Univerzita Karlova v Praze
Charles University in Prague

Přírodovědecká fakulta
Faculty of Science

Vývojová a buněčná biologie
Developmental and cell biology

Autoreferát dizertační práce
Summary of the thesis

Význam lokalizace: funkce paxillinu a fosfolipidů v buněčném jádře

Localization matters: function of paxillin and phospholipids in the cell nucleus

Ing. Pavel Marášek

Školitel/Supervisor: Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

Praha, 2015

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze

a Akademie věd České republiky

Program: VÝVOJOVÁ A BUNĚČNÁ BIOLOGIE

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Jan Černý, Ph.D.

Školicí pracoviště: Oddělení biologie buněčného jádra, ÚMG AV ČR, v.v.i.

Autor: Ing. Pavel Marášek

Školitel: Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

S disertací je možno se seznámit na děkanátě

Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze

ABSTRACT

Both paxillin and PIP2 are well known components of the cell, although of a distinct origin. Focal adhesion protein paxillin spreads the signals from extracellular matrix via integrins and growth factor receptors to affect cellular motility and migration (Schaller, 2001). PIP2, a major structural component of cytoplasmic membrane, is utilized by phospholipase C to generate second messenger molecules (Hokin and Hokin 1953; Streb a kol. 1983). Both molecules were recently shown to be localized in the nucleus. Their original functions have been well established, but together with other research colleagues we are now shedding more light on completely different functions of these biological molecules and moreover, in the different compartments than they were primarily believed to function in.

Here, we introduce paxillin as an important factor of the cell nucleus, where it regulates transcription of two important growth-related genes, *IGF2* and *H19*. It does not affect the allelic expression of these imprinted genes, it rather regulates long-range chromosomal interactions between *H19* or *IGF2* promoter, and the shared distal enhacer on an active allele. In detail, paxillin stimulates the interaction between the enhancer and the *IGF2* promoter, activating *IGF2* gene transcription, while it restrains the interaction between the enhancer and the *H19* promoter, downregulating the *H19* gene. We identified paxillin in complex with cohesin and Mediator of RNA polymerase II, and we propose that this complex mediates the activity of the *IGF2*/*H19* gene cluster. We present a novel mechanism for gene regulation by a focal adhesion protein paxillin. Our observations contribute to a mechanistic explanation of paxillin role in proliferation and fetal development.

We further present here two aspects of nuclear-localized PIP2. First, we show that PIP2 isa stable component of RNA Pol I transcription complex throughout the whole cell cycle indicating its wider role in nucleolar organization. Second, we state here for the first time that a significant portion of nuclear PIP2 is located in previously uncharacterized spherical structures, which are distinct from nuclear speckles and we refer to them as PIP2 islets. They are surrounded by nucleic acids and proteins, while the inner space seems to be mainly composed of carbon-rich compounds. We show that PIP2 islets are evolutionary conserved from protozoa to human and we link them to RNA Pol II transcription, since they co-localize with nascent RNA transcripts and their depletion by PLC enzyme reduces the level of transcription.

INTRODUCTION

1. Paxillin and its nuclear activity

Paxillin was first identified as a 68 kDa protein exhibiting a significant phophorylation increase on tyrosine in the cells transformed by the src oncogene (Glenney Jr and Zokas, 1989). Paxillin preferentially localizes to sites of cell adhesion to the extracellular matrix (ECM), which are called focal complexes or focal adhesions. They form a structural link between the ECM and the actin cytoskeleton and are important sites of signal transduction, especially arising from activation of integrins or resulting from stimulation of grow factor receptors (Hynes, 1992). Paxillin does not exhibit enzymatic activity, but it serves as an adaptor that provides platform with multiple docking sites for signalling and structural proteins, and thus facilitates the assembly of multi-protein complexes to coordinate signaling (Schaller, 2001).

