé à quatre mutations ponctuelles, HNF-4 $\alpha$  V393I, T130I, V255M et E276Q, dans le but de déterminer si elles modifient les propriétés fonctionnelles de HNF-4 $\alpha$ .

L'étude du mutant HNF-4 $\alpha$  V393I a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Philippe Froguel. Cette équipe a réalisé l'étude génétique sur 19 familles françaises présentant un diabète de type 2. Ainsi, la mutation HNF-4 $\alpha$  V393I co-ségrège avec le phénotype diabète de type 2 dans les pedigrees F-40, par contre elle n'est pas retrouvée chez les 119 sujets contrôles (non diabétiques). Il faut remarquer que le diabète apparaît tardivement dans le pedigree F-40, mais la tolérance au glucose se dégrade progressivement. En fait, même si tous les sujets ont une tolérance normale au glucose, excepté le sujet âgé de 48 ans, cinq d'entre eux présentent un rapport insuline/glucose, déterminé deux heures après la prise orale de glucose, diminué entre 1992 et 1995. Cette mutation entraînerait donc un défaut progressif de la sécrétion d'insuline. La substitution V-I se trouve localisée dans le domaine F. Ce domaine est impliqué dans des phénomènes de répression de l'activité transcriptionnelle de HNF-4. L'étude de cette mutation s'inscrit dans la continuité du travail sur le domaine F.

Les études des mutants HNF-4 $\alpha$  T130I et V255M ont été réalisées en collaboration avec A. M. Moller (Steno Diabetes Center, Niels Steensens, Copenhague, Danemark). A. M. Moller a identifié les mutations T130I et V255M dans HNF-4 $\alpha$  dans une famille danoise atteinte de diabète de type 2 (Moller *et al.*, 1997). Une de ces substitutions (V255M) est retrouvée exclusivement chez les sujets ayant un diabète. La mutation T130I n'est trouvée que chez les sujets diabétiques danois, elle n'est pas retrouvée dans la population suédoise.

La substitution T130I est localisée dans la boîte A de HNF-4. Nous suspectons que cette substitution non conservative puisse modifier les propriétés de fixation à l'ADN et donc la transactivation de HNF-4. La substitution V255M est quant à elle localisée dans le domaine E.



La liaison génétique entre la mutation HNF-4 $\alpha$  E276Q et le phénotype MODY a été montrée pour une famille britannique (Bulman *et al.* 1997). Chez cette dernière, 13 sujets sont porteurs de la mutation E276Q, et 5 sujets ont déjà développé un diabète. Cette mutation n'est pas présente chez les sujets contrôles. La mutation E276Q est localisée dans le domaine E. Il est important de noter que le résidu d'acide glutamique est bien conservé au cours de l'évolution, il est retrouvé chez l'homme, le rat, la souris et le xénope.

## 1. Stratégie :

L'objectif de notre étude a été de déterminer les propriétés de liaison à l'ADN et de transactivation des mutants de HNF-4 $\alpha$ . L'activité de liaison à l'ADN des protéines HNF-4 sauvages et mutées a été analysée par gel retard. Nous avons aussi comparé l'activité transcriptionnelle de HNF-4  $\alpha$ 2 humain sauvage et muté. Les capacités de transactivation de ces protéines ont été testées par transfection transitoire dans des cellules eucaryotes. Les gènes cibles testés sont le promoteur naturel de l'apoCIII ainsi que le promoteur hétérologue CIIIB-TK, et le promoteur naturel de HNF-1. HNF-1 est connu pour être impliqué, au niveau des cellules  $\beta$  du pancréas, dans l'expression du gène de l'insuline et d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose.

## 2. Résultats :

### 2.1 Etude du mutant V393I :

La découverte de la mutation HNF-4 $\alpha$  V393I ainsi que ses conséquences fonctionnelles ont fait l'objet de la publication suivante .

⇒ Hani, E.H., Suaud, L., Boutin, P., Chèvre, J.-C., Durand, E., Philippi, A., Demenais, F., Vionnet, N., Furuta, H., Velho, G., Bell, G.I., Laine, B., et Froguel, P. A missense mutation in hepatocyte nuclear factor-4  $\alpha$ , resulting in a reduced transactivation activity, in human late-onset non insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 101(3):521-526, 1998.

## A Missense Mutation in Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$ , Resulting in a Reduced Transactivation Activity, in Human Late-onset Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus

El Habib Hani,\* Laurence Suaud,<sup>‡</sup> Philippe Boutin,\* Jean-Claude Chèvre,\* Emmanuelle Durand,\* Anne Philippi,<sup>§</sup> Florence Demenais,<sup>§</sup> Nathalie Vionnet,\* Hiroto Furuta,<sup>||</sup> Gilberto Velho,<sup>||</sup> Graeme I. Bell,<sup>||</sup> Bernard Laine,<sup>‡</sup> and Philippe Froguel\*

\*Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) EP10-Institute of Biology, Pasteur Institute of Lille & CHRU-Lille, 59019 Lille, France; <sup>‡</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)-U459, Laboratoire de Biochimie Structurale, 59045 Lille, France; <sup>§</sup>INSERM-U358, Hôpital Saint Louis, 75010 Paris, France; <sup>||</sup>Howard Hughes Medical Institute, and Department of Biochemistry and Department of Molecular Biology and Medicine, The University of Chicago, Chicago, Illinois 60637; and <sup>||</sup>INSERM-U342, Hôpital Saint Vincent-de-Paul, Paris 75014, France

### Abstract

Non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) is a heterogeneous disorder characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion and action. Recent studies have found mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene (*HNF-4 $\alpha$* ) in families with maturity-onset diabetes of the young (*MODY*), an autosomal dominant form of diabetes characterized by early age at onset and a defect in glucose-stimulated insulin secretion. During the course of our search for susceptibility genes contributing to the more common late-onset NIDDM forms, we observed nominal evidence for linkage between NIDDM and markers in the region of the *HNF-4 $\alpha$ /MODY1* locus in a subset of French families with NIDDM diagnosed before 45 yr of age. Thus, we screened these families for mutations in the *HNF-4 $\alpha$*  gene. We found a missense mutation, resulting in a valine-to-isoleucine substitution at codon 393 in a single family. This mutation cosegregated with diabetes and impaired insulin secretion, and was not present in 119 control subjects. Expression studies showed that this conservative substitution is associated with a marked reduction of transactivation activity, a result consistent with this mutation contributing to the insulin secretory defect observed in this family. (*J. Clin. Invest.* 1998. 101:521–526.) Key words: mutation • late-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus • *MODY* • hepatocyte nuclear factor • gene expression

### Introduction

Non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus (NIDDM)<sup>1</sup> is a phenotypically and genetically heterogeneous disorder affecting more than 100 million people worldwide. It usually appears in the fourth and fifth decades of life and results from defects in insulin secretion as well as in action of insulin on its target tissues, muscle, fat, and liver (1). However, little is known about the molecular mechanisms involved in the development of NIDDM and investigators have begun to use genetic approaches in order to gain a better understanding of why and how NIDDM develops. Such studies have led to the localization of NIDDM susceptibility genes in the Mexican American population of Starr County, Texas (*NIDDM1*), and in the Swedish-speaking population of Botnia, Finland (*NIDDM2*) (2, 3).

Genetic studies of families with a monogenic form of NIDDM, termed maturity-onset diabetes of the young (*MODY*), have also provided new insights into the etiology of diabetes. Accounting for about 5–10% of NIDDM cases, *MODY* is an autosomal dominant form of NIDDM characterized by early-onset (usually  $\leq$  25 yr) and a primary defect in insulin secretion (4). The identification of three genes associated with *MODY* has provided a better understanding of the factors regulating blood glucose levels. These genes include the hepatocyte nuclear factor-4 alpha (*HNF-4 $\alpha$* )/*MODY1* gene on chromosome 20q, the glucokinase/*MODY2* gene on chromosome 7p, and the *HNF-1 $\alpha$* /*MODY3* gene on chromosome 12q (5–7). *HNF-1 $\alpha$*  and -4 $\alpha$  are transcription factors first identified in the context of their role in regulating liver-specific gene expression although they are also found in other tissues including the insulin-secreting cells of the pancreas (8). Mutations in both of these genes are associated with specific defects in the normal pattern of glucose-stimulated insulin secretion, and their effect on pancreatic  $\beta$  cell function leads to diabetes (5, 7). Glucokinase is a glycolytic enzyme that plays a key role in glucose-

El Habib Hani and Laurence Suaud contributed equally to this work.

Address correspondence to Dr. Philippe Froguel, CNRS EP10, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France. Phone: 33-3-20-87-79-11; FAX: 33-3-20-87-72-29; E-mail: froguel@xenope.univ-lille2.fr

Received for publication 4 August 1997 and accepted in revised form 8 December 1997.

*J. Clin. Invest.*

© The American Society for Clinical Investigation, Inc.

0021-9738/98/02/0521/06 \$2.00

Volume 101, Number 3, February 1998, 521–526

<http://www.jci.org>

1. Abbreviations used in this paper: *HNF-1 $\alpha$* , hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene; *HNF-4 $\alpha$* , hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene; MLS, multipoint-likelihood score; *MODY*, maturity-onset diabetes of the young; NIDDM, non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus; TK, thymidine kinase.

sensing by the pancreatic  $\beta$  cell and integration of hepatic glucose metabolism (9). Deficiency of this enzyme leads to defects in insulin secretion in the pancreatic  $\beta$  cells, and glycogen synthesis in the liver, both of which cause hyperglycemia (6).

Although mutations in *HNF-1 $\alpha$*  and glucokinase are a major cause of MODY accounting for 35–75% of MODY (6, 7, 10, and 11), they do not appear to be a significant contributory factor to genetic susceptibility for the common late-onset form of NIDDM in White subjects of French ancestry (12, 13, and Vionnet, N., unpublished data). By contrast, we observed nominal evidence for linkage of markers in the region of the *HNF-4 $\alpha$ /MODY1* gene with NIDDM in a subset of French families with age at onset  $\leq$  45 years: two-point multipoint-likelihood score (MLS) equal to 2.84 ( $P = 0.0003$ ) and multipoint-MLS equal to 1.51 ( $P = 0.007$ ) (14). Similar results have been recently obtained in White NIDDM sib-pairs from the United States (15, 16). This prompted us to screen *HNF-4 $\alpha$ /MODY1* in 19 French NIDDM families potentially contributing to the observed linkage to assess the role of *HNF-4 $\alpha$ /MODY1* in these families.

In this report, we describe a valine-to-isoleucine substitution (V393I) in *HNF-4 $\alpha$*  which cosegregates with typical late-onset NIDDM. We also show that this mutation is closely associated with a progressive alteration in insulin secretion, a result compatible with functional expression data, where we demonstrate that the V393I mutation causes a significant decrease of *HNF-4 $\alpha$*  transcription activation of specific target genes including the *HNF-1 $\alpha$*  gene.

## Methods

**Subjects.** We investigated 19 NIDDM families for mutations in the coding exons of the *HNF-4 $\alpha$*  gene. These families belong to a previously well-described collection of French Caucasian late-onset NIDDM pedigrees (13, 14). There was no evidence of linkage between markers for glucokinase/*MODY2* and *HNF-1 $\alpha$ /MODY3* loci and NIDDM in these families (12, 13). Furthermore, direct screening revealed no mutations in the *HNF-1 $\alpha$ /MODY3* gene (Vionnet, N., unpublished data). Genotyping polymorphic markers on chromosome 20q in this sample showed nominal evidence of linkage with NIDDM diagnosed before the age of 45 yr (14). The two-point MLS being 2.84 ( $P = 0.0003$ ) and the multipoint MLS reached 1.51 ( $P = 0.007$ ) in the *MODY1* region. 19 families positively contributing to these MLSs were selected for mutational screening. We screened one affected subject from each family. The clinical features of the 19 probands (12 men and 7 women) are: present age,  $63 \pm 11$  years (mean  $\pm$  SD); age at diagnosis,  $34 \pm 8$  years; present body mass index,  $27.0 \pm 4.1$  kg/m<sup>2</sup>; present fasting plasma glucose and insulin levels,  $9.8 \pm 3.8$  mmol/liter and  $14 \pm 10$  mU/liter, respectively; and current treatment, oral hypoglycemic agents, 11; insulin, 4; oral hypoglycemic agents plus insulin, 4. NIDDM was diagnosed based on the WHO criteria (17), and all control subjects underwent a standard oral glucose tolerance test.

***HNF-4 $\alpha$*  gene screening.** The 10 exons and the adjacent introns of the *HNF-4 $\alpha$*  gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) (5). The PCR products were purified using G-sephadex P60 gel matrix in 96-well Millipore plate filters, before sequencing reactions. Sequencing was performed on both strands using an AmpliTaq FS Dye terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, Corp., Norwalk, CT; Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Sequencing reactions were purified using G-sephadex P10 gel matrix in 96-well Millipore plate filters before electrophoresis on an ABI Prism 377 DNA sequencer.

**PCR-RFLP analysis of exon 9.** Genotyping of the V393I mutation was examined by a restriction cleavage assay using a nested forward oligonucleotide with two mismatches at the third and fourth

nucleotides from the 3' end (5'-TGAGTGGGCATTGTGTTGGCA-ACG TCGA-3'); the reverse primer corresponded to the wild-type sequence (5'-GCATCCAGACTCTCCATCC-3'). The two mismatches in the forward primer introduce a *Sal*I polymorphic restriction site, depending on the presence or absence of the exon 9 G-to-A transition. Specificity of this screening protocol was controlled by direct sequencing on both strands of the yielded PCR product (data not shown). The amplified product (146 bp) was digested with 5 U of *Sal*I at 37°C, before loading onto 4% High Resolution Blend 3:1 agarose gel. The normal allele is digested into 117 bp and 29-bp fragments, whereas mutant allele is uncut.

**Expression vectors and reporter constructs.** The mutant V393I *HNF-4 $\alpha$ 2* was generated from the wild-type human *HNF-4 $\alpha$ 2* isoform (18) cloned in the expression vector pSG5 using the Stratagene ExSite™ PCR-based site-directed mutagenesis kit according to the manufacturer's instructions. The sense primer 5'-ATGGGTACCAACATC-ATCGTTGC-3' contained a G-to-A mutation at position 13 to generate the V393I substitution and a translationally silent T-to-A mutation at position six introducing a *Rsa*I restriction site to aid in screening for clones with V393I mutation. The antisense primer 5'-ATGTTCTGCATCAGGTGAGGGTG-3' corresponded to the wild type sequence. The human apolipoprotein CIII (*apo CIII*) promoter (EcoRI -1400/PvuII +21) and the mouse hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  (*HNF-1 $\alpha$* ) promoter (PstI -1300/NheI +157) were cloned in the pBLCAT6 reporter vector to generate the *apo CIII-CAT* and the *HNF-1 $\alpha$ -CAT* vectors, respectively. The *CIIIB TK* corresponded to the minimal thymidine kinase (TK) promoter (-105/+51) under the control of the *HNF-4* response element B of the *apo CIII* gene promoter (*CIIIB*), inserted upstream of the *CAT* reporter gene.

**Transient transfection assays.** COS-1 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DME) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and containing 4.5 g/liter glucose. Cells were transfected by the Polyethyleneimine method as described (19), using 300 ng of the *CAT* reporter plasmid and 75 ng of pSG5 expression vector either without cDNA insert or with *HNF-4 $\alpha$*  cDNA insert (wild-type or V393I mutant *HNF-4 $\alpha$ 2*). To normalize for differences in transfection efficiencies a CMV-driven  $\beta$ -galactosidase expression plasmid was transfected simultaneously. *CAT* assays were performed as previously described (20).

**Protein expression.** Wild-type and V393I mutant *HNF-4 $\alpha$*  proteins were transiently expressed in COS-1 cells. Nuclei were isolated and nuclear extracts were prepared as previously described (21, 22). Protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) according to the manufacturer's recommendations. Nuclear proteins were separated by SDS-10% PAGE and then transferred to a Hybond-C extra membrane (Amersham Life Sciences-USB, Arlington Heights, IL). The membrane was preincubated overnight at 4°C in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% (vol/vol) Tween 20 (TBST) in the presence of 5% (wt/vol) nonfat dried milk. After four washes in TBST, the membrane was incubated for 2 h with a 1:2,500 dilution of the specific anti-*HNF-4 $\alpha$ 445* antiserum (23) in TBST containing 2% nonfat dried milk. The blot was then washed in TBST and incubated for 1 h with the secondary antibody, a peroxidase-conjugated anti-rabbit at a 1:1,000 dilution in TBST containing 2% nonfat dried milk. The blot was washed again in TBST and the peroxidase activity was revealed with the ECL enhanced chemiluminescence system (Amersham Life Sciences-USB).

## Results

One diabetic subject was selected from each family and the 10 exons of the *HNF-4 $\alpha$*  gene were amplified and sequenced on both strands (5). The sequences were identical to each other and to the published sequence except for four differences (Table I). Three out of these four substitutions occurred in introns. The fourth substitution in exon 9 (Fig. 1 A), a G-to-A transition in codon 393 resulting in a valine to an isoleucine

**Table 1. HNF4- $\alpha$  Gene Substitutions in French Late-onset NIDDM Families**

Exon/intron	Codon/nucleotide	Nucleotide change
Exon 9	codon 393	GTC(Val) $\rightarrow$ ATC(Ile)
Intron 1A	nt + 33	G $\rightarrow$ A
Intron 2	nt-5	C $\rightarrow$ T
Intron 9	nt + 61	A $\rightarrow$ T

nt, nucleotide.

mutation, was found in only one subject, a member of the pedigree F-40.

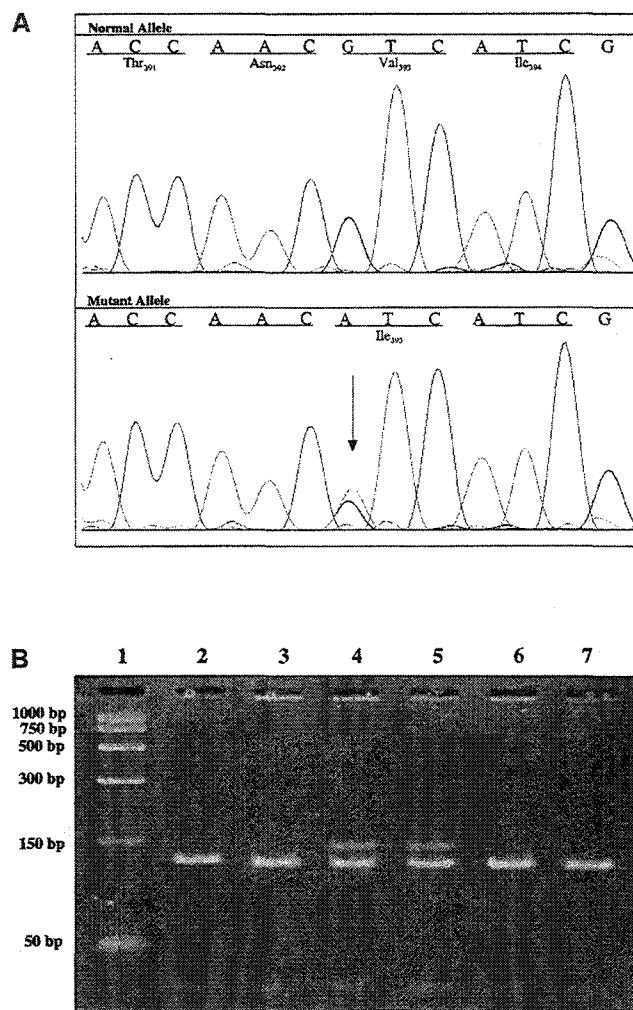
Since the V393I substitution does not result in the gain or loss of a site for a restriction endonuclease, we developed a simplified protocol that would allow us to use a PCR-RFLP assay to test for its presence (Fig. 1 B). Using this method, we found that the V393I mutation cosegregated with symptomatic NIDDM in the F-40 pedigree (Fig. 2), and was not found in any of 119 normal healthy control subjects; we did not detect this mutation in any of 191 other French NIDDM families. In pedigree F-40, six non-diabetic subjects were also found to carry the V393I mutation. Four of them are younger than 40 yr (32–39) and, thus, are under the average age at onset of diabetes in this family which is 45 yr (range: 40–55). The other two subjects are aged 48 and 50 yr, respectively. All these subjects have normal glucose tolerance, except subject 21, aged 50 yr, who recently presented with impaired glucose tolerance during an oral glucose test. Oral glucose tolerance tests were performed in five of these subjects (subjects 17–22, Fig. 2) in 1992 and again in 1997. They all had normal glucose tolerance in 1992, including subject 21. However, examination of the insulin/glucose ratio at 2 h after the oral glucose load, which is a reflection of insulin secretory function, showed a decrease of this parameter in the last 5 yr ( $6.35 \pm 3.30$  versus  $2.67 \pm 2.97$  mU/mmol;  $P = 0.043$  paired Wilcoxon signed-rank test; individual data are shown in Fig. 3). These data support a significant and progressive impairment of insulin secretion in the non-diabetic subjects who have inherited the V393I mutation. Clinical and biological data of diabetic and non-diabetic family members who carry the mutation are summarized in Table II. Two family members who did not inherit the V393I mutation, subjects 10 and 27, also had mild impaired glucose tolerance. Subject 27 is obese (BMI = 31.1 kg/m<sup>2</sup>), a condition that is often associated with abnormalities in glucose homeostasis. In addition, both of her parents have diabetes, with her mother carrying the mutation V393I (subject 24). Subject 10 is 75 yr of age, and has only recently developed mild impaired glucose tolerance associated with high insulin values. This is likely a reflection of the glucose intolerance that is present in a significant fraction (10–25%) of elderly individuals (24).