Although paxillin primarily localizes to focal adhesions, recently several evidence appeared detecting translocation of paxillin into the nucleus and proposing its nuclear functions. The treatment of fibroblasts with leptomycin B caused retention of paxillin in the nucleus, providing evidence for shuttling between cytoplasm and the nucleus (Woods et al., 2002). This observation evoked discovering paxillin NES and NLS. Paxillin does not contain a traditional NLS. Paxillin promotes unconventional translocation sequence, which is not determined yet, or it enters nucleus in association with other proteins containing regular NLS (Thomas et al., 1999; Wang and Gilmore, 2003). Recently the paxillin NES was uncovered within the LD4 motif. Its deletion leads to retention of paxillin inside the nucleus. In addition, phosphorylation of Ser272 within LD4 blocks nuclear export and also reduces GIT1, but not FAK1 binding (Fig. 1). Curiously, LD4 requires LD3 to behave as a functional NES. There is a hypothesis that LD3 might provide a platform to promote Ser272 dephosphorylation (Dong et al., 2009).

Less is known about regulative activity of paxillin in the nucleus. The translocation of paxillin into the nucleus promotes DNA synthesis and cell proliferation. Whereas increased levels of paxillin (predominantly cytoplasmic) are not able to regulate these processes, the N-terminal-truncated form, which is nuclear-enriched, is sufficient to enhance the number of cells entering the cell cycle and thus cell proliferation (Dong et al., 2009). In the regulation of transcription, paxillin is involved in regulation of the *H19* gene expression. This finding was discovered after paxillin overexpression (Dong et al., 2009). The *H19* was the first identified imprinted gene located within the *IGF2/H19* (insulin-like growth factor 2) locus. The *H19*

gene encodes a 2.5 kb fully capped, spliced and polyadenylated, but untranslated RNA. (Arney, 2003). In spite of significant interest, the *H19* gene function is not understood. It has been suggested to function as a tumor suppressor as well as promoter of tumorigenesis (Steenman et al, 1994; Okamoto et al., 1997; Berteaux et al., 2005).

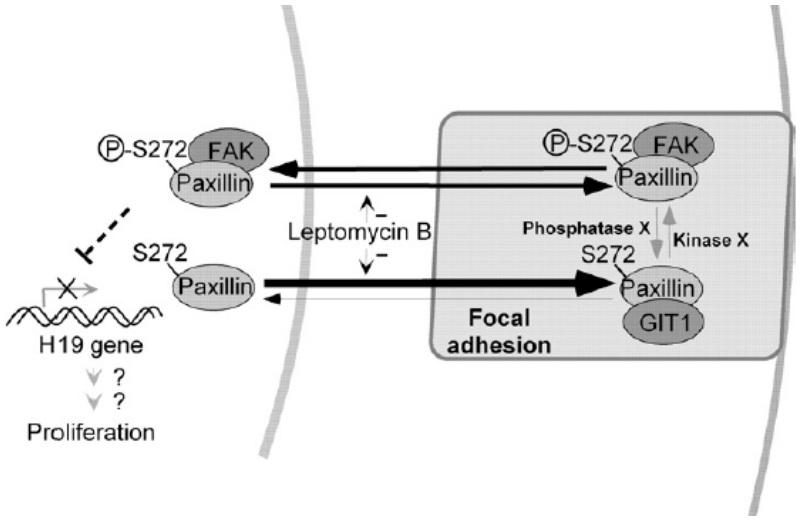


Fig. 1 Proposed model for regulation of paxillin nucleocytoplasmic shuttling
Phosphorylation of paxillin at Ser272 favours association with focal adhesion kinase (FAK) and can contribute to nuclear retention of paxillin, where it might also be associated with nuclear FAK. In the nucleus paxillin can suppresses expression of H19 gene, thus promoting proliferation (Dong et al., 2009).

2. Mammalian Igf2/H19 imprinted cluster

The reciprocal imprinting of the *Igf2* and *H19* genes is mechanistically coupled. *H19* is maternally expressed and *Igf2* paternally expressed. The regulation of imprinting is dependent on paternal-specific DNA methylation within the differentialy methylated regions (DMRs) to maintain monoallelic expression. Two DMRs exist for *Igf2* and both are paternally methylated. The DMR2 is located in exon 6 of *Igf2* and serves as an enhancer activated by methylation (Constancia et al., 2000; Murrell a kol., 2001). *H19* has one ICR which is located 2-4 kb upstream from the transcriptional start site of *H19* gene and is also paternally methylated (Bartolomei et al., 1993; Tremblay et al., 1997). The deletions of the *H19* ICR and *Igf2* DMR1 result in biallelic expression of both the *H19* and *Igf2* (Arney, 2003).

During the development, both genes share regulatory elements that are located downstream of *H19.* Two sets of endoderm-specific enhancers are located ~10 kb downstream of *H19* and these have been shown to regulate the expression of *H19* as well as *Igf2* (Fig. 2; Leighton et al. 1995b; Kaffer et al. 2000). Recently, these enhancers were shown to be bound by

transcription factor ZAC1, which effects RNA level of these two genes, as well as other imprinted genes (Dlk1 and Cdkn1c; Varrault et al., 2006). It was shown that imprinting mechanism of the *Igf2/H19* locus also involves cohesin-directed intrachromosomal looping. This has produced several models showing each (maternal and paternal) allele to have a particular structure and position in the nucleus due to interactions between different control regions (Weber et al. 2003; Kurukuti et al., 2006, Murrell et al., 2004, Yoon et al., 2007, Kato and Sasaki, 2005, Han et al., 2008).

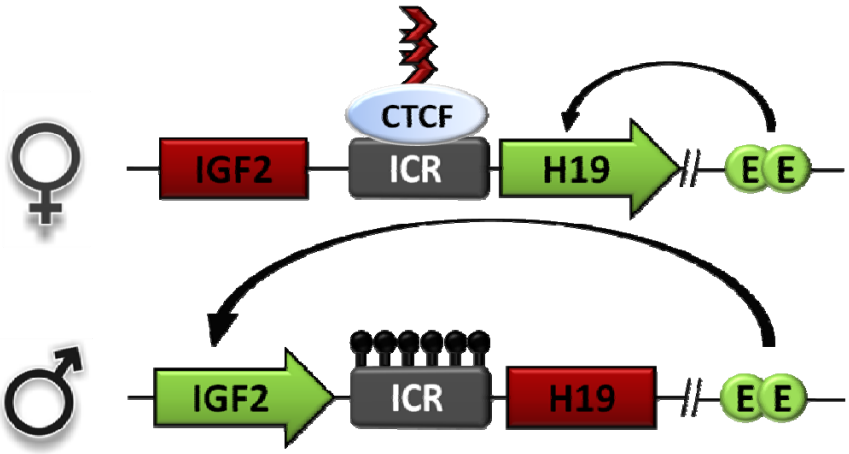


Fig. 2 Simplified model of *Igf2/H19* imprinted cluster regulation
Imprinting of this cluster involves the evolutionarily conserved CCCTC-binding factor (CTCF). This zinc-finger insulator protein binds exclusively to the unmethylated maternal ICR (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000) and acts as an insulator, blocking access of the shared enhancer to *Igf2* promoter (Szabó et al., 2004). Paternal methylation of the *H19* ICR inhibits CTCF binding, allowing enhancer to access the *Igf2* promoter on the paternal chromosome (Murrell et al. 2004; Kurukuti et al. 2006); red box – inactive gene, green box – active gene, black lollipops – methylation, dark red arrows – antagonizing barrier.

While the *Igf2* locus encodes insulin-like growth factor-2 (Igf2), which is a growth-promoting peptide hormone, the *H19* locus encodes a non-coding RNA (ncRNA) that gives rise to microRNAs (miRNAs) that have opposite effect on cell proliferation (Gabory et al., 2010). The dual „yin-yang“ function of this locus requires properly balanced expression of *Igf2* and *H19* which is critical primarily for normal fetal development (Reik and Walter, 2001, Pannetier and Feil, 2007, Bartolomei and Ferguson-Smith, 2011).

3. Phosphoinositides and their structure

Phosphoinositides contain two long hydrophobic fatty acyl tails linked to a glycerol group, which is bound via a phosphodiester bond to the hydrophilic inositol head group. Reversible phosphorylation at the 3, 4 or 5 position of the *myo*-inositol ring generates seven different phosphoinositides (Fig. 3): PI3P, PI4P, PI5P, PI(3,4)P_2, PI(3,5)P_2, PI(4,5)P_2 and PI(3,4,5)P_3 (Irvine, 2003). Number of kinases, phosphatases and phospholipases maintain the level of PIPs and the activities of these enzymes may be altered in response to various stimuli, which in turn leads to a change in the profile of PIPs (van den Bout and Divecha, 2009).