The effect of the V393I mutation on HNF-4 $\alpha$  function was evaluated using normal and mutant form of HNF-4 $\alpha$ , the most abundant HNF-4 $\alpha$  isoform present in liver, intestine, kidney and pancreatic islets tissues, and three different HNF-4 $\alpha$  targets: the *apo CIII* promoter, *HNF-1 $\alpha$*  promoter, and the *TK* promoter under the control of the HNF-4 $\alpha$  response element *CIIB (CIIB TK)*. The activities of these three promoters in the presence of wild-type or mutant HNF-4 $\alpha$ , compared with their basal activities in COS-1 cells lacking endogenous HNF-4 $\alpha$

activity are presented in Fig. 4 A. Wild-type HNF-4 $\alpha$ 2 activated expression of *apo CIII*, *HNF-1 $\alpha$* , and *CIIB TK* promoters by 140, 185, and 60%, respectively. In contrast, V393I HNF4- $\alpha$ 2 had lower activity, increasing expression by only 70, 90, and 20%, respectively. Thus, the transactivation activity of the V393I mutant HNF-4 $\alpha$ 2 was reduced at least by half, when compared with that of the wild-type HNF-4 $\alpha$ 2 protein. This decrease was not due to a reduced expression of the mutant HNF-4 $\alpha$ 2 protein, as ascertained by Western blot analysis of nuclear extracts of transfected COS-1 cells (Fig. 4 B).

## Discussion

These genetic and biochemical data suggest that the V393I mutation is a diabetogenic mutation rather than a rare variant of no functional consequence. The mutation was present in all NIDDM subjects from pedigree F-40 and in a glucose intolerant family member, but was not detected in 119 healthy non-



**Figure 1.** (A) Partial sequence of exon 9 of *HNF-4 $\alpha$*  gene. The sequences of the normal and mutant alleles are shown. The arrow indicates the G-to-A substitution at codon 393. (B) PCR-RFLP analysis of exon 9 V393I mutation in *HNF-4 $\alpha$*  gene. Lane 1 contains 50 ng of standard PCR size marker (Promega Corp., Madison, WI). Lanes 2, 3, 6, and 7 show the normal band pattern. Lanes 4 and 5 show the band pattern for V393I mutation heterozygous carriers, where the mutant allele is uncut.

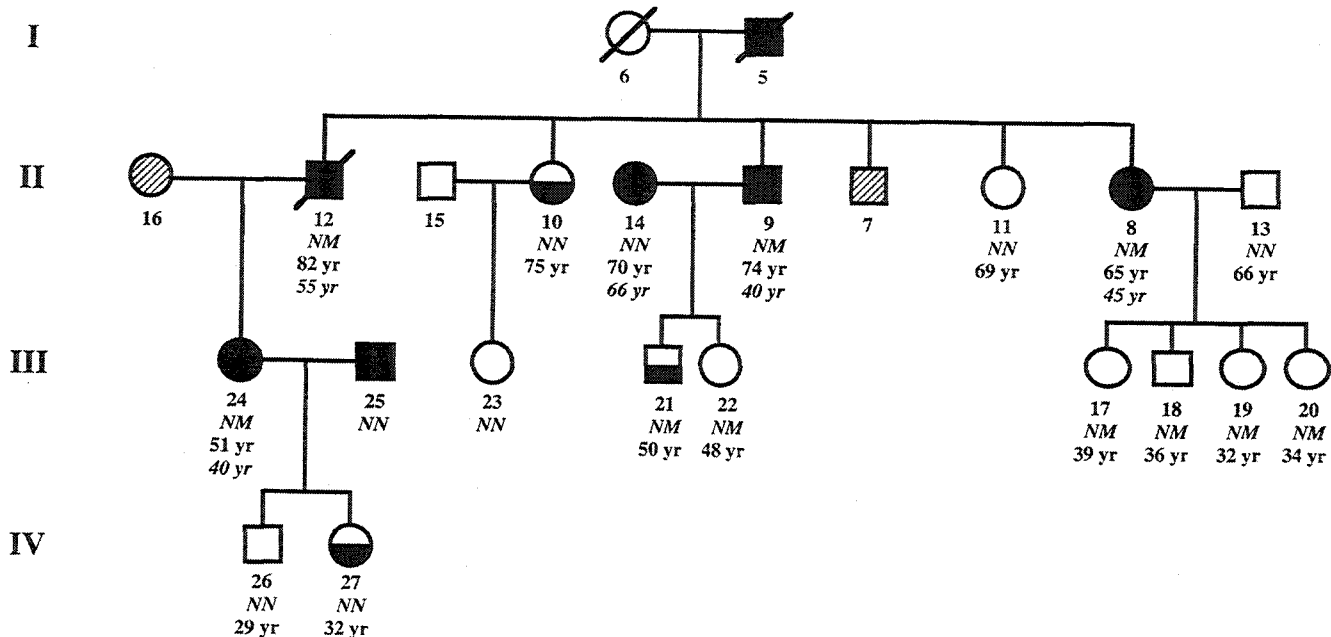


Figure 2. Segregation of the V393I mutation in Pedigree F-40. Closed, half-closed, and open symbols represent subjects with NIDDM, impaired glucose tolerance and normal glucose tolerance, respectively, while hatched symbols represent untested subjects. The first line under the symbols is the identification number. The second line shows the genotype at codon 393 of *HNF-4 $\alpha$*  (*italics*): *N*, normal allele (Val393); *M*, Mutant allele (Ile393). The third and fourth lines show, respectively, the current age of subjects and the age at diagnosis of diabetes (*italics*), when appropriate. The proband is subject No. 12, who is now deceased.

diabetic control subjects. Moreover, five of the six middle-aged unaffected subjects in family F-40 carrying the V393I mutation exhibited a decline in insulin secretion and as a consequence are likely to be at increased risk of developing NIDDM. In this regard, the insulin secretory response observed in these five

subjects is very similar to that seen in the prediabetic members of the MODY pedigree with the Q268X mutation in *HNF-4 $\alpha$*  as they have normal insulin secretion rates at lower glucose levels but lower than normal rates at high glucose levels (25). The dominant-like transmission of diabetes in family F-40 may evoke undiagnosed MODY where several subjects may be non-penetrant. However, the large number of non-diabetic middle-aged subjects with the V393I mutation together with the observed decline in insulin/glucose ratio with age in these subjects, suggests that the inheritance of diabetes in family

Table II. Clinical and Biological Profile of Diabetic and Non-diabetic Carriers of the V393I Mutation in Family F-40

	Diabetic subjects	Non-diabetic subjects	P
Sex: male/female	2/2	2/4	—
Age (yr)	68 $\pm$ 13	36 $\pm$ 7	0.01
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.1 $\pm$ 3.0	23.3 $\pm$ 2.5	0.05
Age at diagnosis (yr)	45 $\pm$ 7	—	—
Systolic pressure (mmHg)	137 $\pm$ 15	130 $\pm$ 7	0.44
Diastolic pressure (mmHg)	80 $\pm$ 10	81 $\pm$ 3	0.86
Fasting glucose (mmol/liter)	9.4 $\pm$ 3.9	5.3 $\pm$ 0.7	0.02
Fasting insulin (mU/liter)	7 $\pm$ 5	6 $\pm$ 4	0.95
Triglycerides (mmol/liter)	1.50 $\pm$ 0.44	1.06 $\pm$ 0.47	0.20
Total cholesterol (mmol/liter)	5.31 $\pm$ 1.16	6.19 $\pm$ 1.32	0.52
HDL cholesterol (mmol/liter)	1.54 $\pm$ 0.28	1.64 $\pm$ 0.36	0.67
Creatinine ( $\mu$ mol/liter)	85 $\pm$ 21	66 $\pm$ 12	0.13
Treatment: diet/OHA (n)	1/3	—	—

Data expressed as mean $\pm$ SD. Statistics are Kruskal-Wallis test. BMI, body mass index; OHA, oral hypoglycemic agents.

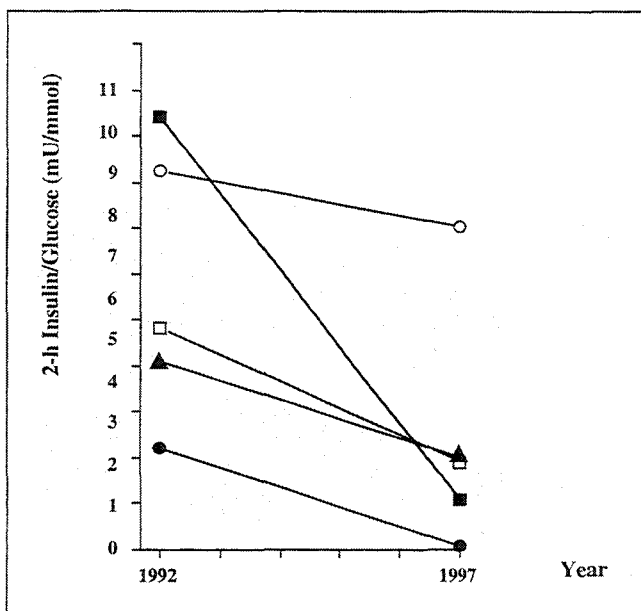


Figure 3. Five year evolution of insulin secretion in five non-diabetic family members who have inherited the V393I mutation. Data show the insulin/glucose ratio at 2 h during an oral glucose tolerance test. Family members are subjects 17 (open square), 18 (closed circle), 20 (closed square), 21 (open circle), and 22 (closed triangle).

A

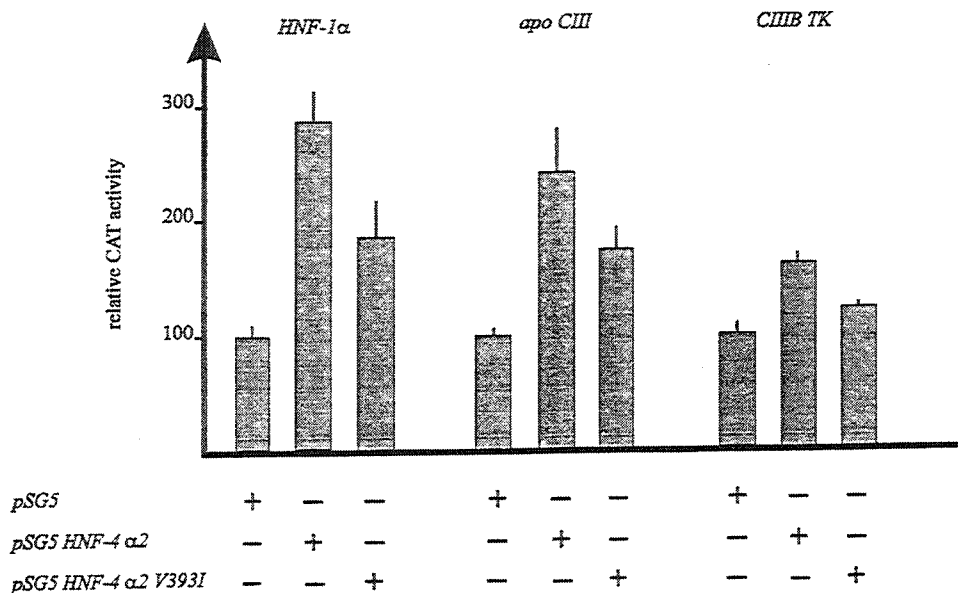
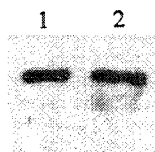


Figure 4. The effect of the V393I mutation on HNF-4 $\alpha$  transactivation activity. (A) Transactivation activity. The mutation effect was analyzed on three promoters: the human *apo CIII* (*apo CIII*), the mouse *HNF-1 $\alpha$*  (*HNF-1 $\alpha$* ), and the thymidine kinase promoter under the control of the HNF-4 $\alpha$  response element of the *apo CIII* gene promoter (*CIIB TK*). 100% corresponds to the basal activity of each promoter without co-transfected HNF-4 $\alpha$ . The error bars indicate the standard deviation of  $\beta$ -galactosidase normalized CAT activities from three experiments performed in triplicate. (B) Expression of wild-type and V393I mutant HNF-4 proteins. The amounts of wild-type (lane 1) and V393I (lane 2) HNF-4 proteins present in nuclear extracts of transfected COS-1 cells were determined by Western blotting using the specific anti-HNF-4 a445 antiserum. 5  $\mu$ g of nuclear proteins was loaded in each lane.

B



F-40 is multifactorial with the V393I mutation in HNF-4 $\alpha$  being one of the genetic factors involved.

The V393I substitution is located in the F domain of HNF-4 $\alpha$ , a region which in other members of the nuclear receptor superfamily is involved in modulating transactivation activity (26, 27). This domain exhibits a modulatory effect on the transactivation activity of HNF-4 $\alpha$  (28; Suaud, L., and B. Laine, unpublished data). The F domain is also adjacent to the activation function-2 activation domain (AF-2 AD) which represents a crucial module in the activation function-2 (AF-2) (28). In this regard, it has been reported for several nuclear receptors that the AF-2 AD module is involved in protein-protein interactions with coactivators or corepressors that are required for nuclear receptor transcription activity (for review see reference 29).

Genetic studies are beginning to provide a better understanding of the molecular basis of NIDDM. The identification of mutations in *HNF-4 $\alpha$*  in families with classical MODY (5, 30, 31) and in those believed to have the more common polygenic late-onset form of NIDDM (this report and reference 32) underscores the difficulties associated with the clinical classification of this disorder. The studies presented here suggest that the V393I mutation in *HNF-4 $\alpha$*  is probably the major genetic factor contributing to the development of NIDDM in the

F-40 pedigree. The later age at diagnosis of NIDDM observed in this family compared with a typical MODY family is likely a reflection of relative differences in the effects of various mutations on HNF-4 $\alpha$  activity. Severe mutations present as typical MODY and mild mutations as late-onset NIDDM. Interestingly, the natural history of the development of diabetes due to inheritance of either a severe or mild *HNF-4 $\alpha$*  mutation is quite similar in that there is a progression from normal to impaired to diabetic glucose tolerance. What distinguishes the two types of mutations is the age at onset of diabetes which is also presumably determined by nongenetic factors. For MODY, we believe the major factor triggering the development of diabetes is the insulin resistance associated with puberty. The factor(s) that triggers the development of diabetes in families such as F-40 is unknown; however, it may be similar to those that contribute to the development of late-onset polygenic NIDDM. Prospective studies of prediabetic subjects who have inherited the V393I mutation may lead to the identification of these factors and to a better understanding of all forms of late-onset NIDDM.

The *HNF-4 $\alpha$ /MODY1* V393I mutation described here is not sufficient to explain the observed evidence for linkage of NIDDM with the *MODY1* locus in our families, since it was found in only a single pedigree. However, we cannot exclude

that a second diabetes-predisposing locus lies in this chromosomal region. In summary, the present data are consistent with the role of HNF-4 $\alpha$  as a crucial regulatory factor in controlling integration of intracellular metabolic signals (33). Moreover, a relatively small impairment of its transactivation activity is associated with progressive alteration of glucose homeostasis. As HNF-4 $\alpha$  is an orphan receptor, it represents a potential target for specific drugs that could increase HNF-4 $\alpha$  activity, and thereby enhance expression of downstream genes, such as HNF-1 $\alpha$ /MODY1, in order to correct or prevent diabetes.

*Note added in proof:* While this paper was submitted, we have used the luciferase reporter instead of the CAT reporter. In these conditions, the *apo CIII* and HNF-1 $\alpha$  promoters were activated 18- and 8-fold by the wild-type HNF-4 $\alpha$ 2, respectively, versus 11- and 4-fold obtained with the V393I mutant HNF-4 $\alpha$ 2, respectively. Therefore, the reduction of the transactivation activity of the V393I mutant HNF-4 $\alpha$ 2 compared to that of the wild-type HNF-4 $\alpha$ 2 remains consistent and similar to that indicated in the manuscript.

## Acknowledgments

We thank our patients for participating in this study. We are grateful to P. Gallina for valuable efforts in collecting diabetic families and patient data. We are also indebted to S. Cereghini and N. Vu Duc for the generous gifts of mouse HNF-1 $\alpha$  and human *apo CIII* promoters, respectively. We thank S. Lasvergnes for technical assistance.

This work is supported by the BIOMED II program No. BMH4-CT950662. G.I. Bell is supported by the Howard Hughes Medical Institute and National Institutes of Health grants DK-20595 and DK-44840. P. Boutin is supported by Glaxo Wellcome. E.H. Hani and L. Suaud are supported by the Institut de Recherches Internationales Servier and the Région Nord-Pas-de-Calais and CHRU-Lille (grant 96500129), respectively. INSERM U459 belongs to and is supported by the IFR22 (CHRU- and the University-Lille2).

## References

- DeFronzo, R.A. 1988. The triumvirate,  $\beta$ -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*. 37:667-687.
- Hanis, C.L., E. Boerwinkle, R. Chakraborty, D.L. Ellsworth, P. Concannon, B. Stirling, V.A. Morrison, B. Wapelhorst, R.S. Spielman, K.J. Godolin-Ewens, et al. 1996. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat. Genet.* 13:161-166.
- Mahtani, M.M., E. Widen, M. Lehto, J. Thomas, M. McCarthy, J. Brayer, B. Bryant, G. Chan, M. Daly, C. Forsblom, et al. 1996. Mapping of a gene for type 2 diabetes associated with an insulin secretion defect by a genome scan in Finnish families. *Nat. Genet.* 14:90-94.
- Fajans, S.S. 1990. Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes Care*. 13:49-64.
- Yamagata, K., H. Furuta, N. Oda, P.J. Kaisaki, S. Menzel, N.J. Cox, S.S. Fajans, S. Signorini, M. Stoffel, and G.I. Bell. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*. 384:458-460.
- Froguel, P., H. Zouali, N. Vionnet, G. Velho, M. Vaxillaire, F. Sun, S. Lesage, M. Stoffel, J. Takeda, P. Passa, et al. 1993. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase: definition of a subtype of diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 328:697-702.
- Yamagata, K., N. Oda, P.J. Kaisaki, S. Menzel, H. Furuta, M. Vaxillaire, L. Southam, R.D. Cox, G.M. Lathrop, V.V. Boriraj, et al. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*. 384:455-458.
- Cereghini, S. 1996. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J.* 10:267-282.
- Matschinsky, F.M. 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic  $\beta$  cells and hepatocytes. *Diabetes*. 39:647-652.
- Vaxillaire, M., M. Rouard, K. Yamagata, N. Oda, P.J. Kaisaki, V.V. Boriraj, J.C. Chèvre, V. Boccio, R.D. Cox, G.M. Lathrop, et al. 1997. Identification of nine novel mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Hum. Mol. Genet.* 6:583-586.