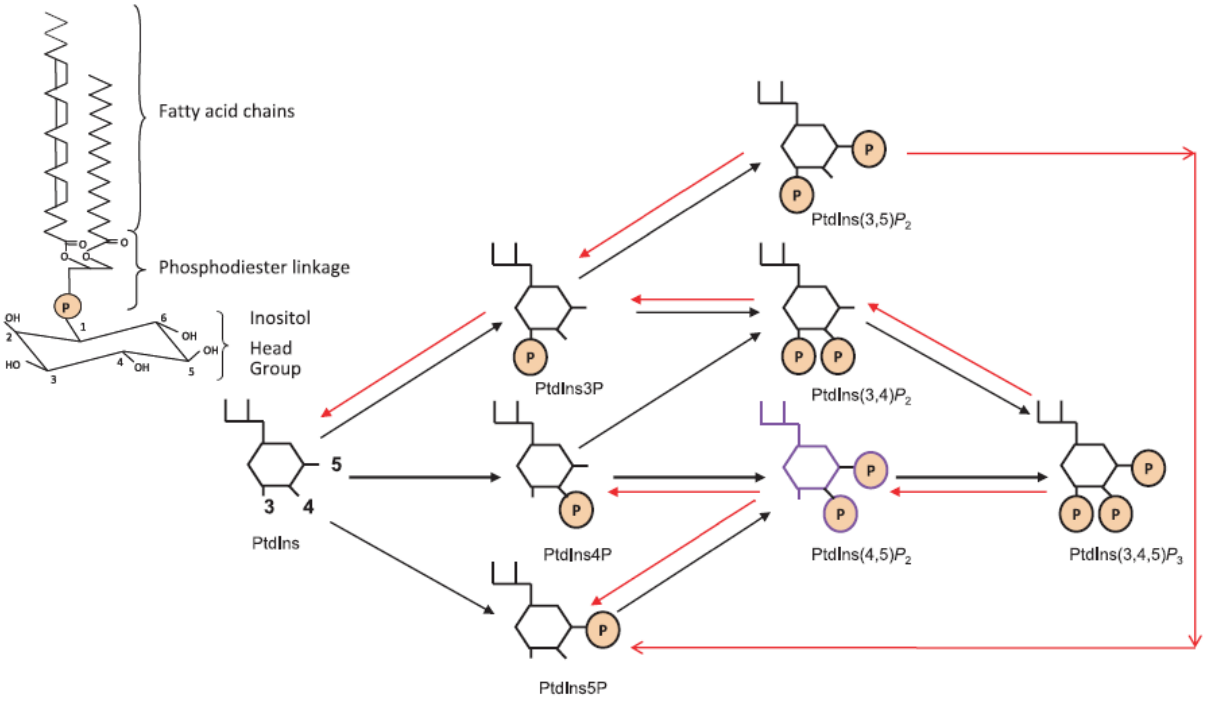


Fig. 3 Structure and complex map of nuclear phosphoinositides (PIPs)
PIPs comprise of two hydrophobic fatty acyl chains and the hydrophilic inositol head group linked to a glycerol group. Number of kinases and phosphatases generate seven different phosphoinositides : PI3P, PI4P, PI5P, PI(3,4)P2, PI(3,5)P2, PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 . The kinase reactions are indicated by black arrows and the phosphatase reactions are indicated by red arrows, for simplicity enzymes are not shown; adopted from Shah et al., 2013.

3.1. Nuclear phosphoinositides and their functions

In the cytosol, phosphoinositides (PIPs) are tightly anchored in the membrane, where they act to concentrate upstream regulators and downstream targets together leading to faster signalling and specificity (Cocco et al., 1988; McCrea and De Camilli, 2009). Phosphoinositide metabolism also occurs within the nucleus. When isolated nuclei were incubated with radiolabeled ^{32}P-ATP, radioactivity is incorporated into phosphatidylinositol phosphates (PIPs; Smith and Wells, 1983a, b, 1984a, b). Both nuclear and cytoplasmic PIPs

share regulatory enzymes, most of them are not exclusively localized to cytoplasm or the nucleus (Boronenkov et al., 1998; Doughman et al., 2003; Schill and Anderson, 2009). Thus PIPs may be synthesized in the nucleus. Nuclear functions of various PIPs are summarized in Table I.

Table I Functions of various nuclear phospholipids

Inositol molecule	Enzyme	Localization	Effectors	Function	Reference
PI3P	PI3-kinase	Nucleolus, NM	?	Cell cycle regulation	Gillooly et al., 2000; Visnjic and Banfic, 2007
PI4P	PI4-kinase	NM	?	Cell cycle, PI4,5P2 precursor	Payrastre et al. 1992
PI5P	PI5-kinase	NM, chromatin	ING, others?	Chromatin organization, apoptosis, DNA damage	Gozani et al., 2003
PI3,4P2	SHIP-2, PIPK IIβ	Membrane, Nuclear speckles	?	Pre-mRNA splicing	Yokogawa et al., 2000; Déléris et al., 2003
PI4,5P2	PIPK Iα, PIPK Iiβ	Membrane, Nuclear speckles, NM, Chromatin	Star-PAP, ING2, ALY, BRG1	3´-end processing, splicing, chromatin organization, precursor IP3	Osborne et al., 2001; Mellman et al., 2008
PI3,4,5P3	PIPK I, PIP3K	NM	PIP3BP, others?	Cell cycle, differentiation, proliferation	Tanaka et al., 1999; Neri et al., 2002
DAG	PI-PLC	NM	?	Cell cycle, differentiation, proliferation	Goto et al., 2006
Ins4,5,P3	PI-PLC	NM	?	Calcium signaling	Echevarría et al., 2003
IPn	IPn kinases	NM, chromatin	?	mRNA export, chromatin structure	York and Majerus, 1994; Steger et al., 2003

Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) is the predominant regulatory molecule not only in cytoplasm, but also in the nuclear compartment. There are three classes of phosphatidylinositol phosphate kinases (I, II and III). Type I and II kinases both generate PIP2, although by utilizing different substrates, PI4P and PI5P, respectively (Rameh et al., 1997; Anderson et al., 1999; Halstead et al., 2005; Fiume et al., 2012). Metabolic radioisotope labeling in rat liver nuclei revealed that the predominant way of PIP2 production in the nucleus is phosphorylating PI4P by the type I PIPK as it is also in whole cell (Vann et al., 1997).

AIMS

PART I - NUCLEAR FUNCTION OF PAXILLIN

1) What is the mechanism underlying paxillin role in gene expression?
2) What is the paxillin role in respect to the *IGF2/H19* imprinted cluster?
3) Which proteins/protein complexes interact with paxillin in the nucleus?

PART II - NUCLEAR PIP2

1) Does the interaction between PIP2 and RNA Pol I trancription complex depend on the active transcription or it is preserved throughout the cell cycle?
2) What is the detailed localization of nuclear PIP2?
3) What are the possible functions of PIP2 islets? Do they affect the RNA polymerase II transcription machinery?

RESULTS

I. NUCLEAR FUNCTION OF PAXILLIN

Paxillin knockdown promotes gene *H19* expression and slows down proliferation in human HepG2 cells

Importantly, in accordance with published data, the depletion of paxillin resulted in upregulation of *H19* transcription by about 2-fold compared to control cells. We observed a slight decrease in *IGF2* expression, however, the difference was not statistically significant ($p > 0,05$). BrdU assay showed that knockdown of paxillin and subsequent *H19* upregulation results in decreased number of cells incorporating BrdU within DNA.

Paxillin regulates *IGF2* and *H19* promoter activity via their shared distant enhancer

The lack of paxillin increases the activity of *H19* promoter via its enhancer and decreases activity of the *IGF2* promoter. In other words, normal paxillin levels are likely to have a repressive effect on the *H19* promoter and a positive effect on the *IGF2* promoter. Importantly, paxillin does not regulate these promoters directly, but via the distant shared enhancer.