- Frayling, T.M., M.P. Bulman, S. Ellard, M. Appelton, M.J. Dronsfield, A.D.R. Macckle, J.D. Baird, P.J. Kaisaki, G.I. Bell, S.C. Bain, and A.T. Hattersley. 1997. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes*. 46:720-725.
- Zouali, H., M. Vaxillaire, S. Lesage, F. Sun, G. Velho, N. Vionnet, K. Chiu, P. Passa, M.A. Permutt, F. Demenais, et al. 1993. Linkage analysis and molecular scanning of the glucokinase gene in NIDDM families. *Diabetes*. 42:1238-1235.
- Lesage, S., E.H. Hani, A. Philippi, M. Vaxillaire, J. Hager, P. Passa, F. Demenais, P. Froguel, and N. Vionnet. 1995. Linkage analyses of the MODY3 locus on chromosome 12q with late-onset NIDDM. *Diabetes*. 44:1243-1247.
- Zouali, H., E.H. Hani, A. Philippi, N. Demenais, J.S. Beckmann, F. Demenais, and P. Froguel. 1997. A susceptibility locus for early-onset non-insulin dependent (type 2) diabetes mellitus maps to chromosome 20q, proximal to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Hum. Mol. Genet.* 9:1401-1408.
- Ji, L., M. Malecki, H.J. Warram, Y. Yang, S.S. Rich, and A.S. Krolewski. 1997. New susceptibility locus for NIDDM is localized to human chromosome 20q. *Diabetes*. 46:876-881.
- Bowden, W.D., M. Sale, T.D. Howard, A. Qadri, B.J. Spray, C.B. Rothschild, G. Akots, S.S. Rich, and B.I. Freedman. 1997. Linkage of genetic markers on human chromosomes 20 and 12 to NIDDM in Caucasian sib pairs with a history of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 46:882-886.
- World Health Organization. 1985. World Health Organization Expert Committee on Diabetes Mellitus. Geneva WHO Org. *Technical Reports Series*. No. 727.
- Chartier, F.C., J.P. Bossu, V. Laudet, J.C. Fruchart, and B. Laine. 1994. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver. *Gene*. 147:269-272.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:7297-7301.
- Neumann, J.R., C.A. Morency, and K.O. Russian. 1987. A novel rapid assay for chloramphenicol acetyltransferase gene expression. *Biotechniques*. 5:444-447.
- Spegelaere, P., B. Van Hille, N. Spruyt, S. Faisst, J. Cornelis, and J. Rommelaere. 1991. Initiation of transcription for the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-ras oncogene. *J. Virol.* 65:4919-4928.
- Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11:1475-1489.
- Sladek, F.M., W. Zhong, E. Lai, and J.E. Darnell, Jr. 1990. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4:2353-2365.
- Delcourt, C., and L. Papoz. 1996. Les différents types de diabète en France métropolitaine. In *Le Diabète et ses Complications dans la Population Française*. INSERM Editions/France, Paris. 13-33.
- Byrne, M.M., J. Sturis, S.S. Fajans, J. Ortiz, A. Stoltz, M. Stoffel, C.J. Smith, G.I. Bell, J.B. Halter, and K.S. Polonsky. 1995. Altered insulin secretory responses to glucose in subjects with a mutation in the MODY1 gene on chromosome 20. *Diabetes*. 44:699-704.
- Montano, M.M., V. Müller, A. Trobaugh, and B.S. Katzenellenbogen. 1995. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol. Endocrinol.* 9:814-825.
- Tate, B.F., G. Allenby, J.R. Perez, A.A. Levin, and J.F. Grippo. 1996. A systematic analysis of the AF-2 domain of the human retinoic acid receptor alpha reveals amino acids critical for transcriptional activation and conformational integrity. *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J.* 10:1524-1531.
- Hadzopoulou-Cladaras, M., E. Kistanova, C. Evagelopolou, S. Zeng, C. Cladaras, and J.A. Ladias. 1997. Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* 272:539-550.
- Horwitz, K.B., T.A. Jackson, D.L. Bain, J.K. Richer, G.S. Takimoto, and L. Tung. 1996. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol. Endocrinol.* 10:1167-1177.
- Bulman, M.P., M.J. Dronsfield, T. Frayling, M. Appelton, S.C. Bain, S. Ellard, and A.T. Hattersley. 1997. A missense mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in a UK pedigree with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia*. 40:859-862.
- Furuta, H., N. Iwasaki, N. Oda, Y. Hinokio, Y. Horikawa, K. Yamagata, N. Yano, G. Sugahiro, M. Ogata, H. Ohgawara, et al. 1997. Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor 4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes*. 46:1652-1657.
- Moller, A.M., S.A. Urhammer, L.T. Dalgaard, R. Reneland, L. Berglund, T. Hansen, J.O. Clausen, H. Lithell, and O. Pedersen. 1997. Studies of the genetic variability of the coding region of the hepatocyte nuclear factor 4 alpha in Caucasians with maturity-onset NIDDM. *Diabetologia*. 40:980-983.
- Kuo, C.J., P.B. Conley, L. Chen, F.M. Sladek, J.E. Darnell, Jr., and G.R. Crabtree. 1992. A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature*. 355:457-461.

⇒ Résultats complémentaires :

Les propriétés de liaison à l'ADN de HNF-4  $\alpha$ 2 et du mutant HNF-4  $\alpha$ 2 V393I (Figure 17) ont été analysées par gel retard avec l'élément de réponse de HNF-4 présent sur le promoteur de l'apoCIII (CIIIB). HNF-4  $\alpha$ 2 et V393I possèdent les mêmes activités de liaison à l'ADN. En effet les complexes formés de la sonde marquée au  $^{32}$ P et de la protéine sauvage ou mutée donnent des bandes de même intensité.

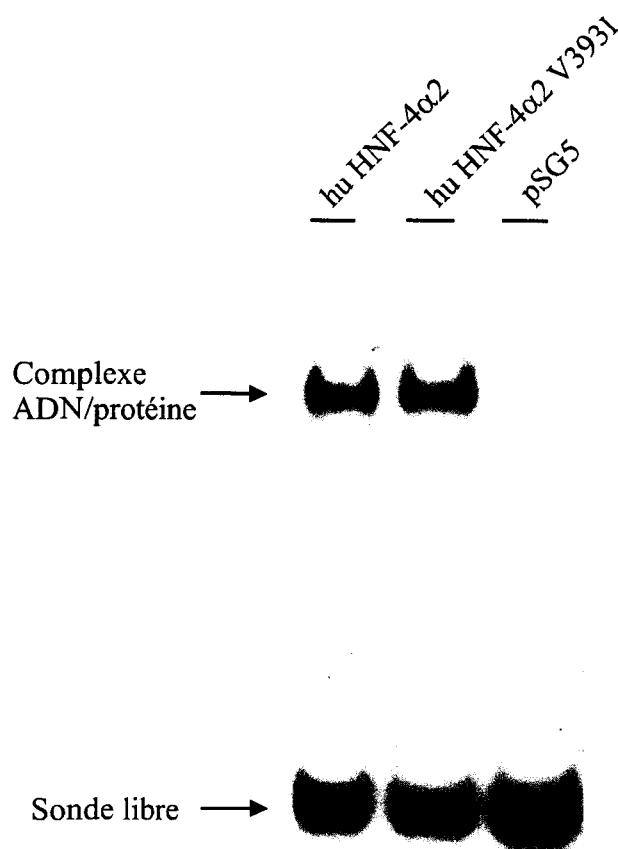


Figure 17. Liaison à l'ADN de HNF-4 sauvage et muté. 0.2ng de sonde (CIIIB) marquée au  $^{32}$ P est complexé avec 3 $\mu$ g de protéines nucléaires contenant HNF-4  $\alpha$ 2 ou muté (V393I) pendant 1h à 4°C. Ces complexes sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (5%) non dénaturant en tampon TAE 1x à 150V pendant 150 minutes. Les protéines nucléaires sont extraites de cellules COS-1 transfectées avec les plasmides pSG5 HNF-4  $\alpha$ 2 sauvage, muté, ou vide.



## 2.2 Etudes des mutants T130I et V255M :

⇒ Liaison à l'ADN :

Les propriétés de liaison à l'ADN de HNF-4  $\alpha$ 2 (WT) et T130I, V255M ont été analysées par gel retard avec l'élément de réponse de HNF-4 présent sur le promoteur de HNF-1 (HNF-1A). Les résultats de la figure 18, montrent que HNF-4  $\alpha$ 2 sauvage (WT), T130I et V255M possèdent les mêmes activités de liaison à l'ADN. En effet les complexes formés de la sonde marquée au  $^{32}\text{P}$  et de la protéine sauvage ou mutée donnent des bandes de même intensité (comparer les couloirs 1 avec 4 et 7 avec 10). Ces complexes formés avec HNF-4 WT ou ses mutants sont déplacés de manière similaire en présence d'un excès de sonde froide (excès de 5 fois : couloirs 2, 5, 8, 11 ; excès 10 fois : couloirs 3, 6, 9, 12).

⇒ Activité transactivatrice :

L'activité de transactivation de HNF-4  $\alpha$ 2 sauvage et des mutants a été déterminée par transfection transitoire dans les cellules C33. Les transactivations obtenues avec HNF-4  $\alpha$ 2 T130I et V255M sont similaires à celle obtenue avec HNF-4  $\alpha$ 2 sauvage (WT) sur les promoteurs de l'apoCIII et de HNF-1 (Figure 19). Des résultats identiques sont obtenus en cellules COS-1. Les protéines sauvages et mutées sont exprimées de la même manière dans les cellules COS-1 comme le montre le Western blot révélé avec l'anticorps  $\alpha$ 455 HNF-4 $\alpha$  (Figure 20).

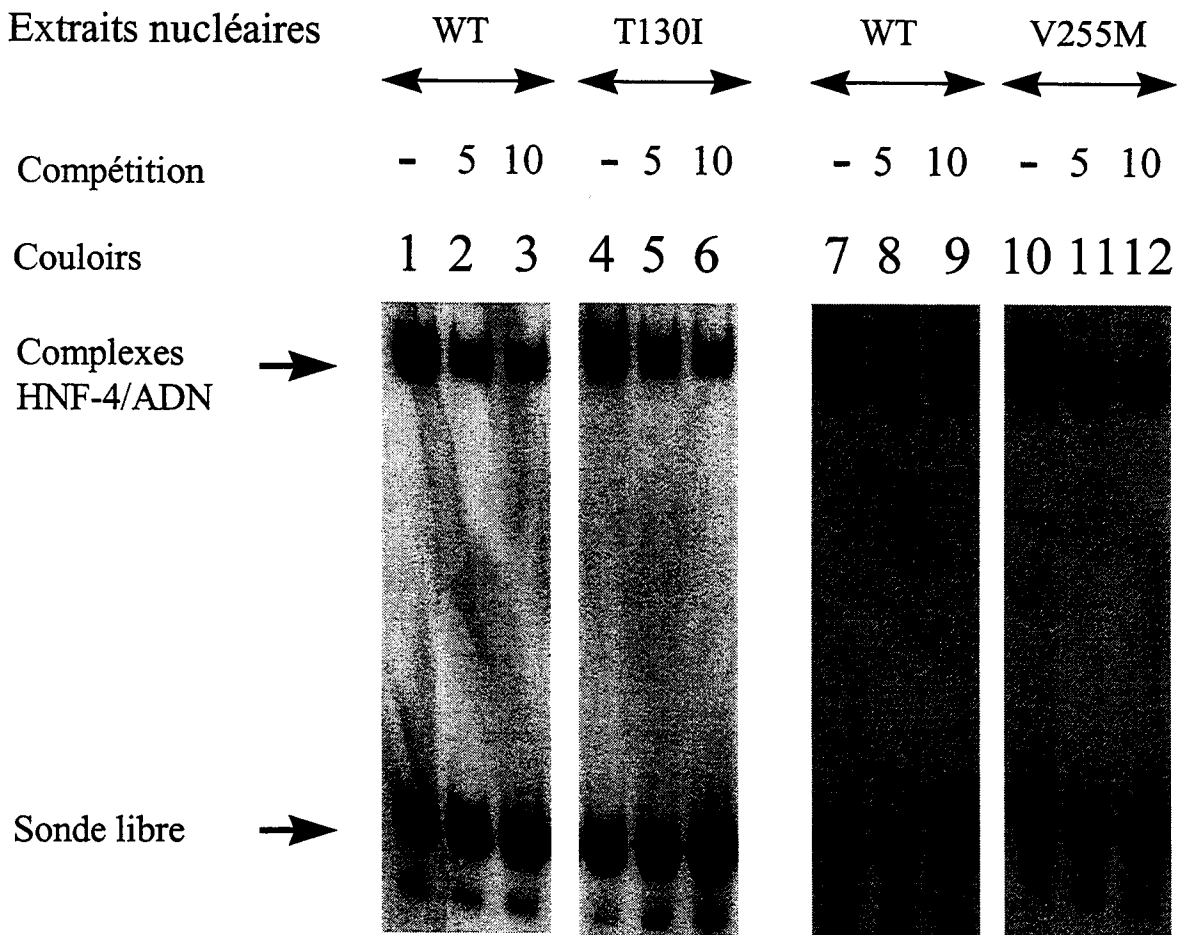


Figure 18. Liaison à l'ADN de HNF-4 sauvage (WT) et de ses mutants T130I et V255M. 0.2ng de sonde (HNF-1A) marquée au  $^{32}\text{P}$  est complexé avec 3 $\mu\text{g}$  de protéines nucléaires pendant 1h à 4°C. Le compétiteur froid (HNF-1A) est ajouté en excès molaire de 5 à 10 fois. Ces complexes sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (5%) non dénaturant en tampon TAE 1x à 150V pendant 150 minutes. Les protéines nucléaires sont extraites de cellules COS-1 transfectées avec les plasmides pCDNA HNF-4  $\alpha 2$  sauvage et mutés.



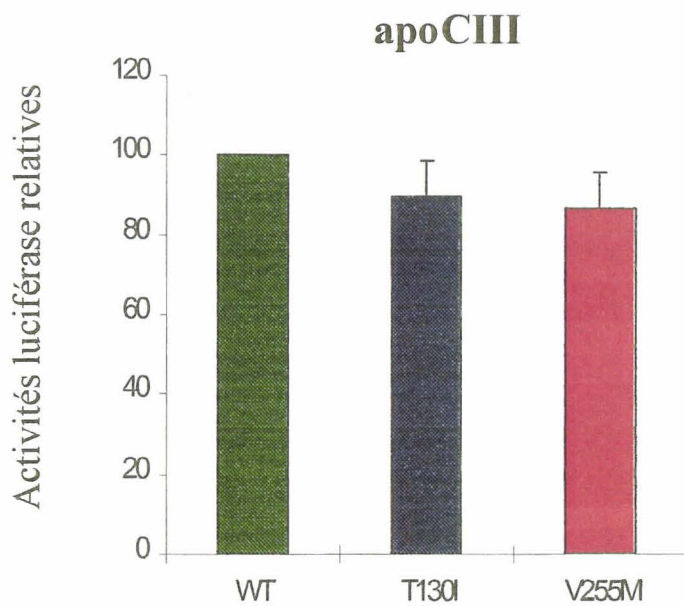
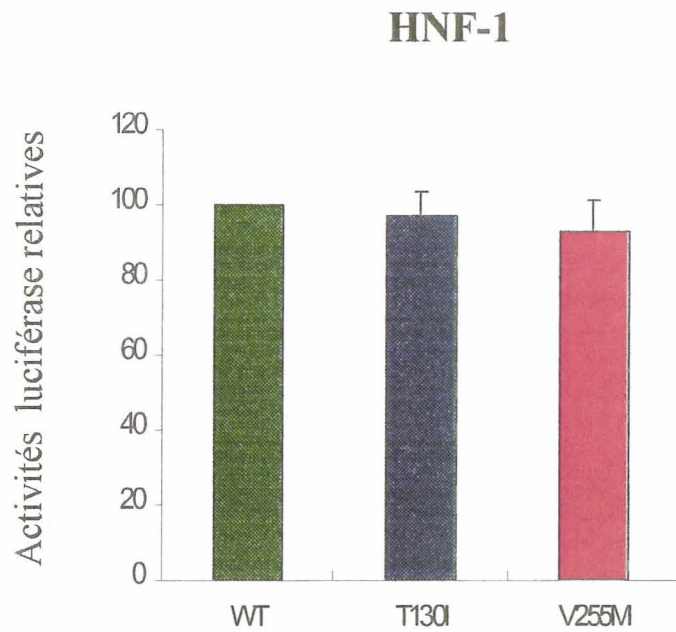


Figure 19. Comparaison des activités transcriptionnelles de HNF-4  $\alpha 2$  sauvage (WT) et de ses mutants T130I et V255M sur les promoteurs naturels de l'apoCIII humain et HNF-1 de souris. Ces promoteurs (500ng) ont été transfectés dans les cellules C33 ( $2 \times 10^5$  cellules) avec 100ng de vecteur d'expression (pcDNA HNF-4  $\alpha 2$ , T130I et V255M). Les valeurs sont normalisées par l'activité  $\beta$ -galactosidase. Les écart-types sont indiqués par les barres d'erreur.

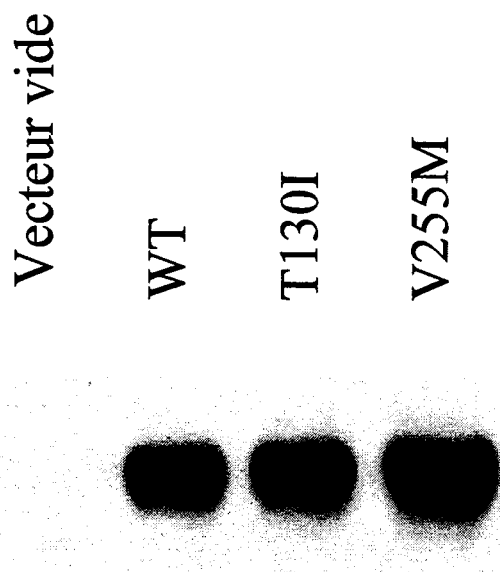


Figure 20. Western blot. Les cellules COS-1 ont été transfectées avec 10 $\mu$ g de vecteur codant pour HNF-4  $\alpha$ 2 et pour ses mutants T130I ou V255M. Les protéines nucléaires (3 $\mu$ g) ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et sont transférées sur une membrane PDVF. Les protéines HNF-4 $\alpha$  ont été détectées à l'aide d'un anticorps HNF-4  $\alpha$ 455 (Sladek *et al.* 1990) comme l'a décrit (Hani *et al.* 1998).

### 2.3 Etude de la mutation HNF-4 $\alpha$ E276Q :

Nous avons aussi étudié les propriétés de liaison à l'ADN et de transactivation de ce mutant. Comme nous l'avons vu dans la revue générale, la famille de facteurs de transcription COUP-TFs est souvent en compétition avec HNF-4 $\alpha$  pour la fixation sur les éléments de réponse présents au niveau de promoteurs de gènes cibles. Dans ce cas, HNF-4 $\alpha$  est un activateur et COUP-TFs sont des répresseurs de la transcription. Ktistaki *et al* ont montré que COUP-TFs ne se fixent pas sur l'élément de réponse de HNF-4 (HNF-1A) sur le promoteur de HNF-1. Dans ce cas, COUP-TFs peuvent coopérer avec HNF-4 via une interaction protéine-protéine pour augmenter fortement l'activité transcriptionnelle due à HNF-4. Cette interaction se fait au niveau de la région comprenant les résidus d'acides aminés 227 à 271 de HNF-4 $\alpha$  (Ktistaki et Talianidis, 1997b).

Notre objectif a été de déterminer si la mutation E276Q, qui entraîne un changement de charge et se situe près de la région 227-271, pouvait modifier l'interaction entre HNF-4 et COUP-TFII et donc modifier la synergie de l'activité transcriptionnelle médiée par ces deux facteurs.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication soumise à Diabetes.

⇒ The E276Q mutation in HNF-4 alpha gene which cosegregates with the MODY 1 form of diabetes results in an impaired synergistic enhancement of HNF-4 transactivating activity by COUP TFII.

SUAUD Laurence, HEMINOU Youcef, FORMSTECHEP Pierre et LAINE Bernard

**The E276Q mutation in HNF-4 alpha gene which cosegregates with the MODY 1 form of diabetes results in an impaired synergistic enhancement of HNF-4 transactivating activity by COUP TFII.**

Running title : impaired function of E276Q mutant HNF-4

SUAUD Laurence, HEMIMOU Youcef, FORMSTECHEP Pierre and LAINE Bernard <sup>§</sup>

Unité 459 INSERM, Laboratory of Cell Biology, University of Medicine H. Warembourg, LILLE, France

<sup>§</sup> corresponding author : LAINE B.

U 459 INSERM, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université H. Warembourg

1 Place de Verdun, F 59045 LILLE France

Tel. 0320626951 ; Fax : 0320626884 ; e-mail : blaine@lille.inserm.fr

Keywords : HNF-4 $\alpha$ , MODY, COUP TFII, HNF-1

Abbreviations : DR, direct repeat ; COUP TFs, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors ; EMSA, electrophoretic mobility shift analysis ; HNF, hepatocyte nuclear factor ; HNF-1 $\alpha$  = HNF-1 ; HNF-1 $\beta$  = vHNF-1 ; MODY, maturity-onset diabetes of the young ; PCR, polymerase chain reaction

**ABSTRACT**

Seven mutations in the hepatocyte nuclear factor HNF-4 $\alpha$  gene have been shown to correlate with type 1 of maturity onset diabetes of the young (MODY 1), a monogenic form of non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). Up to now, only the functional properties of two MODY 1 HNF-4 $\alpha$  mutants, E268X and V393I, have been investigated to address how the mutations in HNF-4 $\alpha$  gene, found by genetic studies, can give rise to impaired activities of mutated HNF-4 $\alpha$  proteins and can cause this disease. The E276Q mutation results in a non-conservative substitution occurring in the HNF-4 $\alpha$  E domain which is involved in dimerization and transactivation activities as well as in protein-protein interactions with other transcription factors or coactivators. Using the mutated human HNF-4 $\alpha$ 2, we have found that, in the absence of COUP TFII, the E276Q substitution does not affect significantly the DNA-binding, dimerization and transactivating activities of HNF-4 $\alpha$ , at least on the promoters studied here. On the other hand, in the presence of COUP TFII, this substitution impairs the enhancement of HNF-4-mediated activation of HNF-1 promoter. This impaired synergy results from an altered interaction between these two nuclear receptors. HNF-1 expression plays a crucial role in transactivation of insulin promoter and of numerous genes coding for enzymes involved in glucose homeostasis. Therefore its down regulation, resulting from the E276Q mutation in HNF-4 $\alpha$  gene, is expected to impair the function of  $\beta$  pancreatic cells.