Paxillin interacts with *IGF2*P3/*H19* promoters and their enhancer

ChIP analysis revealed that paxillin interacts predominantly with the *H19* promoter. The interaction of paxillin with *IGF2* P3 promoter and their shared enhancer was weaker while no binding to the ICR region was detected. These results indicate that paxillin binds both key transcription elements – promoter and enhancer – and might therefore regulate their mutual interaction.

Paxillin regulates the IGF2P3/H19 promoter-enhancer interaction

Paxillin regulates the activation of the *IGF2* P3 and *H19* promoters via the same shared enhancer, and that it does so in an opposite manner. In other words, paxillin promotes the contact of the *IGF2* P3 promoter and the enhancer, while simultaneously blocking the activation of the *H19* promoter.

Paxillin binds SMC1, SMC3 and MED in the nucleus

Two proteins of cohesin family were repeatedly identified in paxillin pull-down experiments, namely structural maintenance of chromosomes 1A (SMC1A) and Structural maintenance of chromosomes 3 (SMC3). Further, we also identified 3 subunits of MED complex, specifically MED15, MED24 and MED23. The specificity of the identified interactions was confirmed by Western blotting. Both SMC1 and SMC3 proteins, as well as MED23 were found in paxillin pull-down fraction, but not in the control, which corresponds with our MS data.

II. PIP2 IN RNA POLYMERASE I TRANSCRIPTION

PIP2 associates with RNA Polymerase I pre-initiation complex in mitotic cells

We specifically detected UBF and two subunits of Pol I, PAF53 and RPA116, co-immunoprecipitating with PIP2. This clearly shows that PIP2 interacts with Pol I transcription complex also during mitosis.

PIP2 is a stable component of the Pol I pre-inititation complex throughout all mitotic phases

We observed co-localization of PIP2 and UBF during all mitotic phases. SIM showed colocalization between PIP2 and UBF in NORs throughout prophase and metaphase, continuing in "daughter" NORs in the anaphase and telophase. Electron microscopy

confirmed colocalization of PIP2 with UBF in clearly distinguishable NORs from prophase to telophase.

Inhibition of transcription abolishes association of PIP2 with fibrillarin but not UBF and Pol I

The association of PIP2 with the Pol I and UBF is not dependent on active Pol I transcription, while fibrillarin associates with PIP2 only when transctiption of Pol I is active.

III. PIP2 ISLETS

The distribution of PIP2 in the nucleus

We revealed that nuclear PIP2 occupies three different regions: speckles, nucleoli and significant portion of nuclear PIP2 is concentrated in previously uncharacterized structures. These structures are clearly distinguished from the nuclear speckles by the size and roundish shape. Here we refer to them as PIP2 islets.

PIP2 islets are enriched in carbon-rich compounds and surrounded by nucleic acids and proteins

We showed that PIP2 islets are enclosed by nucleic acids and proteins, while the inner space of PIP2 islets seems to lack them both. We revealed that the interior of PIP2 islets is mainly composed of carbon-rich compounds.

PIP2 islets are evolutionary conserved nuclear structures

We demonstrated that 40-100 nm large PIP2 islets are present in nuclei of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), protozoa (*Giardia lamblia*, *Tetrahymena thermophila*), beans (*Vicia*; germinated bean meristem cells), mice (*Mus musculus*; primary skin fibroblasts), and humans (*Homo sapiens:* mesenchymal stem cells, stimulated lymphocytes, cervical carcinoma cells).

PIP2 islets are involved in RNA polymerase II transcription

We showed that PIP2 islets co-localize with C-terminal domain of Pol II, TATA-box binding protein (TBP) as well as nascent RNA transcripts. We hydrolyzed PIP2 by incubating the cells with phospholipase C enzyme. This resulted in reduction of the transcription level by 36.5%. Remarkably, the same effect was observed in PIP2 islets only, here the reduction of the PIP2 level by 18.1% resulted in decrease of the transcription level by 36.1%

DISCUSSION

Nuclear functions of paxillin

We showed that paxillin regulates the formation of long-range interactions between promoters of *H19* and *IGF2* genes and their shared enhancer. Finally, we identified the interaction of paxillin with cohesin complex (subunit SMC1, SMC3). Interestingly, cohesion complex has been established as the main regulator of long-range chromatin interactions at *IGF2*/*H19* cluster (Wendt et al. 2008; Nativio et al., 2009). Moreover, cohesin has been found to colocalize with Mediator (Kagey et al., 2010). These proteins have been shown to mediate long-range interactions between distal enhancers and promoters of key pluripotency transcription factors in mouse embryonic stem cells (Conaway and Conaway, 2011).