## INTRODUCTION

Maturity onset diabetes of the young (MODY) is a monogenic form of non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) characterized by an early onset (usually before 25 years) and an autosomal dominant mode of inheritance. MODY is also characterized by a primary defect in glucose-stimulated insulin secretion (1). Three genes have been shown to be associated with MODY, they include the Hepatocyte Nuclear Factor-4 alpha (HNF-4 $\alpha$ )/MODY 1 gene on chromosome 20q, the glucokinase/MODY 2 gene on chromosome 7p and the Hepatocyte Nuclear Factor-1 alpha (HNF-1 $\alpha$ )/MODY 3 gene chromosome 12q (1). The association with MODY of two additional genes, coding for insulin protein factor 1 (IPF 1) and HNF-1 $\beta$  (also called vHNF-1), (2,3) remains under debate (4-7). Seven mutations in HNF-4 $\alpha$  gene have been shown to cosegregate with the MODY 1. They include two nonsense mutations, Q268X and R154X, generating truncated HNF-4 $\alpha$  proteins (8,9) and five missense mutations resulting in either the two conservative substitutions V255M and V393I (10,11) or in the three non-conservative substitutions T130I, R127W and E276Q (10,12,13).

The transcription factor HNF-4 is a member of the steroid/thyroid hormone nuclear receptor family (14). In human, it comprises a set of  $\alpha$  isoforms, which are the products of alternative splicing of the same mRNA, and the  $\gamma$  isoform which is the product of an other gene (12,15,16). A perfect correlation has been shown between HNF-4 $\alpha$  expression and differentiation of hepatic and enterocytic-like cells (17,18). Furthermore, involvement of HNF-4 $\alpha$  in cell differentiation has been confirmed in hepatic cells using stable transfection of HNF-4 $\alpha$  (19). HNF-4 $\alpha$  plays also a crucial role in embryogenesis (20,21). As reviewed in (22), HNF-4 $\alpha$  activates numerous genes which play essential roles in cholesterol, fatty acid and glucose metabolisms. In addition, HNF-4 occupies a key position in the hierarchy of transcription factors since it represents the major activator of HNF-1 $\alpha$  gene (21,23), which is required for the expression of genes in liver, intestine, kidney and pancreatic islets (24), four tissues where HNF-4 $\alpha$  is also expressed (14,25). HNF-4 $\alpha$  forms a homodimer which binds DNA sequences referred to Direct Repeat 1 (DR1) response elements (26). Phosphorylation affects the DNA-binding and the transactivation potential of HNF-4 $\alpha$ 1 (27-29). On most promoters, *i.e.* apolipoprotein promoters, HNF-4 $\alpha$  response elements are also bound by the two nuclear receptors COUP TFs (COUP TFI and COUP TFII also called ear 3 and ARP-1, respectively), which often behave as transcriptional repressors. As a result, HNF-4 $\alpha$  and COUP TFs have opposite transcriptional effects, most probably mediated by direct competition for the same responsive elements (30,31).

On the other hand, on the HNF-1 $\alpha$  promoter which is recognized by HNF-4 but not by COUP TFs, COUP TFs enhance HNF-4 $\alpha$  activity by a mechanism involving their physical interaction (32).

Up to now, only the functional properties of two MODY 1 HNF-4 $\alpha$  mutants have been investigated to address how the mutations in HNF-4 $\alpha$  gene, found by genetic studies, can give rise to impaired activities of mutated HNF-4 $\alpha$  proteins. First, we have shown that the mutation V393I results in a marked decrease of transactivation activity of human HNF-4 $\alpha$ 2, the most abundant  $\alpha$  isoform at least in liver, enterocytic-like cells and pancreatic islets (11). Second, the Q268X mutation, resulting in a truncated protein lacking part of domain E, has lost its transcriptional transactivating activity (33) and is not translocated to the nucleus (34). Furthermore, Stoffel and Duncan (33) showed that loss of HNF-4 $\alpha$  function in embryoid bodies results in decreased expression of HNF-4 target genes involved in glucose-dependent insulin secretion pathway, thus providing direct evidence that HNF-4 $\alpha$  is critical for maintaining glucose homeostasis and implying that defects in the HNF-4 $\alpha$  gene may contribute to the development of the MODY 1 form of NIDDM.

The mutation E276Q is localized in the E domain which is involved in several functions such as dimerization, activation via the activation function 2 (AF-2) and protein-protein interaction with COUP TFs and nuclear receptors coactivators. In this paper, we have investigated the effects of the mutation E276Q on the functional properties of HNF-4 $\alpha$ .

#### RESEARCH DESIGN AND METHODS

Plasmid constructions : The mutant E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 was generated from the human HNF-4 $\alpha$ 2 cDNA (15) cloned in the pcDNA3 (Invitrogen), by the mutagenesis strategy previously used to generate the V393I HNF-4 $\alpha$ 2 mutant (11). The sense primer 5' GACAATCAGTATGCGTACCTCAA contained the G-C mutation at position 7 to generate the E276Q substitution and the translationally silent mutation C-G at position 15 to introduce a *Rsa I* restriction site to aid in screening for mutated clones. The antisense primer 5'ATCGATCTGCAGCTCCTGGAAG corresponded to the wild-type sequence. The COUP TFII PMT2 plasmid is a gift from Karathanasis (35). A fragment encompassing the full-length COUP TFII cDNA was prepared by PCR with primers 5'TGAGTCGACATGGCAATGGTAGTCAGC and 5'GCTCTAGATTATTGAATTGCCATATACG and the Advantage-GC PCR kit from Clontech. To generate the pGEX-COUP TFII construct, the full-length COUP TFII cDNA was then inserted in the *SaII* and *XbaI* sites of the pGEX 2TK vector (Pharmacia) in which a double-



stranded oligonucleotide having the sequence *SalI-HindIII-XbaI* restriction sites had been previously inserted in the *BamHI-EcoRI* sites. The full-length human HNF-4 $\alpha$ 2 cDNA has been prepared by PCR using the pUC 19 forward primer and the primer CGTAAGCTTTCTAGACCCAGCGGCTTGCTAGAT and inserted in the *SalI/XbaI* sites of the pQE9 vector (Qiagen) to generate the pQE9 HNF-4 $\alpha$ 2 plasmid. All PCR to prepare the above mentioned cDNA were performed using the *Pfu* DNA polymerase (Stratagene).

The human apolipoprotein CIII, named apoCIII, (-1400/+21) and mouse HNF-1 (-281/+14) promoters were cloned in the pGL3 luciferase reporter vector (Promega). Double-stranded kinased oligonucleotides encompassing the HNF-4 responsive element from rat HNF-1 gene (HNF-1A, nucleotides -70 to -41) were cloned upstream of the TATA box in the TATA Luc vector (36) to generate construct HNF-1A-TATA.

Cell culture and transient transfection assays. COS-1 cells ( $2 \times 10^5$  cells per 3.5 cm dishes) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and containing 4.5 g/l glucose. Cells were transfected by the polyethyleneimine method (Euromedex, France) using 500 ng of reporter plasmid and 100 ng of HNF-4 $\alpha$  and/or COUP TFII expression vectors according to (37). To normalize for the differences in transfection efficiencies a CMV-driven  $\beta$  GAL expression plasmid was transfected simultaneously. Luciferase assays were performed as in (38).

Electrophoretic Mobility shift assays (EMSA). EMSA were performed as previously described (39) with oligonucleotides encompassing CIIIB and HNF-1A binding sites as probes.

In vitro protein-protein interaction assays. Growth and expression of glutathione S-transferase COUP TFII (GST-COUP TFII) and HisTag HNF-4 $\alpha$ 2 in bacterial strains JM 109 and M15, respectively, were performed as previously described (40). GST-COUP TFII :HNF-4 interaction was studied by pull-down assays as in (32). GST-COUP TFII was bound to glutathione-Sepharose beads in buffer IPAB 100 [20 mmol/l HEPES pH 7.8, 100 mmol/l KCl, 5mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP 40, 10% glycerol (vol/vol)] in the presence of 0.02 mg/ml bovine serum albumin (BSA) and of 0.5mmol/l phenylmethylsulfonide fluoride plus 1mg/l aprotinin. <sup>35</sup>S-labeled wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 were synthesized *in vitro* from the corresponding pcDNA3 constructs using TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega) according to the manufacturer's recommendations. A 7 $\mu$ l aliquot of the labeled HNF-4 was incubated at 4°C for 4 hours and with constant agitation with bound GST-COUP TFII in the same buffer. After extensive washing in IPAB 100 containing

the above mentioned proteases inhibitors, beads and input-labeled proteins were subjected to SDS-PAGE.

Pull-down assays to compare dimerization of wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 were performed as indicated in (41) with the following modifications. Ni-NTA resin (Qiagen) was coated with HisTag HNF-4 $\alpha$ 2 obtained pure by chromatography on a Ni-NTA column and the buffer used to immobilize the protein contained 10 mmol/l imidazole. After extensive washing in immobilizing buffer, the resin was incubated with *in vitro* synthesized <sup>35</sup>S-labeled wild-type or E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 for 1 hour at 4°C with constant agitation. After extensive washing, bound proteins were analyzed by SDS-PAGE. Input and bound proteins were visualized by autoradiography or with a PhosphorImager apparatus (Molecular Dynamics). As controls, we have checked that labeled HNF-4 was not bound neither to Ni-NTA resin which has not been coated with HisTag HNF-4 nor on Ni-NTA resin coated with HisTag bacterially produced by the empty pQE9 vector.

Protease mapping. <sup>35</sup>S-labeled wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 were synthesized *in vitro* (see above) and 2  $\mu$ l aliquots were digested with the indicated amounts of endoproteinase Lys-C (Boehringer-Mannheim) for 20 min at 37°C. Digests were resolved on a 12% SDS-PAGE and peptides were visualized by autoradiography.

## RESULTS

**The E276Q substitution does not affect DNA-binding and dimerization activities of HNF-4 $\alpha$ 2 protein.** The correlation between the E276Q missense mutation in HNF-4 $\alpha$  gene and MODY 1 in a UK pedigree led us to analyze how the resulting non-conservative E276Q substitution affects the properties of the HNF-4 $\alpha$ 2 protein. First, we investigated DNA-binding and dimerization activities which are both crucial features in the function of this nuclear receptor. DNA-binding activity was studied by EMSA on the two HNF-4 responsive elements present in HNF-1 and apoCIII promoters called HNF-1A and CIIIB, respectively (23,30). Results depicted in Fig. 1A did not show differences in DNA-binding activities between wild-type and E276Q mutated HNF-4 $\alpha$ 2 since complexes formed between <sup>32</sup>P-labeled DNA and wild-type or mutated proteins gave bands of similar intensities (compare lanes 2 and 3 on HNF-1A and lanes 6 and 7 on CIIIB binding sites).

Dimerization activities were analyzed in the presence as well as in the absence of DNA. Dimerization activities in the presence of DNA were examined by EMSA in monitoring the formation of heterodimers between wild-type or E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 and a truncated HNF-4 $\alpha$ 2

lacking the C-terminal F domain ( $\Delta F$ ) using a procedure previously described (26,42). When HNF-4 $\alpha$   $\Delta F$  was mixed with either wild-type or E276Q HNF-4 $\alpha 2$  in the presence of the HNF-1A binding site, in addition to complexes formed with each one of the proteins as visualized in lanes 1, 3 and 5 in Fig. 1B, a complex with intermediate electrophoretic mobility corresponding to the heterodimer wild-type HNF-4 $\alpha 2$ -HNF-4 $\alpha$   $\Delta F$  (lane 2) or E276Q HNF-4 $\alpha 2$ -HNF-4 $\alpha$   $\Delta F$  (lane 4) was observed. Bands corresponding to these heterodimers exhibited similar intensities, indicating that there is no difference in dimerization activities in the presence of DNA between wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha 2$  proteins. Similar results were obtained with the CIIIB site (data not shown). Dimerization activities in the absence of DNA were studied in comparing abilities of labeled wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha 2$  to form a dimer with His Tag HNF-4 $\alpha 2$  which has been previously bound to Ni-NTA beads. Wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha 2$  which had formed dimers with the immobilized His Tag HNF-4 $\alpha 2$  gave bands with similar intensities (Fig. 1C), indicating that the E276Q substitution does not affect the dimerization activity of HNF-4 $\alpha$  in the absence of DNA.

**The E276Q substitution does not affect the transactivating activity of HNF-4 $\alpha$  but results in an impaired synergy of HNF-4 $\alpha$  and COUP TFII on the HNF-1 promoter.** Next, we compared transactivating activities of wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha 2$  on two natural promoters HNF-1 and apoCIII. Wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha 2$ , which were similarly expressed in COS 1 cells as evidenced by Western blot revealed with the  $\alpha 445$  HNF-4 $\alpha$  antiserum (14) (Fig. 2A), exhibited the same transactivating activities on the HNF-1 promoter (Fig. 2B). Only a slightly weaker transactivation of the apoCIII promoter was observed with the E276Q HNF-4 $\alpha 2$  by comparison with the wild-type protein (Fig. 2B). Since COUP TFs have been shown to act as auxiliary cofactors for HNF-4 $\alpha$  on the HNF-1 promoter (32), we investigated the effect of the E276Q substitution on the synergy between COUP TFII and HNF-4 $\alpha$ . As expected from the data of Ktistaki and Talianidis (32), when transfected alone, COUP TFII, which did not bind to the HNF-1A responsive element (Fig. 1A, lane 4), did not modulate HNF-1 promoter activity (Fig. 2B). When COUP TFII was cotransfected with HNF-4 $\alpha 2$ , the wild-type HNF-4 $\alpha 2$ -mediated activation of the HNF-1 promoter was further enhanced five-fold (from 3- to 16-fold, Fig. 2B). On the other hand, the enhancement of the E276Q HNF-4 $\alpha 2$ -mediated activation of the HNF-1 promoter by COUP TFII was only equal to 2.5-fold (from 3- to 7.5-fold, Fig. 2B), indicating that the synergy between HNF-4 $\alpha 2$  and COUP TFII was impaired by the E276Q substitution. As a control, we performed the same experiments with the apoCIII promoter which is known to be repressed by COUP TFs via binding of these latter transcription factors to the CIIIB binding site

(30,31). As expected, COUP TFII, which bound to CIIIB responsive element (Fig. 1A, lane 8), repressed the wild-type as well as the E276Q HNF-4 $\alpha$ 2-mediated activation of the apoCIII promoter (Fig. 2B). Note that the activations of the apoCIII promoter by wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 were repressed by about the same extent by COUP TFII (2.2-fold repression).

We next investigated whether the reduced synergy between COUP TFII and HNF-4 $\alpha$ 2 resulting from the E276Q substitution on the HNF-1 promoter is also observed on a heterologous promoter where the HNF-1A responsive element is placed upstream from the TATA box. Wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 similarly activated (seven-fold activation) the HNF-1A-TATA promoter. On the other hand, the enhancement of these activations by COUP TFII differed : wild-type HNF-4 $\alpha$ 2-mediated activation was further enhanced four-fold whereas E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 mediated activation was further enhanced 1.7-fold (Fig. 2B).

Since the enhancement of HNF-4 $\alpha$  activity by COUP TFs was shown to be mediated by a mechanism involving their physical interaction (32), we further investigated whether the reduced synergy resulted from an impaired interaction between COUP TFII and E276Q HNF-4 $\alpha$ . To this aim, we compared the interaction between GST-COUP TFII bound to GST-Sepharose beads and labeled wild-type or E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 by pull-down experiments. Compared to wild-type HNF-4 $\alpha$ 2, the E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 bound poorly to COUP TFII (Fig. 3) and quantification of the bands actually indicated that affinity of E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 for COUP TFII was decreased by 50%. We next investigated whether this decreased interaction resulted from an altered conformation of the E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 protein in monitoring peptide maps of wild-type and mutated HNF-4 $\alpha$ 2 following limited proteolysis. Limited proteolysis experiments did not reveal any differences between wild-type and mutated HNF-4 $\alpha$ 2 (Fig. 4), suggesting that the E276Q substitution does not alter grossly HNF-4 $\alpha$  conformation.

## DISCUSSION

In wild-type HNF-4 $\alpha$ , the glutamic acid residue at position 276 is conserved in species widely remote from human such as *Drosophila* and *Xenopus* (21,43), thus supporting that this residue plays a crucial role in the function of the protein. The E276Q substitution is located in the E domain which is involved in the dimerization of the protein, an activity that plays a crucial role in HNF-4 $\alpha$  function since full-length HNF-4 $\alpha$  only binds to DNA as a dimer (26). In addition, this substitution is located in the activation domain AF-2 which requires the 128-369 sequence for full activity (42). However, in the absence of COUP TFII, our results did not show differences

between wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 in DNA-binding, dimerization and transactivating activities on apoCIII and HNF-1 promoters. Nevertheless, we cannot exclude that more dramatic effects in transactivating activities will occur on other promoters. On the other hand, in the presence of COUP TFII, this substitution appears to significantly decrease the interaction and, consequently, the synergy between HNF-4 $\alpha$ 2 and COUP TFII on the HNF-1 promoter. According to Ktistaki and Talianidis, COUP TFs interact within the 227-271 sequence of HNF-4 $\alpha$  (32), our results indicate that the glutamic acid residue at position 276 is also involved in interaction and transcriptional synergy with COUP TFII. Our protease mapping results depicted in Fig. 4 suggest that the E276Q substitution does not alter the conformation of HNF-4 $\alpha$ , which is in agreement with the secondary structure predicted by Chou-Fasman, Levin et al, Deléage et al and Gibrat et al algorithms (data not shown). The wild-type HNF-4 $\alpha$ -COUP TFII interaction may involve an ionic bond between the glutamic acid residue at position 276 in HNF-4 $\alpha$  and a basic residue in COUP TFII and the decreased interaction observed with the E276Q mutant would result from loss of this ionic bond.

Glucose entry into the pancreatic  $\beta$  cells and glycolysis are two important steps in the regulation of insulin secretion (44). A recent study showed that loss of HNF-4 $\alpha$  function in visceral endoderm results in impaired expression of glucose transporter 2 (GLUT 2), aldolase B, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and liver pyruvate kinase (L-PK) (33). In this experiment, the L-PK gene is most likely extinguished via a direct mechanism since it contains an HNF-4 response element (25) whereas down-regulations of the other genes might involve indirect mechanisms since, so far, no HNF-4 responsive elements have been identified in their promoters. Additional enzymes have been shown to be involved in glucose metabolism, including glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase (45). The promoters of the genes coding for at least two of these enzymes (glucokinase and PEPCK) contain also an HNF-4 responsive element (45). It will be of interest to determine whether their transactivations by HNF-4 $\alpha$  are affected by the E276Q substitution. HNF-4 $\alpha$  is also a key regulator of the transcription factor HNF-1 (21,23,46). It has been documented that HNF-4 $\alpha$  deficient rat embryoid bodies (EBs) show only a moderate decrease in HNF-1 expression when compared to control EBs (33). Even though visceral endoderm, contained in embryoid bodies, displays many characteristics of both liver and endocrine pancreas and can be used to analyze HNF-4 $\alpha$  regulated gene expression (47), it does not exactly represent human fully differentiated pancreatic islets where a more important control

of HNF-1 expression by HNF-4 $\alpha$  may occur. Furthermore, this moderate decrease in HNF-1 expression in rat EBs may be due to species differences since Stoffel and Duncan mentioned that, in contrast to humans, HNF-4 +/- mice show no signs of diabetes and exhibit normal glucose tolerance (33). In fact, HNF-1 activates numerous genes including genes involved in glucose metabolism such as aldolase B, PEPCK and L-PK (45) and a recent study showed that HNF-1 deficient mice exhibit a decreased insulin expression in pancreatic  $\beta$  cells and develop non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), thus strongly supporting the involvement of impaired HNF-1 expression in this disease (48). So considering that endocrine pancreatic cells express relatively low amounts of HNF-4 $\alpha$ , the enhancement of HNF-4 $\alpha$  activity by the ubiquitously expressed COUP TFII (49) must be crucial to ensure a sufficient expression of HNF-1. Consequently, the impaired enhancement of HNF-4 activity due to the E276Q mutation most probably limit the expression of HNF-1 and of its target genes in  $\beta$  pancreatic cells. Therefore, a decreased expression of insulin in Langerhans islets resulting from an impaired HNF-1 expression likely represents a molecular mechanism by which the E276Q HNF-4 $\alpha$  mutation observed in MODY 1 patients leads to the onset of non-insulin dependent diabetes mellitus. Furthermore, Ktistaki and Talianidis have shown that the synergy between HNF-4 $\alpha$  and COUP TFs is also encountered on other promoters which bind HNF-4 $\alpha$  but not COUP TFs (32), and one may expect that the HNF-4 $\alpha$  E276Q mutation will impair expression of such promoters having a role in glucose homeostasis.

Acknowledgments. The authors are indebted to S. Cereghini, S. Karathanasis and P. Lefebvre for providing the mouse HNF-1 promoter, the COUP TFII cDNA and COUP TFII antibodies and the TATA box-pGL3 plasmid, respectively. They kindly acknowledge P. Lefebvre for critically reading the manuscript. Inserm U 459 belongs to and is supported by IFR 22 (CH et U de LILLE, Centre Oscar Lambret, Inserm and Université de Lille II). This work was supported by a grant from ALFEDIAM-NOVO NORDISK to Suaud L. Suaud L. is a fellowship of the grant 96500129 from the Région Nord-Pas de Calais and the Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille.

## REFERENCES

1. Hattersley AT : Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity . *Diabet Med* 15:15-24, 1998.
2. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF : Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat. Genet.* 17:138-139, 1997.

3. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI : Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat. Genet.* 17:384-385, 1997.
4. Chevre JC, Hani EH, Stoffers DA, Habener JF, Froguel P : Insulin promoter factor 1 gene is not a major cause of maturity-onset diabetes of the young in French Caucasians. *Diabetes* 47:843-844, 1998.
5. Hara M, Lindner TH, Paz VP, Wang XY, Iwasaki N, Ogata M, Iwamoto Y, Bell GI : Mutations in the coding region of the insulin promoter factor 1 gene are not a common cause of maturity-onset diabetes of the young in Japanese subjects. *Diabetes* 47:845-846, 1998.
6. Beards F, Frayling T, Bulman M, Horikawa Y, Allen L, Appleton M, Bell GI, Ellard S, Hattersley AT : Mutations in Hepatocyte Nuclear Factor 1b are not a common cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young in the U.K.. *Diabetes* 47:1152-1154, 1998.
7. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H : b-cell-specific inactivation of mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the b-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev.* 12:1763-1768, 1998.
8. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI : Mutations In the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene in maturity- onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384:458-460, 1996.
9. Lindner T, Gragnoli C, Furuta H, Cockburn BN, Petzold C, Rietzsch H, Weiss U, Schulze J, Bell GI : Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha 1/MODY1 gene. *J. Clin. Invest.* 100:1400-1405, 1997.
10. Moller AM, Urhammer SA, Dalgaard LT, Reneland R, Berglund L, Hansen T, Clausen JO, Lithell H, Pedersen O : Studies of the genetic variability of the coding region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha in Caucasians with maturity onset NIDDM. *Diabetologia* 40:980-983, 1997.
11. Hani EH, Suaud L, Boutin P, Chèvre J-C, Durand E, Philippi A, Demenais F, Vionnet N, Furuta H, Velho G, Bell GI, Laine B, Froguel P A : Missense mutation in hepatocyte nuclear factor-4 a, resulting in a reduced transactivation activity, in human late-onset non insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 101:521-526, 1998.
12. Furuta H, Iwasaki N, Oda N, Hinokio Y, Horikawa Y, Yamagata K, Yano N, Sugahiro J, Ogata M, Ohgawara H, Omori Y, Iwamoto Y, Bell GI : Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* 46:1652-1657, 1997.
13. Bulman MP, Dronsfield MJ, Frayling T, Appleton M, Bain SC, Ellard S, Hattersley AT : A missense mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in a UK pedigree with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 40:859-862, 1997.
14. Sladek FM, Zhong W, Lai E, Darnell JE Jr : Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4:2353-2365, 1990.
15. Chartier FC, Bossu JP, Laudet V, Fruchart JC, Laine B : Cloning and sequencing of cDNA encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver. *Gene* 147:269-272, 1994.
16. Drewes T, Senkel S, Holewa B, Ryffel GU : Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol. Cell. Biol.* 16:925-931, 1996.
17. Griffio G, Hamon-Benais C, Angrand PO, Fox M, West L, Lecoq O, Povey S, Cassio D, Weiss MC : HNF4 and HNF1 as well a panel of hepatic functions are extinguished and reexpressed in parallel in chromosomally reduced rat hepatoma-human fibroblast hybrids. *J. Cell Biol.* 121:887-898, 1993.

18. Suaud L, Joseph B, Formstecher P, Laine B : mRNA expression of HNF-4 isoforms and of HNF-1a/HNF-1b variants and differentiation of human cell lines that mimic highly specialized phenotypes of intestinal epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 235:820-825, 1997.
19. Späth GF, Weiss MC : Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 17:1913-1922, 1997.
20. Chen WS, Manova K, Weinstein DC, Duncan SA, Plump AS, Prezioso VR, Bachvarova RF, Darnell JE Jr : Disruption of the HNF-4 gene, expressed in the visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* 8:2466-2477, 1994.
21. Holewa B, Pogge V, Strandmann E, Zapp D, Lorenz P, Ryffel GU : Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF-4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1a (LFB1). *Mech. Dev.* 54:45-57, 1996.
22. Sladek FM :Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). In *Liver gene expression*. Tronche F, Yaniv M, Eds. Austin, Tex. Landes R.G. Co. 1994, p.207-230
23. Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE Jr, Crabtree GR : A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355:457-461, 1992.
24. Cereghini S : Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10:267-282, 1996.
25. Miquerol L, Lopez S, Cartier N, Tulliez M, Raymondjean M, Kahn A : Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J. Biol. Chem.* 269:8944-8951, 1994.
26. Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K, Sladek FM : Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* 15:5131-5143, 1995.
27. Ktistaki E, Ktistakis NT, Papadogeorgaki E, Talianidis I : Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9876-9880, 1995.
28. Jiang GQ, Nepomuceno L, Yang Q, Sladek FM : Serine/threonine phosphorylation of orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Arch. Biochem. Biophys.* 340:1-9, 1997.
29. Viollet B, Kahn A, Raymondjean M : Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol. Cell. Biol.* 17:4208-4219, 1997.
30. Ladias JAA, Hadzopoulou-Cladaras M, Kardassis D, Cardot P, Cheng J, Zannis V, Cladaras C : Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes apoB, apoCIII, and apoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J. Biol. Chem.* 267:15849-15860, 1992.
31. Mietus-Snyder M, Sladek FM, Ginsburg GS, Kuo CF, Ladias JAA, Darnell JE Jr, Karathanasis SK : Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Mol. Cell. Biol.* 12:1708-1718, 1992.
32. Ktistaki E, Talianidis I : Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors act as auxiliary cofactors for hepatocyte nuclear factor 4 and enhance hepatic gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 17:2790-2797, 1997.
33. Stoffel M, Duncan SA : The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF-4a regulates expression of the genes required for glucose transport and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13209-13214, 1997.



34. Sladek FM, Dallas-Yang Q, Nepomuceno L : MODY1 mutation Q268X in hepatocyte nuclear factor 4 alpha allows for dimerization in solution but causes abnormal subcellular localization. *Diabetes* 47:985-990, 1998.
35. Ladias JAA, Karathanasis SK : Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science* 251:561-565, 1991.
36. Dao-Phan HP, Formstecher P, Lefebvre P : Disruption of the glucocorticoid receptor assembly with Heat Shock protein 90 by a peptidic antiglucocorticoid. *Mol. Endocrinol.* 11:962-972, 1997.
37. Boussif O, Lezovalc'h F, Zanta MA, Mergmy MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP : A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:7297-7301, 1995.
38. Lefebvre P, Cordingley MG, Berard DS, Hager GL : Two regions of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat regulate the expression of its promoter in mouse mammary cells. *Mol. Cell. Biol.* 11:2579-2537, 1991.
39. Bossu J-P, Chartier FL, Fruchart J-C, Auwerx J, Staels B, Laine B : Two regulatory elements of similar structure and placed in tandem account for the repressive activity of the first intron of the human apolipoprotein A-II gene. *Biochem. J.* 318:547-553, 1996.
40. Hoffmann A, Roeder RG : Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. *Nucleic Acids Res.* 19:6337-6338, 1991.
41. Malik S, Karathanasis SK : TFIIB-directed transcriptional activation by the orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol. Cell. Biol.* 16:1824-1831, 1996.
42. Hadzopoulou-Cladaras M, Kistanova E, Evagelopoulou C, Zeng S, Cladaras C, Ladias JAA : Functional domains of the nuclear receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4. *J. Biol. Chem.* 272:539-550, 1997.
43. Zhong W, Sladek FM, Darnell JE Jr : The expression pattern of a Drosophila homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. *EMBO J.* 12:537-544, 1993.
44. Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF : Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and b-pancreatic islet cells. *Cell* 55:281-290, 1988.
45. Lemaigre FP, Rousseau GG : Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* 303:1-14, 1994.
46. Spath GF, Weiss MC : Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 17:1913-1922, 1997.
47. Duncan SA, Nagy A, Chan W : Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: Tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* 124:279-287, 1997.
48. Lee Y-H, Sauer B, Gonzalez FJ : Laron Dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the *Hnf-1a* Knockout mouse. *Mol. Cell. Biol.* 18:3059-3068, 1998.
49. Malik S, Karathanasis SK : Transcriptional activation by the orphan nuclear receptor ARP-1. *Nucleic Acids Res.* 23:1536-1543, 1995.
- 50.

Legends to figures

**Fig. 1, The E276Q substitution does not affect DNA-binding and dimerization activities of HNF-4 .**

**A : DNA-binding activities.** In vitro synthesized wild-type or E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 (2 $\mu$ l) or COUP TFII overexpressed in COS 1 cells (3 $\mu$ g) were incubated with 0.1ng of <sup>32</sup>P-labeled HNF-1A or CIIIB binding sites and the DNA-protein complexes were resolved by PAGE in TAE buffer at 4°C. In lane 1, empty expression vector did not give retarded band, indicating specificity of the DNA-HNF-4 bands obtained in lanes 2 and 3. The specificity of the retarded band obtained with COUP TFII was ascertained by supershift assay with the COUP TFII antibody (49) (Ab COUP TFII) (lane 9). **B : Dimerization activities in the presence of DNA.** In vitro synthesized wild-type or E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 (2 $\mu$ l) and HNF-4 $\alpha$  deletion mutant lacking F domain ( $\Delta$ F) were incubated with <sup>32</sup>P labeled HNF-1A binding site and analyzed by EMSA as in A. Nature of each complexes are indicated on both sides. **C : Dimerization activities in the absence of DNA.** Ni-NTA beads coated with pure His-Tag HNF-4 $\alpha$ 2 were incubated with <sup>35</sup>S labeled wild-type or E276Q HNF-4 $\alpha$ 2. After extensive washing of beads, input and bound proteins were analyzed by SDS-PAGE. Input lanes represent 10% of proteins used in pull-down experiments. Proteins were visualized by autoradiography and quantified on a PhosphorImager.

**Fig. 2, The E276Q substitution in HNF-4 $\alpha$  results in a decreased enhancement of HNF-4-mediated transactivation of HNF-1 $\alpha$  promoter.** **A : Western blot assay.** COS-1 cells were transfected with 10 $\mu$ g of wild-type or E276Q HNF-4 $\alpha$ 2. Nuclear proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred on a PDVF membrane. Wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 were detected using the HNF-4  $\alpha$ 445 antibody (14) as indicated in (11). **B : Reporter assays.** The effects of the E276Q substitution in HNF-4 $\alpha$ 2 were analyzed on three promoters : mouse HNF-1 promoter (HNF-1), human apoCIII promoter (apoCIII), and HNF-1A-TATA. These promoters (500ng) were cotransfected in COS 1 cells (2x 10<sup>5</sup> cells) with 100 ng of the indicated expression vectors. Error bars represent the standard deviation of  $\beta$  galactosidase normalized reporter activities from three experiments performed in triplicates.

**Fig. 3, The E276Q substitution in HNF-4 $\alpha$  results in an impaired interaction of HNF-4 $\alpha$ 2 with COUP TFII.** <sup>35</sup>S labeled wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 were incubated with bacterially-expressed GST-COUP TFII bound to glutathione-Sepharose (GST-Sepharose) beads. After extensive washing of beads, input and bound proteins were analyzed by SDS-PAGE. The input

lanes represent 15% of proteins used in pull-down experiments. Pull-down samples were loaded in duplicate. Proteins were visualized by autoradiography and quantified on a PhosphorImager.

**Fig. 4, The E276Q substitution in HNF-4 $\alpha$  does not result in a conformational change of the protein.** <sup>35</sup>S labeled wild-type and E276Q HNF-4 $\alpha$ 2 were hydrolyzed with indicated amounts of endoproteinase Lys-C for 20 min at 37°C and the digests were analyzed by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel.

Figure 1.

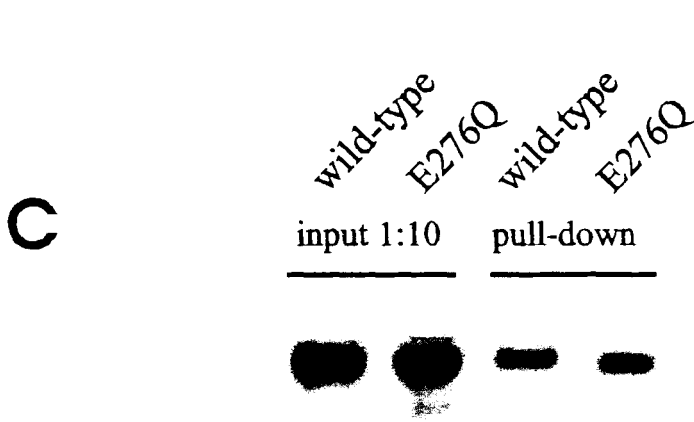
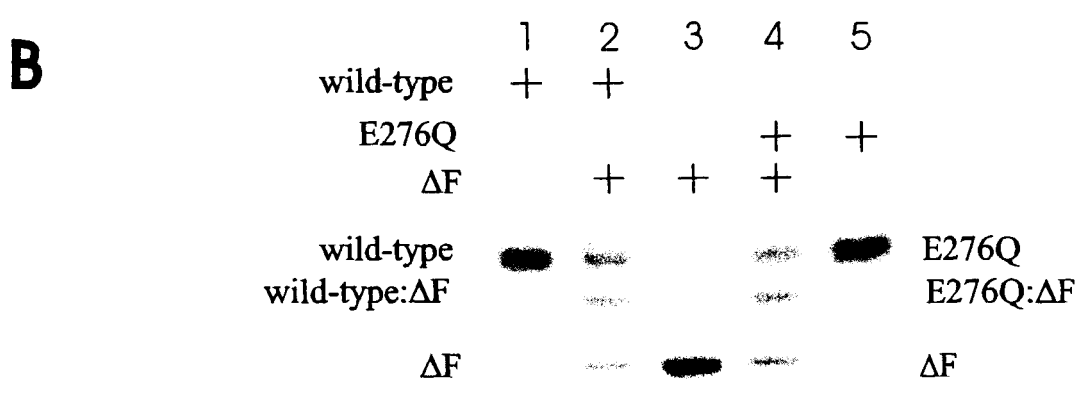
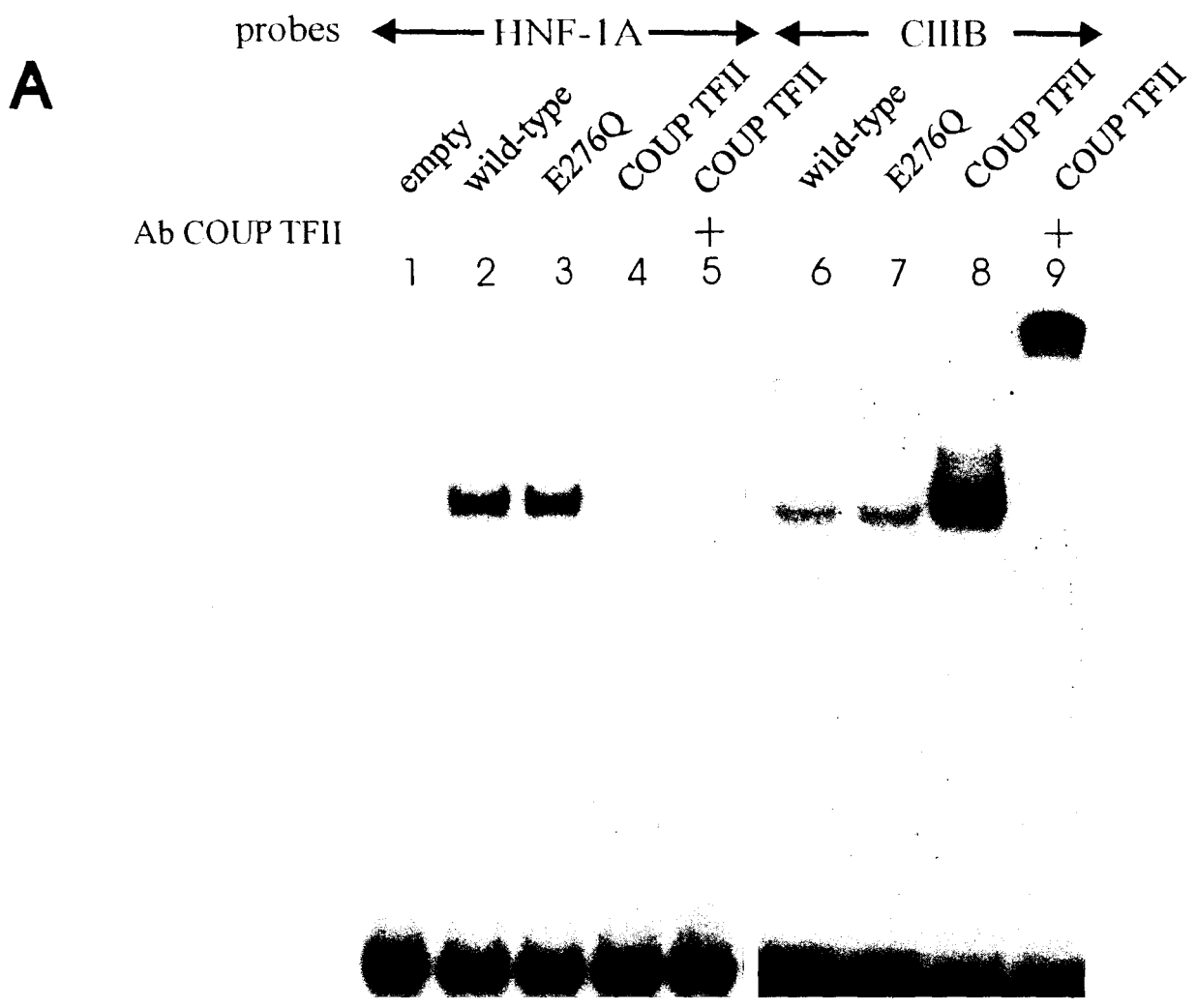


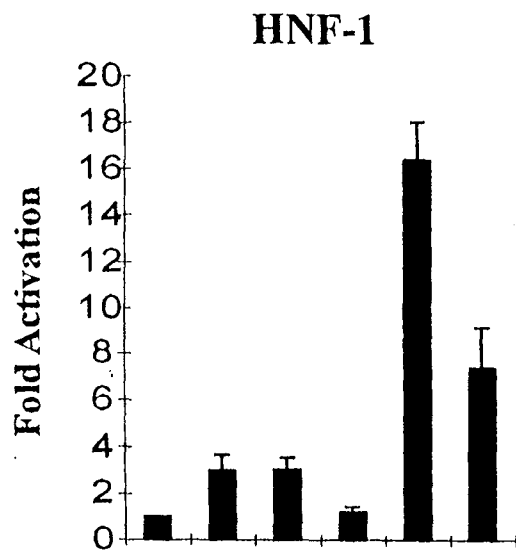
Figure 2.

A.

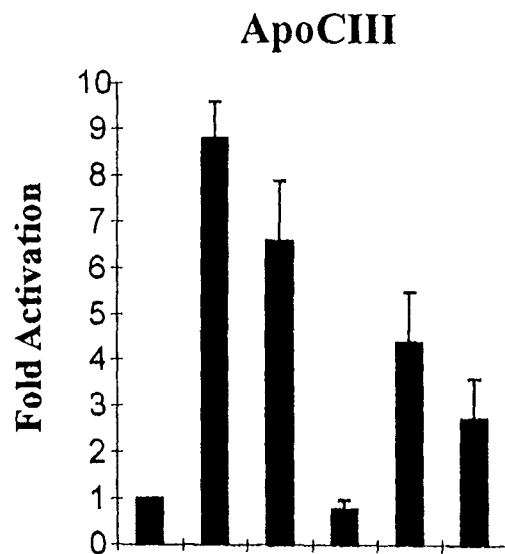
Wild-type  
E276Q



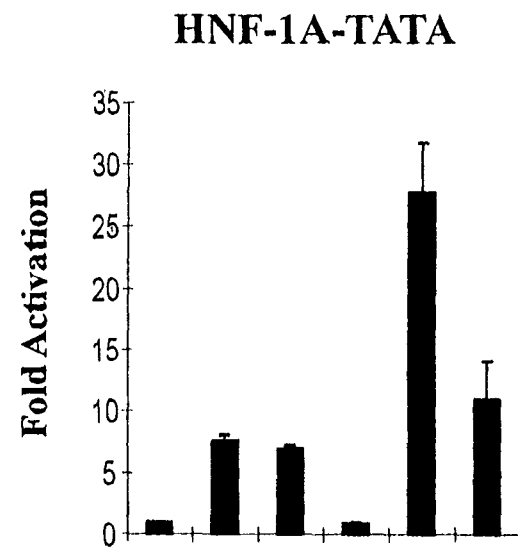

B.



WT	-	+	-	-	+	-
E276Q	-	-	+	-	-	+
COUP-TFII	-	-	-	+	+	+



WT	-	+	-	-	+	-
E276Q	-	-	+	-	-	+
COUP-TFII	-	-	-	+	+	+



WT	-	+	-	-	+	-
E276Q	-	-	+	-	-	+
COUP-TFII	-	-	-	+	+	+

Figure 3.

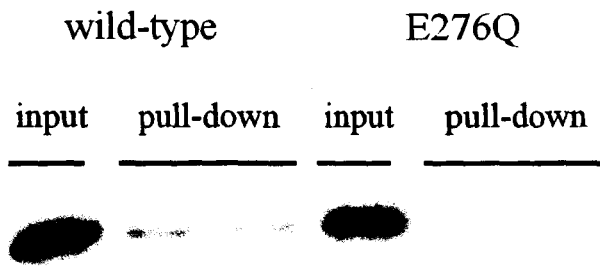
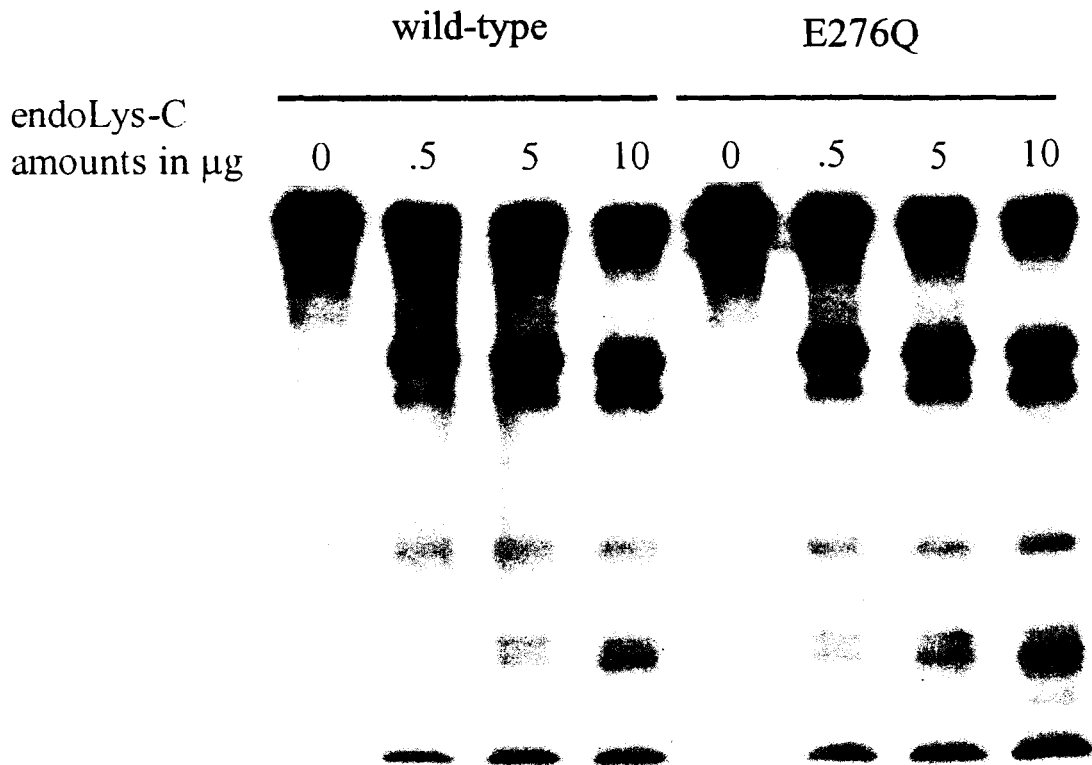


Figure 4.



### 3. Discussion :

L'activité de transcription du mutant HNF-4  $\alpha 2$  V393I est réduite de 40% par rapport à celle de la protéine sauvage, quel que soit le promoteur testé. Cette diminution de l'activité de transactivation n'est pas due à une baisse de l'expression de la protéine.

Ces résultats, assez inattendus, car nous sommes en présence d'une substitution conservative, confortent ceux obtenus précédemment montrant le rôle du domaine F dans la modulation de l'activité transcriptionnelle.

Cependant, cette substitution V393I n'est pas suffisante à elle seule pour expliquer le lien avec le diabète de type 2, puisqu'elle n'a été retrouvée que dans un seul pedigree (F-40). Nous ne pouvons pas exclure qu'il existe un second locus prédisposant au diabète lié à cette région chromosomique.

Les propriétés de liaison à l'ADN et de transactivation sont les mêmes pour HNF-4  $\alpha 2$  sauvage et HNF-4  $\alpha 2$  T130I et V255M. Ces mutations n'ont donc pas de conséquences sur les propriétés fonctionnelles de HNF-4 $\alpha$  avec les promoteurs utilisés, bien que le résidu de thréonine en position 130 soit localisé dans la boîte A qui joue un rôle dans la stabilité du complexe ADN-récepteur.

Une étude génétique récente (Malecki *et al.* 1998) montre que la mutation V255M ne ségrège pas avec le phénotype MODY dans trois familles étudiées. Cette étude montre aussi, que l'acide aminé T130 est souvent substitué dans d'autres populations étudiées (non diabétiques), suggérant que ce variant n'a pas d'impact sur le MODY. Il existe donc une bonne corrélation entre cette dernière étude génétique et les résultats de notre étude fonctionnelle.

Sur les promoteurs apoCIII et HNF-1, HNF-4  $\alpha 2$  sauvage et le mutant E276Q ont les mêmes propriétés de dimérisation, de liaison à l'ADN et de potentiel de transactivation. Cependant, en présence de COUP-TFII, la substitution E276Q provoque une diminution de l'interaction entre ces deux protéines et a pour conséquence une baisse de leur synergie sur le promoteur de HNF-1. Des expériences de digestion des protéines sauvage et mutée à l'endo-LysC montrent que la diminution d'interaction entre HNF-4 et COUP-TFII n'est pas due à un changement de conformation de HNF-4.

Cette mutation peut avoir des conséquences importantes au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques, puisque HNF-1 est impliqué dans la régulation du gène de l'insuline et d'enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose. Sachant que HNF-4 $\alpha$  est modérément exprimé dans les cellules  $\beta$  du pancréas et que les COUP-TFs sont des facteurs ubiquitaires,

cette synergie entre HNF-4 et COUP-TFs doit être cruciale au niveau de ces cellules, pour permettre l'expression suffisante de HNF-1. Ainsi, la mutation E276Q dans le gène de HNF-4 $\alpha$  pourrait représenter le mécanisme conduisant à la diminution de sécrétion de l'insuline chez les patients atteints de MODY1.

Il sera important dans la poursuite de l'étude des mutants de HNF-4 $\alpha$  liés au diabète d'utiliser des promoteurs de gènes impliqués dans l'homéostasie du glucose, et d'utiliser des modèles cellulaires mieux adaptés à la physiologie du diabète.

#### **4. Conclusion de l'étude des mutants de HNF-4 $\alpha$ liés au MODY 1:**

Nos travaux contribuent à l'étude de la relation structure-fonction de HNF-4 $\alpha$ , en définissant le rôle de certains résidus d'acides aminés. Ainsi, la substitution conservative T130I n'affecte pas la fonction de la protéine et ne doit pas représenter un acide aminé essentiel dans la fonction de la boîte A, tandis que la mutation E276Q indique que le résidu d'acide glutamique joue un rôle important dans l'interaction avec COUP-TFII. La région d'interaction de HNF-4 avec COUP-TFs, initialement décrite comme située entre les résidus d'acides aminés 227 à 271 (Ktistaki et Talianidis, 1997b), s'étend en fait au moins jusqu'au résidu 276. La mutation V255M étant située dans la région d'interaction HNF-4-COUP-TFs, nous avons réalisé des études de synergie entre COUP-TFII et le mutant V255M. Ce mutant ne montre pas de différence par rapport à HNF-4 sauvage (résultats non montrés). Enfin, les résultats obtenus avec le mutant V393I renforcent l'idée que le domaine F est impliqué dans la modulation de l'activité transcriptionnelle de HNF-4.

Nos études fonctionnelles ainsi que celles de Stoffel et Sladek (Stoffel et Duncan, 1997; Sladek *et al.* 1998) permettent de classer ces mutations en trois groupes :

⇒ Le premier groupe comprend les mutations T130I et V255M qui n'ont aucun effet sur les propriétés fonctionnelles de HNF-4. Ces mutations sont des polymorphismes.

⇒ Le deuxième groupe comprend les mutations V393I et E276Q qui provoquent une perte partielle de l'activité transactivatrice de HNF-4.

⇒ Le troisième groupe comprend la mutation non sens Q268X qui entraîne une perte totale des capacités de transactivation de HNF-4, même si cette mutation n'est pas dominant-négative.



Cependant, si nous associons les données fonctionnelles aux critères cliniques, le deuxième groupe de mutations peut être divisé en deux. Ainsi, la mutation E276Q en affectant l'expression du facteur de transcription HNF-1, qui a un rôle important dans la glycémie, a probablement des conséquences plus sévères qui expliquent l'âge du diagnostic précoce du MODY chez les patients porteurs de cette mutation. L'étude du caractère dominant négatif de cette mutation est en cours. Par contre, l'âge du diagnostic du MODY chez les sujets portant la mutation V393I est tardif (vers 45 ans).

Si nous nous basons sur des critères génétiques, il existe deux groupes de mutations de HNF-4 $\alpha$  liés au MODY 1 :

⇒ Le premier groupe est composé des mutations sévères ( R154X, Q268X, E276Q), où le type de MODY est "classique", c'est à dire qu'il apparaît avant l'âge de 25 ans et qu'il a une transmission héréditaire dominante.

⇒ Le deuxième groupe comprend les mutations R127W et V393I qui présentent une faible transmission héréditaire. Ce type de MODY est caractérisé par une altération progressive de l'homéostasie du glucose et un âge tardif de l'apparition de la maladie. Ce type de MODY ressemble plus à un diabète non insulino-dépendant classique.

Conclusion

En conclusion, nos études ont permis de démontrer que :

⇒ Dans les cellules Caco-2, modèle représentant une cellule épithéliale entérocytaire, les isoformes de HNF-4 $\alpha$  ont des taux d'expression très différents, et la différenciation cellulaire est corrélée à une augmentation d'un nombre limité d'isoformes : principalement l'isoforme  $\alpha$ 2, et à moindre degré les isoformes  $\alpha$ 5 et  $\gamma$ . Il apparaît donc nécessaire de déterminer l'expression des différentes isoformes de HNF-4 dans tout type de cellule utilisé comme modèle d'étude.

⇒ Le domaine F de HNF-4 est impliqué dans la modulation de l'activité transcriptionnelle. Les domaines F des trois isoformes,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 et  $\gamma$  répriment l'activité de l'AF-2 de HNF-4, mais cet effet répresseur diffère d'une isoforme à l'autre. Le domaine F des récepteurs nucléaires présente de grande variabilité en taille et en séquence, certains récepteurs n'ont même pas de domaine F. De ce fait, ce domaine a longtemps été considéré comme accessoire et n'a que peu retenu l'attention de la communauté scientifique. Cependant des données récentes ont déjà montré qu'il joue un rôle dans la fonction de ligands agonistes ou antagonistes et dans la conformation du dimère. Il semble aussi intervenir dans l'interaction avec les cofacteurs. Il paraît donc intéressant d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement de ce domaine. Son étude constitue une voie d'approche pour développer des drogues modifiant la transactivation de récepteurs qui sont impliqués dans de nombreuses pathologies.

⇒ Nos études sur les mutants de HNF-4 $\alpha$  rencontrés chez les patients atteints de diabète de type MODY 1 ont contribué à établir un lien entre les études génétiques qui ont décrit ces mutations et des anomalies fonctionnelles du récepteur HNF-4 $\alpha$ . Elles ont aussi permis de mieux comprendre la relation structure-fonction de HNF-4 $\alpha$  en précisant le rôle de plusieurs résidus d'acides aminés dans la fonction de la protéine. Nous avons pu ainsi discerner plusieurs classes de mutations sur la base de l'importance des altérations des propriétés fonctionnelles de HNF-4 $\alpha$ . Ce travail a permis d'associer des résultats de recherches fondamentales à des études portant sur des préoccupations de santé publique. En effet l'élucidation des anomalies fonctionnelles de mutants de HNF-4 $\alpha$  contribue à mieux comprendre la physiopathologie du MODY 1 pour le traitement duquel HNF-4 pourrait constituer une cible pharmacologique prometteuse permettant ainsi de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques.

# Appendice Technique

## Milieux et tampons

- Milieu LB 5x :
  - Bactotryptone 50g
  - Bactoyeast 25g
  - NaCl 50g
  - H<sub>2</sub>O qsp 1L
  - Stériliser 30 min. à 120°C
- Tampon PBS 10x :
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15mM
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81mM
  - KCl 27mM
  - NaCl 1.37mM
  - H<sub>2</sub>O qsp 1L
  - pH 7.4
- Tampon TBE 10x :
  - Tris-HCl 0.89M pH8
  - Acide borique 0.89M
  - EDTA 12.5mM pH8
- Tampon TAE 10x :
  - Tris 0.4M
  - EDTA 0.01M
  - pH 8 acide acétique glacial
- Tampon TBS 5x :
  - Tris 10mM
  - NaCl 150mM
  - pH 7.4
- Plasmides :
  - ⇒ pSG5 contient l'ADNc des isoformes et chimères de HNF-4 humains.
  - ⇒ pCDNA 3.1 (Invitrogen) contient l'ADNc de HNF-4  $\alpha$ 2 humain, et des mutants HNF-4  $\alpha$ 2V393I,  $\alpha$ 2E276Q,  $\alpha$ 2T130I,  $\alpha$ 2V255M.
  - ⇒ pMT2 contient l'ADNc de COUPTF-II humain.
  - ⇒ pGEX 2TK (Pharmacia) contient l'ADNc de COUP-TFII.

⇒ pGAP contient l'ADNc codant pour l'AF-2 fusionné ou non aux domaines F des isoformes de HNF-4 insérés sous formes de fragments XbaI-BamHI.

⇒ pQE9 (Qiagen) contient l'ADNc de HNF-4 $\alpha$ 2.

## **II. Les cellules bactériennes et eucaryotes :**

### **A. Les cellules bactériennes :**

⇒ La souche bactérienne JM109 d'E.coli (Promega).

⇒ La souche bactérienne M15 dérivé d'E.coli .

### **B. Les cellules eucaryotes :**

⇒ Les cellules COS-1 : ce sont des cellules qui dérivent de cellules CV-1 de rein de singe, ayant la morphologie de cellules fibroblastiques. Elles sont maintenues en culture en milieu DMEM complémenté à 10% en SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté et de 100mg/ml d'antibiotiques (Pénicilline/ Streptomycine).

⇒ Les cellules HepG2 : ce sont des cellules humaines de carcinome hépatique, ayant la morphologie de cellules épithéliales. Elles sont cultivées en présence de DMEM contenant 10% de SVF décomplémenté et de 100mg/ml d'antibiotiques (Pénicilline/ Streptomycine).

⇒ Les cellules C33 : elles proviennent de carcinomes de cellules épithéliales humaines. Elles sont cultivées en présence de DMEM contenant 7.5% de SVF décomplémenté et de 100mg/ml d'antibiotiques.

⇒ Les cellules CACO-2 : ce sont des cellules isolées d'une tumeur primaire de colon humain. Elles sont cultivées en présence de DMEM , de 20%de SVF décomplémenté et de 1% d'acides aminés non essentiels.

⇒ Les cellules HT29 : ce sont des cellules humaines de carcinome de colon. Ces cellules sont cultivées en présence de DMEM et de 10% de SVF décomplémenté.

### III. Méthodologie :

#### A. Extraction de l'ADN plasmatique :

##### Mini-préparation d'ADN :

miniprep Wizard "DNA purification system" (Promega)

##### Maxi-préparation d'ADN :

##### *Matériels et solutions :*

- Solution de : resuspension
  - glucose 50mM
  - Tris-HCl 25mM pH8
  - EDTA 10mM
- Solution de lyse :
  - NaOH 0.2M
  - SDS 1%
- Solution de neutralisation :
  - Acétate de potassium 5M ajusté à pH 4.8 avec de l'acide acétique glacial
- Solution de PEG/NaCl :
  - Polyéthylèneglycol 8000 13%
  - NaCl 1.6M

##### *Protocole :*

La culture bactérienne est incubée dans 500 ml de milieu LB ampicilline liquide, à 37°C sous agitation 200 rpm, une nuit. Le milieu est centrifugé (2700 g, 20 min., 4°C), le culot bactérien est repris par 10 ml de solution de resuspension. Les cellules sont lysées par 10 ml de la solution de lyse, puis neutralisées par ajout de 10 ml de solution de neutralisation. Les débris cellulaires sont culottés par centrifugation (2700g, 20min., 4°C). Le surnageant est récupéré, et 0,6 volume de propanol-2 est ajouté. Le culot obtenu après centrifugation (17600 g, 15 min., 4°C) est resuspendu par 1 ml de TE + RNaseA (150ng/ml final). Suite à une incubation 1h à 37°C, l'ADN est précipité par 1 volume de solution PEG/NaCl et centrifugé (17600g, 5min., 4°C). L'ADN resuspendu par 500 µl d'eau est, après extraction au

phénol/chloroforme, précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu froid en présence de 0.25 volume d'acétate d'ammonium 10M.

### B. Mutagenèse dirigée :

Des récepteurs HNF-4  $\alpha$ 2 humain où le résidu de valine 393 est remplacée par le résidu d'isoleucine et le résidu d'acide glutamique 276 par le résidu de glutamine ont été créés par mutagenèse dirigée. Les mutants sont obtenus par amplification par PCR de l'ADN complémentaire de HNF-4 $\alpha$  en présence de deux oligonucléotides complémentaires du récepteur. La séquence de l'un des deux possède une base mutée donnant un codon correspondant à l'acide aminé voulu. Un site de restriction (RsaI) est aussi présent dans l'oligonucléotide afin de permettre la sélection ultérieure.

#### Matériels et solutions :

- Kit de mutagenèse dirigée (Stratagène)
- Plasmide pCDNA-HNF-4  $\alpha$ 2 humain
- Oligonucléotides :

-mutant V393I sens 5'ATGGGTACCAACATCATCGTTGC 3'  
RsaI mutation V-I  
antisens 5'ATGTTCTGCATCAGGTGAGGGTG 3'

-mutant E276Q sens 5'GACAATCAGTATGCGTACCTCAA 3'  
mutation V-I RsaI  
antisens 5'ATCGATCTGCAGCTCCTGGAAG 3'

-oligonucléotides encadrant les mutations pour effectuer la sélection des clones.

#### Protocole :

- a. Phosphorylation de l'oligonucléotide antisens en présence d'ATP et de polynucléotide kinase
- b. PCR

Mélanger : 1 $\mu$ l pCDNA-hHNF-4  $\alpha$ 2

2.5 $\mu$ l tampon de mutagenèse 10 x

1 $\mu$ l dNTPs 25mM

15pmol d'oligonucléotide phosphorylé

15pmol d'oligonucléotide muté



0.5µl Taq DNA polymérase 5U/µl

0.5µl Taq extender PCR additive 5U/µl

Effectuer 15 cycles de PCR (dénaturation à 94°C 5min, hybridation 58°C pendant 2 min, élongation 72°C pendant 5 min)

Incuber 30 min à 37°C en présence de 0.5µl DnpI et 0.5µl Pfu DNA polymérase.

Dénaturer les enzymes 30min à 72°C avant l'étape de ligation.

Analyser sur gel d'agarose 1% TBE 0.5x.

c. Ligation :

Mélanger : 8µl de produit de PCR

1µl de tampon mutagenèse

0.5µl rATP 10mM

1µl T4-DNA ligase

Incuber 37°C pendant 1h.

d. Transformation :

Mélanger : 8µl de produit de ligation

80µl de bactéries XL1-Blue compétentes

laisser 30 min à 4°C

Incuber 45 sec à 42°C, puis 2 min à 4°C.

Ajouter 800µl de milieu LB et incuber 1h à 37°C.

Etaler sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar avec ampicilline.

e. Criblage des colonies :

La sélection s'effectue grâce à l'acquisition du site de restriction enzymatique RsaI sur le plasmide muté. Les colonies obtenues sont remises en culture dans 500µl de LB ampicilline, pendant 1h à 37°C. Une PCR est effectuée en présence d'oligonucléotides encadrant la mutation. Ainsi, 5µl de culture est ajouté à 1µl de chaque oligonucléotide 2.5µM, 2.5µl de dNTPs 2.5mM, 2.5µl de tampon 10x (Promega), 1.3µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0.25µl de Taq 5U/µl (Promega). L'amplification se fait grâce à 30 cycles de PCR ( 94°C 30sec, 55°C 30sec, 70°C 30sec). 10µl de produit PCR sont digérés par 1µl de RsaI (Promega) dans un volume de 100µl final en présence de 10µl de tampon de digestion 10x (Promega). La PCR sur le mutant

V393I, permet d'amplifier une bande de 391bp et la digestion par RsaI permet d'obtenir deux bandes de 115 et 276bp. La PCR sur le mutant E276Q permet d'amplifier une bande de 324bp, et la digestion enzymatique l'obtention de deux bandes de 191 et 133bp.

### **C. Transfections transitoires et dosage luciférase :**

#### Transfections transitoires:

##### *Matériel :*

- Cellules eucaryotes
- ADN à transférer
- Polyéthylène imide (PEI) (Euromedex)
- NaCl 150mM
- Optimem (Gibco-BRL)

##### *Protocole :*

- a. Les cellules sont réparties en boîte à 6 puits la veille de la transfection à une concentration de  $2 \cdot 10^5$  cellules par puits.
- b. Le mélange ADN/PEI est réalisé selon les instructions du fournisseur (Euromedex). Après incubation de ce mélange pendant 10min à température ambiante, il est réparti sur les cellules, dont le milieu complet a été au préalable remplacé par 900 $\mu$ l d'Optimem . Après 5h , 1ml de milieu DMEM-antibiotiques contenant 20% de SVF est ajouté aux cellules. Le milieu de culture est renouvelé 24h après la transfection.

#### Dosage luciférase :

##### *Matériel :*

- Tampon de lyse :
  - Triton X100 1%
  - GlyGly 25mM
  - MgSO4 15mM
  - EGTA 4mM
  - DTT 1mM
- Tampon d'essais luciférase :
  - GlyGly 25mM
  - KH2PO4 15mM
  - MgSO4 15mM

EGTA 4mM  
DTT 1mM  
ATP 2mM

- Substrat :  
D-luciférine 1mM  
GlyGly 25mM  
DTT 10mM

*Protocole :*

48h après la transfection, les cellules sont lavées au PBS 1X puis traitées avec 200µl de tampon de lyse. Après 25min. sous agitation douce, les cellules sont décollées puis transférées en tube Eppendorf. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (11270g, 10 min., 4°C) et, 100 µl du surnageant contenant les protéines sont placés avec 360µl de tampon pour essais luciférase. L'activité luciférase est mesurée sur une période de 15 secondes consécutive au début de la réaction provoquée par l'introduction dans le mélange réactionnel de luciférine. L'efficacité de transfection est normalisée grâce à un dosage β-galactosidase.

**D. Expression de protéines en cellules eucaryotes.**

Pour l'étude de l'expression des protéines, 3x10<sup>6</sup> cellules COS-1 sont transfectées par 10µg de vecteur d'expression de HNF-4, en présence de PEI, dans des boîtes de culture de 10cm de diamètre.

*Matériels et solutions :*

- PBS 1x avec PMSF 0.5mM
- Tampon A :  
Hepes 10mM pH 7.5  
KCl 10mM  
MgCl<sub>2</sub> 1.5mM  
EDTA 0.5mM pH8  
EGTA 0.5mM pH8  
PMSF 0.5mM  
Leupeptine 1µg/ml  
Aprotinine 1µg/ml  
Pepstatine 1µg/ml
- Tampon B :  
Idem à tampon A plus 0.3mg/ml de sucrose

- Triton X100 à 10%
- Tampon NBE (nuclear buffer extract) 0.14
  - Hepes 10mM pH 7.9
  - NaCl 0.14M
  - MgCl<sub>2</sub> 1.5mM
  - EDTA 1mM
  - EGTA 0.2mM
  - Glycérol 20%
  - PMSF 0.5mM
  - Leupeptine 1µg/ml
  - Aprotinine 1µg/ml
  - Pepstatine 1µg/ml
  - DTT 1mM
- Tampon NBE 0.64
  - Hepes 10mM pH 7.9
  - NaCl 0.64M
  - MgCl<sub>2</sub> 1.5mM
  - EDTA 1mM
  - EGTA 0.2mM
  - Glycérol 20%
  - PMSF 0.5mM
  - Leupeptine 1µg/ml
  - Aprotinine 1µg/ml
  - Pepstatine 1µg/ml
  - DTT 1mM

*Protocole :*

48 h après la transfection, les cellules sont lavées dans le PBS contenant du PMSF 0.5mM. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 2ml de PBS/PMSF et centrifugées (700g, 5min., 4°C). Le culot cellulaire est repris par 1ml de tampon A. Après une incubation pendant 10 min., 26µl de Triton X-100 à 10% sont ajoutés. Le mélange est “vortexé” 10 sec, après un repos de 30sec, 1ml de tampon A est ajouté. Le mélange est finalement déposé sur un coussin de sucrose (Tampon B). Les noyaux cellulaires plus denses sédimentent pour former un culot après centrifugation (700g, 45min., 4°C). Le culot nucléaire est repris par 50µl de tampon NEB 0,14, 1 vol de NEB 0,64 est ajouté puis, le mélange est mis en agitation douce pendant 30min. à 4°C. Après centrifugation (17600g, 15min.), le surnageant contenant les protéines nucléaires est aliquoté et congelé dans l’azote liquide puis stocké à -80°C. La concentration en protéines de ces extraits nucléaires est déterminée par le kit de dosage des protéines (Biorad), dont le principe est basée sur la technique de Bradford (1976).

## **E. Western-blot :**

### *Matériels:*

- Membrane PDVF (Amersham)
- Papier watmann 3MM
- Solution de rouge Ponceau :
  - 0.2% rouge ponceau
  - 3% acide acétique
- Tampon de transfert :
  - Tris 20mM pH8.8
  - Glycine 150mM
  - Méthanol 20%
- TBST 1x :
  - TBS 1x
  - Tween 20 1/1000<sup>e</sup>
- Kit de révélation ECL (Amersham).

### *Protocole :*

Après migration des échantillons sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur membrane PDVF (Amersham) selon la méthode du Western-blot :

- a. Passer la membrane 10 secondes dans du méthanol, la rincer 5 minutes à l'eau distillée, puis la placer dans du tampon de transfert au moins 10min.
- b. Transférer les protéines du gel sur la membrane à 50 V pendant 2 h dans l'électroblot.
- c. Tremper la membrane 10 minutes dans le Rouge Ponceau, décolorer dans l'eau et noter les témoins de tailles moléculaires.
- d. Saturer la membrane dans 60 ml de TBST (TRIS 10 mM pH 7.4 ; NaCl 150mM ; Tween 20 1/1000<sup>e</sup>) + 5% lait écrémé une nuit à 4°C.
- e. Effectuer 4 lavages de 10 minutes avec du TBST.
- f. Incubation 1<sup>er</sup> anticorps 2h à température ambiante: dans du TBST 1%. Suivant l'anticorps utilisé, la dilution de celui-ci varie.

- g. Effectuer 2 lavages de 10 minutes puis 4 lavages de 5 minutes avec du TBST,
- h. Incubation avec 10 $\mu$ l du 2<sup>ème</sup> anticorps 1h à température ambiante dans du TBST-lait 2%
- i. Lavage de 10 minutes puis 5 lavages de 5 minutes au TBST.
- j. Révéler le Western blot avec le Kit ECL (Amersham) selon les instructions du fournisseur.
- k. Autoradiographier la membrane pendant 1 minute puis 10 minutes si nécessaire.

## **F. Retardement sur gel ou « Electrophoretic Mobility Shift Assay » (EMSA)**

### *Matériel :*

- Oligonucléotide correspondant aux éléments de réponse de HNF-4 du promoteur de l'apolipoprotéine CIII, du promoteur de HNF-1.
- Tampon TE (Tris-EDTA)
- 10 $\mu$ Ci  $\gamma$ <sup>32</sup>P ATP
- 5U T4 polynucléotide Kinase (Promega)
- Tampon de marquage :
  - Tris-HCl 70mM pH7.6
  - MgCl<sub>2</sub> 10mM
  - DTT 50mM
- 5U T4 DNA polymérase (Promega)
- Tampon Klenow :
  - Tris acétate 33mM pH7.9
  - Acétate de potassium 66mM
  - Acétate de magnésium 10mM
  - DTT 0.5mM\*
- dNTPs 2.5 $\mu$ M
- Chroma spin-10 (Clontech)
- Tampon SB :
  - Hepes 20mM pH7.9
  - NaCl 50mM
  - EDTA 0.1mM
  - DTT 1mM
  - glycérol 20%
- Poly(dI-dC)
- Polyacrylamide
- TAE 1x

*Protocole :*

a. Préparation de la sonde d'ADN radiomarquée

⇒ *Hybridation des oligonucléotides*

500ng de chaque oligonucléotide complémentaire sont dilués dans 50µl de TE 1X en présence de NaCl 0,1 M. Le mélange est ensuite placé 2 min., à 90°C puis laissé refroidir lentement à température ambiante.

⇒ *Marquage*

Les oligonucléotides double brins présentent des extrémités cohésives correspondant aux sites de restriction des enzymes BamH I et Bgl II. Ainsi, les oligonucléotides sont marqués à leur extrémité 5' débordantes. 40 ng d'oligonucléotides sont marqués par le  $\gamma^{32}\text{P}$  ATP par la  $T_4$  Polynucléotide Kinase dans le tampon de marquage à 37°C pendant 30 min.

⇒ *Remplissage des extrémités débordantes*

Afin d'éviter des artefacts dus à la fixation de protéines sur l'ADN simple brin, les extrémités cohésives 5' débordantes sont "remplies" par la  $T_4$  DNA Polymérase en tampon Klenow en présence de dNTP 0,2µM, à 37°C pendant 30 min. Le mélange est dilué au demi, l'excès d'ATP marqué est éliminé par chromatographie de gel-filtration sur colonne Chroma spin-10. La sonde est finalement diluée à 0,2ng/µl.

b. Formation du complexe ADN- Protéines

Les extraits nucléaires 2,5 à 5µg sont incubés 30 min. sur la glace dans le tampon SB dans un volume final de 20µl, en présence de 2µg de double brin poly(dI,dC) et de 0,2ng de sonde marquée au  $^{32}\text{P}$ . Des oligonucléotides compétiteurs sont éventuellement ajoutés en excès (50-150X) au mélange.

c. Séparation en gel de polyacrylamide

Les complexes ADN-protéines sont séparés de l'ADN libre par électrophrèse en gel de polyacrylamide 5% (poids/volume), en tampon TAE 1x. La migration en gel de polyacrylamide est réalisée à 150 V pendant 150 min. en position verticale. Les gels sont ensuite séchés puis placés en autoradiographie une nuit.

**G. Interactions protéine-protéine *in vitro* :**

La technique du "pull-down" permet de mettre en évidence des interactions protéine-protéine. Une des protéines porte une extrémité GST, qui permet de purifier la protéine par chromatographie d'affinité ( sur des billes de sépharose couvertes de glutathion).

*Matériel :*

- pGEX-COUP-TF-II
- pSG5 HNF-4
- Bactéries JM 109
- Tampon IPAB 100 :
  - Hepes 20mM pH7.8
  - KCl 100mM
  - MgCl<sub>2</sub> 5mM
  - Nonidet P40 0.1%
  - Glycérol 10%
  - BSA 0.02mg/ml
  - PMSF 0.5mM
  - Aprotinine 1mg/l
- TNT Quick T7 (Promega)
- Résine glutathione sépharose
- PBS 1x

*Protocole*

a. Préparation de l'extrait bactérien

Le plasmide contenant COUP-TFII est mis en culture dans 20ml de LB ampicilline toute la nuit à 37°C. Le lendemain, la pré-pousse est mise en culture dans 1L de LB ampicilline à 37°C et induite par 1mM IPTG pendant 3h. La culture est ensuite centrifugée 15min à 5000rpm. Le culot est repris par 10ml de PBS 1x contenant 2mM de DTT et du lysosyme 2mg/ml et incubé 30min à 4°C. Du triton X100 à 10% est ajouté et le mélange est soniqué 8sec. Le mélange est centrifugé à 20000rpm pendant 30min à 4°C. Le surnageant est aliquoté en présence de 10% final de glycérol et stocké à -80°C.

b. Préparation de la résine glutathione



0.66ml de résine est centrifugée 5min à 500g. Elle est lavée par 10ml de PBS 1x, centrifugée 5min à 500g et resuspendue dans 0.5ml de PBS 1x et stockée à 4°C.

c. Purification de l'extrait bactérien :

Préparer une solution de PBS 1x contenant 2.5% de lait, ajouter 100µl d'extrait bactérien et 100µl de résine qui a été préparée ultérieurement. Agitation toute la nuit à 4°C. Centrifuger 5min à 500g et laver 6 fois avec 200µl de tampon IPAB. Resuspendre le culot dans le tampon IPAB BSA (100µl/ml d'extrait).

d. Interaction protéine -protéine :

Mélanger 14µl de protéine synthétisée *in vitro* (TNT quick T7) avec 135µl de tampon IPAB BSA et 40µl d'extrait purifié. Incuber 4h à 4°C. La résine est ensuite lavée 4 fois par 100µl de tampon IPAB et entre chaque lavage centrifuger 3 min à 500g. On ajoute 10µl de tampon SDS et 20µl de "loading buffer" les protéines sont dénaturées à 100°C et déposées sur un gel de polyacrylamide.

## **H. Protéase "mapping" :**

*Matériel et solution :*

- Kit TNT Quick T7 (Promega)
- Endoprotéinase Lys-C (Boehringer-Mannheim)
- Tampon de digestion 10x :
  - Tris-HCl 252mM pH 8.5
  - EDTA 12mM
- Methionine marquée au <sup>35</sup>S
- pSG5 HNF-4 α2 WT ou E276Q

*Protocole :*

Les protéines marquées au <sup>35</sup>S HNF-4α2 WT et E276Q sont synthétisées avec le Kit TNT Quick T7 selon les instruction du fournisseur. 2µl d'aliquot sont digérées dans un volume final de 10µl avec de l'endoprotéinase Lys-C à différentes concentration, 1µl de tampon de digestion 10x pendant 20min à 37°C. Les protéines digérées sont séparées par gel l'electrophorèse à 12% en présence de SDS. Les peptides sont visualisés par autoradiographie.

# Bibliographie

Ahlgren, U., J. Jonsson and H. Edlund (1996) The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice, *Development*, 122, 1409-1416.

Ahlgren, U., S.L. Pfaff, T.M. Jessell, T. Edlund and H. Edlund (1997) Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells, *Nature*, 385, 257-260.

Ahlgren, U., J. Jonsson, L. Jonsson, K. Simu and H. Edlund (1998) beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes, *Gene Develop.* 12, 1763-1768.

Bali, D., A. Svetlanov, H.W. Lee, D. Fusco-DeMane, M. Leiser, B. Li, N. Barzilai, M. Suruna, H. Hou and N. Fleischer (1995) Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene, *J Biol Chem*, 270, 21464-21467.

Baniahmad, A., M. Eggert and R. Renkawitz (1997) Steroid, thyroid and retinoid receptors as transcription factors, *Transcription Factors in Eucaryotes*, chap. 6, Landes Bioscience

Beards, F., T. Frayling, M. Bulman, Y. Horikawa, L. Allen, M. Appleton, G.I. Bell, S. Ellard and A.T. Hattersley (1998) Mutations in Hepatocyte Nuclear Factor 1b are not a common cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young in the U.K. *Diabetes*, 47, 1152-1154.

Berrevoets, C.A., P. Doesburg, K. Steketee, J. Trapman and A.O. Brinkmann (1998) Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (Transcriptional intermediary factor 2), *Mol. Endocrinol.* 12, 1172-1183.

Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer and D. Moras (1995) Structure III D RXR, *Nature*, 375, 377-382.

Bulman, M.P., M.J. Dronsfield, T. Frayling, M. Appleton, S.C. Bain, S. Ellard and A.T. Hattersley (1997) A missense mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in a UK pedigree with maturity-onset diabetes of the young, *Diabetologia*, 40, 859-862.

Carter, M.E., T. Gulick, B.D. Raisner, T. Caira, J.A.A. Ladias, D.D. Moore and D.P. Kelly (1993) Hepatocyte nuclear factor-4 activates medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene

transcription by interacting with a complex regulatory element, *J. Biol. Chem.* 268, 13805-13810.

Carty, M.D., J.S. Lillquist, M. Peshavaria, R. Stein and W.C. Soeller (1997) Identification of *cis*- and *trans*-active factors regulating human islet amyloid polypeptide gene expression in pancreatic b-cells, *J Biol Chem*, 272, 11986-11993.

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

Chartier, F.C., J.P. Bossu, V. Laudet, J.C. Fruchart and B. Laine (1994) Cloning and sequencing of cDNA encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver, *Gene*, 147, 269-272.

Chen, W.S., K. Manova, D.C. Weinstein, S.A. Duncan, A.S. Plump, V.R. Prezioso, R.F. Bachvarova and J.E.J. Darnell (1994) Disruption of the HNF-4 gene, expressed in the visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos, *Genes Dev.* 8, 2466-2477.

Chou, S. and K. Struhl (1997) Transcriptional activation by TFIIB mutants that are severely impaired in interaction with promoter DNA and acidic activation domains, *Mol. Cell. Biol.* 17, 6794-6802.

Chowdhury, S., T. Gotoh, M. Mori and M. Takiguchi (1996) Ccaat/enhancer-binding protein beta (c/ebp beta) binds and activates while hepatocyte nuclear factor-4 (hnf-4) does not bind but represses the liver-type arginase promoter, *Eur. J. Biochem.* 236, 500-509.

Chrivia, J.C., R.P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M.R. Montminy and R.H. Goodman (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP, *Nature*, 365, 855-859.

Cockell, M., D. Stolarczyk, S. Frutiger, G.J. Hughes, O. Hagenbuchle and P.K. Wellauer (1995) Binding sites for hepatocyte nuclear factor 3 beta or 3 gamma and pancreas transcription factor 1 are required for efficient expression of the gene encoding pancreatic alpha-amylase, *Mol. Cell. Biol.* 15, 1933-1941.

Costa, R.H., D.R. Grayson and J.E.J. Darnell (1989) Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and a1-antitrypsin genes, *Mol. Cell. Biol.* 9, 1415-1425.

Cuif, M.-H., M. Cognet, D. Boquet, G. Tremp, A. Kahn and S. Vaulont (1992) Elements responsible for hormonal control and tissue specificity of L-Type Pyruvate Kinase gene expression in transgenic mice, *Mol. Cell. Biol.* 12, 4852-4861.

Dell, H.J. and M. Hadzopoulou-Cladaras (1998) CREB-binding protein (CBP) is a transcriptional coactivator for hepatocyte nuclear Factor-4 (HNF-4) and enhances hepatic gene expression-- , Keystone Symposia. Nuclear Receptor gene family, Incline Village, Nev, 413(Abstract)

Drewes, T., S. Senkel, B. Holewa and G.U. Ryffel (1996) Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes, *Mol. Cell. Biol.* 16, 925-931.

Duncan, S.A., K. Manova, W.S. Chen, P. Hoodless, D.C. Weinstein, R.F. Bachvarova and J.E. Darnell, Jr. (1994) Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7598-7602.

Duncan, S.A., M.A. Navas, D. Dufort, J. Rossant and M. Stoffel (1998) Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science*, 281, 692-695.

Eckner, R., M.E. Ewen, D. Newsome, M. Gerdes, J.A. DeCaprio, J.B. Lawrence and D.M. Livingston (1994) Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E-1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor, *Genes Dev.* 8, 869-884.

Efrat, S., M. Leiser, Y.J. Wu, D. Fusco-DeMane, O.A. Emran, M. Suruna, T.L. Jetton, M.A. Magnuson, G. Weir and N. Fleischer (1994) Ribozyme-mediated attenuation of pancreatic beta-cell glucokinase expression in transgenic mice results in impaired glucose-induced insulin secretion, *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 91, 2051-2055.

Emens, L.A., D.W. Landers and L.G. Moss (1992) Hepatocyte nuclear factor 1a is expressed in a hamster insulinoma line and transactivates the rat insulin I gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7300-7304.

Erdmann, D. and J. Heim (1995) Orphan nuclear receptor HNF-4 binds to the human coagulation factor VI promoter, *J. Biol. Chem.* 270, 22988-22996.

Fraser, J.D., V. Martinez, R. Straney and M.R. Briggs (1998) DNA binding and transcription activation specificity of hepatocyte nuclear factor 4, *Nucleic. Acids. Res.* 26, 2702-2707.

Fuernkranz, H.A., Y. Wang, S.K. Karathanasis and P. Mak (1994) Transcriptional regulation of the apoAI gene by hepatic nuclear factor 4 in yeast, *Nucleic Acids Res.* 22, 5665-5671.

Furuta, H., N. Iwasaki, N. Oda, Y. Hinokio, Y. Horikawa, K. Yamagata, N. Yano, J. Sugahiro, M. Ogata, H. Ohgawara, Y. Omori, Y. Iwamoto and G.I. Bell (1997) Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY, *Diabetes*, 46, 1652-1657.

Gelman, L., B. Staels and J. Auwerx (1997) Role of transcriptional cofactors in nuclear receptor signalling transduction, *Med. Sci.* 13, 961-970.

German, M.S., L.G. Moss, J. Wang and W.J. Rutter (1992) The insulin and islet amyloid polypeptide genes contain similar cell-specific promoter elements that bind identical b-cell nuclear complexes, *Mol. Cell. Biol.* 12, 1777-1788.

Gidh-Jain, M., J. Takeda, A.J. Lange, N. Vionnet, M. Stoffel, P. Froguel, G. Velho, F. Sun and D. Cohen (1993) Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity : implications for structure/function relationships, *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 90, 1932-1936.

Hadzopoulou-Cladaras, M., E. Kistanova, C. Evagelopoulou, S. Zeng, C. Cladaras and J.A.A. Ladas (1997) Functional domains of the nuclear receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4, *J. Biol. Chem.* 272, 539-550.

Hani, E.H., L. Suaud, P. Boutin, J.-C. Chèvre, E. Durand, A. Philippi, F. Demenais, N. Vionnet, H. Furuta, G. Velho, G.I. Bell, B. Laine and P. Froguel (1998) A missense mutation in hepatocyte nuclear factor-4 a, resulting in a reduced transactivation activity, in human late-onset non insulin-dependent diabetes mellitus, *J. Clin. Invest.* 101, 521-526.

Harnish, D.C., S. Malik, E. Kilbourne, R. Costa and S.K. Karathanasis (1996) Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4, *J. Biol. Chem.* 271, 13621-13628.

Hata, S., T. Inoue, K. Kosuga, T. Nakashima, T. Tsukamoto and T. Osumi (1995) Identification of two splice isoforms of mRNA for mouse hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4), *Biochim. Biophys. Acta*, 1260, 55-61.

Herrera, P.L., J. Huarte, F. Sanvito, P. Meda, L. Orci and J.D. Vassalli (1991) Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene, *Development*, 113, 1257-1265.

Hertz, R., M. Seckbach, M.M. Zakin and J. Bar-Tana (1996) Transcriptional suppression of the transferrin gene by hypolipidemic peroxisome proliferators, *J. Biol. Chem.* 271, 218-224.

Hertz, R., J. Magenheimer, I. Berman and J. Bar-Tana (1998) Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4a, *Nature*, 392, 512-516.

Holewa, B., V. Pogge, E. Strandmann, D. Zapp, P. Lorenz and G.U. Ryffel (1996) Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF-4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1a (LFB1), *Mech. Dev.* 54, 45-57.

Holewa, B., D. Zapp, T. Drewes, S. Senkel and G.U. Ryffel (1997) HNF4 beta, a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*, *Mol. Cell. Biol.* 17, 687-694.

Hollenberg, S.M., C. Weinberger, E.S. Ong, G. Cerelli, A. Oro, R. Lebo, E.B. Thompson, M.G. Rosenfeld and R.M. Evans (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA, *Nature*, 318, 635-641.

Hong, H., K. Kohli, A. Trivedi, D.L. Johnson and M.R. Stallcup (1996) GRIP1, a novel mouse protein that serves as transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4948-4952.

Hong, H., K. Kohli, M.J. Garabedian and M.R. Stallcup (1997) GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors, *Mol. Cell. Biol.* 17, 2735-2744.

Horikawa, Y., N. Iwasaki, M. Hara, H. Furuta, Y. Hinokio, B.N. Cockburn, T. Lindner, K. Yamagata, M. Ogata, O. Tomonaga, H. Kuroki, T. Kasahara, Y. Iwamoto and G.I. Bell (1997) Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY, *Nat. Genet.* 17, 384-385.

Hung, H.L. and K.A. High (1996) Liver-enriched transcription factor HNF-4 and ubiquitous factor NF-Y are critical for expression of blood coagulation factor X, *J. Biol. Chem.* 271, 2323-2331.

Hussain, M.A., J. Lee, C.P. Miller and J.F. Habener (1997) POU domain transcription factor brain 4 confers pancreatic  $\alpha$ -cell-specific expression of the proglucagon gene through interaction with a novel proximal promoter G1 element, *Mol. Cell. Biol.* 17, 7186-7194.

Iyemere, V.P., N.H. Davies and G.G. Brownlee (1998) The activation function 2 domain of hepatic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal proline-rich repressor domain, *Nucleic. Acids. Res.* 26, 2098-2104.

Jiang, G., L. Nepomuceno, K. Hopkins and F.M. Sladek (1995) Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors, *Mol. Cell. Biol.* 15, 5131-5143.

Jiang, G. and F.M. Sladek (1997) The DNA binding domain of Hepatocyte Nuclear Factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor  $\alpha$ , *J. Biol. Chem.* 272, 1218-1225.

Jiang, G.Q., U. Lee and F.M. Sladek (1997a) Proposed mechanism for the stabilization of nuclear receptor DNA binding via protein dimerization, *Mol. Cell. Biol.* 17, 6546-6554.

Jiang, G.Q., L. Nepomuceno, Q. Yang and F.M. Sladek (1997b) Serine/threonine phosphorylation of orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4, *Arch. Biochem. Biophys.* 340, 1-9.

Jin, T. and D.J. Drucker (1996) Activation of proglucagon gene transcription through a novel promoter element by the caudal-related homeodomain protein *cdx-2/3*, *Mol. Cell. Biol.* 16, 19-28.

Kahn, A. (1997) Transcriptional regulation by glucose in the liver, *Biochimie*, 79, 113-118.

Kardassis, D., E. Sacharidou and V.I. Zannis (1998) Transactivation of the human apolipoprotein CII promoter by orphan and ligand-dependent nuclear receptors - The regulatory element CIIC is a thyroid hormone response element, *J. Biol. Chem.* 273, 17810-17816.

Kimura, A., A. Nishiyori, T. Murakami, T. Tsukamoto, S. Hata, T. Osumi, R. Okamura, M. Mori and M. Takiguchi (1993) Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithine transcarbamylase in a manner antagonistic to hepatocyte Nuclear Factor-4 (HNF-4). *J. Biol. Chem.* 268, 11125-11133.



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

Kritis, A.A., A. Argyrokastritis, N.K. Moschonas, S. Power, N. Katrakili, V.I. Zannis, S. Cereghini and I. Talianidis (1996) Isolation and characterization of a third isoform of human hepatocyte nuclear factor 4, *Gene*, 173, 275-280.

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

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

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

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

Kuo, C.J., P.B. Conley, L. Chen, F.M. Sladek, J.E.J. Darnell and G.R. Crabtree (1992) A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification, *Nature*, 355, 457-461.

Ladias, J.A.A., M. Hadzopoulou-Cladaras, D. Kardassis, P. Cardot, J. Cheng, V. Zannis and C. Cladaras (1992) Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes apoB, apoCIII, and apoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3, *J. Biol. Chem.* 267, 15849-15860.

Ladias, J.A.A. and S.K. Karathanasis (1991) Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily, *Science*, 251, 561-565.

Landry, C., F. Clotman, T. Hioki, H. Oda, J.J. Picard, F.P. Lemaigre and G.G. Rousseau (1997) HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo

and participates to the cross-regulatory network of liver-enriched transcription factors, *Dev. Biol.* 192, 247-257.

Laser, B., P. Meda, I. Constant and J. Philippe (1996) The caudal-related homeodomain protein Cdx-2/3 regulates glucagon gene expression in islet cells, *J. Biol. Chem.* 271, 28984-28994.

Laudet, V., C. Hänni, J. Coll, F. Catzeflis and D. Stéhelin (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily, *EMBO J.* 11, 1003-1013.

Lee, M.S., S.A. Kliewer, J. Provencal, P.E. Wright and R.M. Evans (1993) Structure of the retinoid X receptor alpha DBD binding domain : a helix required for homodimeric DNA binding, *Science*, 260, 1117-1121.

Lee, S.-K., S.-Y. Na, H.-J. Kim, J. Soh, H.-S. Choi and J.W. Lee (1998) Identification of critical residues for heterodimerization within the ligand-binding domain of retinoid X receptor, *Mol. Endocrinol.* 12, 325-332.

Lemaigre, F.P. and G.G. Rousseau (1994) Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver, *Biochem. J.* 303, 1-14.

Leonard, J., P. Serup, G. Gonzalez, T. Edlund and M. Montminy (1992) The LIM family transcription factor Isl-1 requires cAMPc response element binding protein to promote somatostatin expression in pancreatic islet cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6247-6251.

Leonard, J., B. Peers, T. Johnson, K. Ferreri, S. Lee and M.R. Montminy (1993) Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells, *Mol. Endocrinol.* 7, 1275-1283.

Levinson-Dushnik, M. and N. Benvenisty (1997) Involvement of hepatocyte nuclear factor 3 in endoderm differentiation of embryonic stem cells, *Mol. Cell. Biol.* 17, 3817-3822.

Lindner, T., C. Gragnoli, H. Furuta, B.N. Cockburn, C. Petzold, H. Rietzsch, U. Weiss, J. Schulze and G.I. Bell (1997) Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha 1/MODY1 gene, *J. Clin. Invest.* 100, 1400-1405.

Lu, M., J. Seufert and J.F. Habener (1997) Pancreatic b-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein b, *J. Biol. Chem.* 272, 28349-28359.

Ludvik, B., A. Kautzky-Willer, R. Prager, K. Thomaseth and G. Pacini (1997) Amylin : history and overview, *Diabet. Med*, 14, S9-S13.

Malecki, M.T., A. Antonellis, P. Casey, L.N. Ji, R. Wantman, J.H. Warram and A.S. Krolewski (1998) Exclusion of the hepatocyte nuclear factor 4 alpha as a candidate gene for late-onset NIDDM linked with chromosome 20q, *Diabetes*, 47, 970-972.

Malik, S. and S.K. Karathanasis (1996) TFIIB-directed transcriptional activation by the orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4, *Mol. Cell. Biol.* 16, 1824-1831.

Marten, N.W., F.M. Sladek and D.S. Straus (1996) Effect of dietary protein restriction on liver transcription factors, *Biochem. J.* 317, 361-370.

Metzger, S., J.L. Halaas, J.L. Breslow and F.M. Sladek (1993) Orphan receptor HNF-4 and bZip protein C/EBPa bind to overlapping regions of the apolipoprotein B gene promoter and synergistically activate transcription, *J. Biol. Chem.* 268, 16831-16838.

Miller, C.P., R.E. Mc Gehee, Jr and J.F. Habener (1994) IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene, *EMBO J.* 13, 1145-1156.

Miquerol, L., S. Lopez, N. Cartier, M. Tulliez, M. Raymondjean and A. Kahn (1994) Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas, *J. Biol. Chem.* 269, 8944-8951.

Miura, N. and K. Tanaka (1993) Analysis of the rat hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 gene promoter: synergistic activation by HNF4 and HNF1, *Nucleic Acids Res.* 21, 3731-3736.

Moller, A.M., S.A. Urhammer, L.T. Dalgaard, R. Reneland, L. Berglund, T. Hansen, J.O. Clausen, H. Lithell and O. Pedersen (1997) Studies of the genetic variability of the coding region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha in Caucasians with maturity onset NIDDM, *Diabetologia*, 40, 980-983.

Monnier, L. (1995) Diabète non insulino-dépendant, *La revue du praticien*, 45, 1941-1949.

Montano, M.M., V. Müller, A. Trobaugh and B.S. Katzenellenbogen (1995) The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the

receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists, *Mol. Endocrinol.* 9, 814-825.

Moriizumi, S., L. Gourdon, A.-M. Lefrançois-Martinez, A. Kahn and M. Raymondjean (1998) Effect of different basic helix-loop-helix leucine zipper factors on the glucose response unit of the L-Type Pyruvate Kinase gene, *Gene Expr.* 7, 103-113.

Mutoh, H., F.J. Naya, M.J. Tsai and A.B. Leiter (1998) The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells, *Gene Develop.* 12, 820-830.

Nakhei, H., A. Lingott, I. Lemm and G.U. Ryffel (1998) An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4 alpha predominates in undifferentiated murine cell types, *Nucleic. Acids. Res.* 26, 497-504.

Nichols, M., J.M.J. Rientjes and A.F. Stewart (1998) Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists, *EMBO J.* 17, 765-773.

Nishiyama, C., R. Hi, S. Osada and T. Osumi (1998) Functional interactions between nuclear receptors recognizing a common sequence element, the direct repeat motif spaced by one nucleotide (DR-1), *J. Biochem. Tokyo.* 123, 1174-1179.

Nitsch, D., M. Boschart and G. Schutz (1993) Activation of the tyrosine aminotransferase gene is dependent on synergy between liver-specific and hormone-responsive elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 90, 5479-5483.

O'Malley, B.W. and O.M. Conneely (1992) Orphan receptors : in search of a unifying hypothesis for activation, *Mol. Endocrinol.* 6, 1359-1361.

Ohlsson, H., K. Harlsson and T. Edlund (1993) IPF-1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene, *EMBO J.* 12, 4251-4259.

Petrucchio, S., P.K. Wellauer and O. Hagenbüchle (1990) The DNA-binding activity of transcription factor PTF1 parallels the synthesis of pancreas-specific mRNA during mouse development, *Mol. Cell. Biol.* 10, 254-264.

Philippe, J., D.J. Drucker, W. Knepel, L. Jepeal, Z. Misulovin and J.F. Habener (1988) Alpha-cell-specific expression of the glucagon gene is conferred to the glucagon promoter element by the interactions of DNA-binding proteins, *Mol. Cell. Biol.* 8, 4877-4888.

Rastinejad, F., T. Perlmann, R.M. Evans and P.B. Sigler (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats, *Nature*, 375, 203-211.

Rausa, F., U. Samadani, H. Ye, L. Lim, C.F. Fletcher, N.A. Jenkins, N.G. Copeland and R.H. Costa (1997) The cut-homeodomain transcriptional activator HNF-6 is coexpressed with its target gene HNF-3 beta in the developing murine liver and pancreas, *Dev. Biol.* 192, 228-246.

Renaud, J.-P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer and D. Moras (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid, *Nature*, 378, 681-689.

Rodriguez, J.C., J.A. Ortiz, F.G. Hegardt and D. Haro (1998) The hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) represses the mitochondrial HMG-CoA synthase gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 692-696.

Rottman, J.N. and J.I. Gordon (1993) Comparison of the patterns of expression of rat intestinal fatty acid binding protein/human growth hormone fusion genes in cultured intestinal epithelial cell lines and in the gut epithelium of transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 268, 11994-12002.

Rudnick, A., T.Y. Ling, H. Odagiri, W.J. Rutter and M.S. German (1994) Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12203-12207.

Samadani, U. and R.H. Costa (1996) The transcriptional activator hepatocyte nuclear factor 6 regulates liver gene expression, *Mol. Cell. Biol.* 16, 6273-6284.

Sander, M., A. Neubüser, J. Kalamaras, H.C. Ee, G.R. Martin and M.S. German (1997) Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development, *Gene Develop.* 11, 1662-1673.

Sander, M. and M.S. German (1997) The b cell transcription factors and development of the pancreas, *J. Mol. Med.* 75, 327-340.

Sharma, S., U.S. Jhala, T. Johnson, K. Ferreri, J. Leonard and M. Montminy (1997) Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene *STF-1*, *Mol. Cell. Biol.* 17, 2598-2604.

Silberg, D.G., E.E. Furth, J.K. Taylor, T. Schuck, T. Chiou and P.G. Traber (1997) CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium, *Gastroenterology*, 113, 478-486.

Slack, J.M.W. (1995) Developmental biology of the pancreas, *Development*, 121, 1569-1580.

Sladek, F.M., W. Zhong, E. Lai and J.E. Darnell, Jr. (1990) Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily, *Genes Dev.* 4, 2353-2365.

Sladek, F.M. (1994) Liver gene expression, Landes R.G. Co. Austin, Tex.

Sladek, F.M., Q. Dallas-Yang and L. Nepomuceno (1998) MODY1 mutation Q268X in hepatocyte nuclear factor 4 alpha allows for dimerization in solution but causes abnormal subcellular localization, *Diabetes*, 47, 985-990.

Späth, G.F. and M.C. Weiss (1997) Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells, *Mol. Cell. Biol.* 17, 1913-1922.

Stoffel, M. and S.A. Duncan (1997) The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13209-13214.

Stoffers, D.A., J. Ferrer, W.L. Clarke and J.F. Habener (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1, *Nat. Genet.* 17, 138-139.

Strom, A., S. Westin, H. Eguchi, J.A. Gustafsson and A. Mode (1995) Characterization of orphan nuclear receptor binding elements in sex-differentiated members of the CYP2C gene family expressed in rat liver, *J. Biol. Chem.* 270, 11276-11281.

Suh, E. and P.G. Traber (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation, *Mol. Cell. Biol.* 16, 619-625.

Sussel, L., J. Kalamaras, D.J. HartiganOConnor, J.J. Meneses, R.A. Pedersen, J.L.R. Rubenstein and M.S. German (1998) Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells, *Development*, 125, 2213-2221.

Swevers, L. and K. Iatrou (1998) The orphan receptor BmHNF-4 of the silkworm *Bombyx mori*: ovarian and zygotic expression of two mRNA isoforms encoding polypeptides with different activating domains, *Mech. Develop.* 72, 3-13.

Talianidis, I., A. Tambakaki, J. Toursounova and V.I. Zannis (1995) Complex interactions between SP1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF-4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human apo CIII gene, *Biochemistry*, 34, 10298-10309.

Velho, G., H. Blanche, M. Vaxillaire, C. Bellane-Chantelot, V.C. Pardini, J. Timsit, P. Passa, I. Deschamps, J.J. Robert, D. Marotta, S.J. Pilgis, G.M. Lipkind, G.I. Bell and P. Froguel (1997) Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families, *Diabetologia*, 40, 217-224.

Velho, G. and P. Froguel (1996) Le diabete de type MODY, *Diabétologie et facteurs de risque*, 2, 277-280.

Velho, G. and P. Froguel (1998) Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young, *Eur. J. Endocrinology*, 138, 233-239.

Verchere, C.B., D.A. D'Alessio, S. Wang, S. Andrikopoulos and S.E. Kahn (1997) Transgenic overproduction of islet amyloid polypeptide (amylin) is not sufficient for islet amyloid formation, *Horm. Metab. Res.* 29, 311-316.

Viollet, B., A. Kahn and M. Raymondjean (1997) Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4, *Mol. Cell. Biol.* 17, 4208-4219.

Weinstein, D.C., A. Ruiz i Altaba, W.S. Chen, P. Hoodless, V.R. Prezioso, T.M. Jessell and J.E. Darnell, Jr. (1994) The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo, *Cell*, 78, 575-588.

Wilson, T.E., R.E. Paulsen, K.A. Padgett and J. Milbrandt (1992) Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors, *Science*, 256, 107-110.

Wu, K.-L., M. Gannon, M. Peshavaria, M.F. Offield, E. Henderson, M. Ray, A. Marks, L.W. Gamer, C.V.E. Wright and R. Stein (1997) Hepatocyte Nuclear Factor 3b is involved in pancreatic b-cell specific transcription of the *pdx-1* gene, *Mol. Cell. Biol.* 17, 6002-6013.

Xu, J., Z. Nawaz, S.Y. Tsai, M.J. Tsai and B.W. O'Malley (1996) The extreme C terminus of progesterone receptor contains a transcriptional repressor domain that functions through a putative corepressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12195-12199.

Yamagata, K., H. Furuta, N. Oda, P.J. Kaisaki, S. Menzel, N.J. Cox, S.S. Fajans, S. Signorini, M. Stoffel and G.I. Bell (1996a) Mutations In the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1), *Nature*, 384, 458-460.

Yamagata, K., N. Oda, P.J. Kaisaki, S. Menzel, H. Furuta, M. Vaxillaire, L. Southam, R.D. Cox, G.M. Lathrop, V.V. Boriraj, X.N. Chen, N.J. Cox, Y. Oda, H. Yano, M.M. LeBeau, S. Yamada, H. Nishigori, J. Takeda, S.S. Fajans, A.T. Hattersley, N. Iwasaki, T. Hansen, O. Pedersen, K.S. Polonsky, R.C. Turner, G. Velho, J.C. Chevre, P. Froguel and G.I. Bell (1996b) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3), *Nature*, 384, 455-458.

Yokomori, N., K. Nishio, K. Aida and M. Negishi (1997) Transcriptional regulation by HNF-4 of the steroid 15 alpha-hydroxylase P450 (Cyp2a-4) gene in mouse liver, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 307-314.

Yoshida, E., S. Aratani, H. Itou, M. Miyagishi, M. Takiguchi, T. Osumu, K. Murakami and A. Fukamizu (1997) Functional association between CBP and HNF4 in trans-activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 664-669.

Zangen, D.H., S. Bonner-Weir, C.H. Lee, J.B. Latimer, C.P. Miller, J.F. Habener and G.C. Weir (1997) Reduced insulin, GLUT-2, and IDX-1 in beta-cells after partial pancreatectomy, *Diabetes*, 46, 258-264.

Zelent, A., C. Mendelsohn, P. Kastner, A.T. Krust, J.M. Garnier, F. Ruffenach, P. Leroy and P. Chambon (1991) Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor b are generated by usage of two promoters and alternative splicing, *EMBO J.* 10, 71-81.

Zhong, W., F.M. Sladek and J.E.J. Darnell (1993) The expression pattern of a *Drosophila* homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation, *EMBO J.* 12, 537-544.