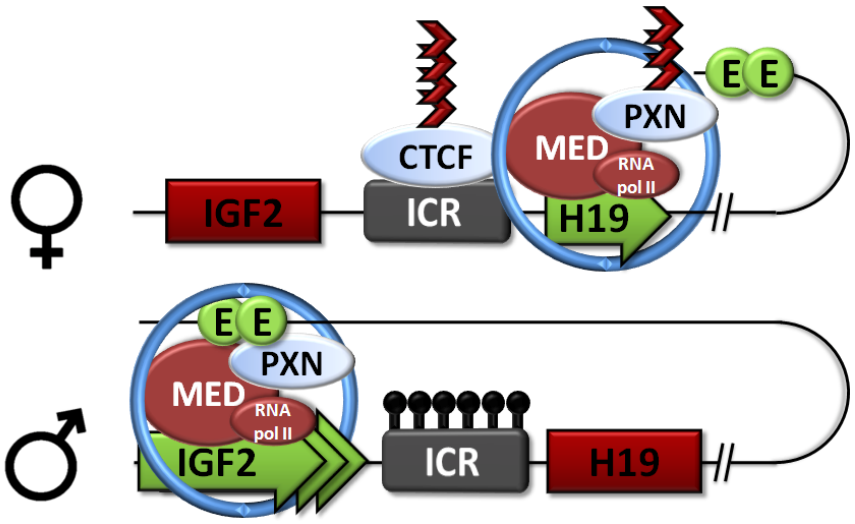


Fig. 4 Model of *IGF2*/*H19* regulation by paxillin
The model of the *IGF2*/*H19* locus regulation. Paxillin assembles with cohesin and Mediator and mediates long-range chromosomal interactions between *IGF2* or *H19* promoter and the shared distal enhacer, and thus regulates their transcription. Specifically, paxillin enhances the interaction between the enhancer and the *IGF2* promoter, but blocks the *H19* promoter–enhancer interaction, resulting in stimulation of *IGF2* and repression of *H19* expression. The model shows paternal and maternal allele of the genes; red box – inactive gene, green box – active gene, black lollipops – methylation, blue circle – cohesin complex, dark red arrows – ICR barrier.

We indeed found subunits of Mediator, specifically its tail module (Malik and Roeder, 2010), among paxillin associated proteins in pull-down experiments. Therefore, we propose a model (Fig. 4) where paxillin assembles with cohesin and Mediator and mediates long-range chromosomal interactions between *IGF2* or *H19* promoter and the shared distal enhacer, and

thus regulates their transcription. Specifically, paxillin enhances the interaction between the enhancer and the *IGF2* promoter, but blocks the *H19* promoter–enhancer interaction, resulting in stimulation of *IGF2* and repression of *H19* expression. Our model also explains significant decrease in cell proliferation after paxillin depletion, since it causes upregulation of *H19* non-coding RNA giving rise to proliferation-repressing microRNAs (miRNAs; Gabory et al., 2010). Both *IGF2* and *H19* genes are widely expressed during embryonic development, after which they are downregulated (except in skeletal muscle; Brunkow and Tilgham, 1991; Delaval and Feil, 2004). Their proper expression is therefore crucial especially during fetal development (Delaval and Feil, 2004; Pannetier and Feil, 2007; Gabory et al., 2010) and even though their regulatory mechanisms are preserved in cultured somatic cells, we presume that the real significance of paxillin regulatory model lies in the developmental stages.

Based on our findings, we propose a novel regulatory mechanism for *IGF2*/*H19* locus employing paxilllin in a complex with cohesin and Mediator, which mediate promoter-enhacer interactions. Taking into consideration that paxillin is a focal adhesion protein, this shows that cells regulate gene expression by taking advantage of the physical barrier formed by the nuclear envelope and thus controlling the access of regulators to their target genes.

Localization and function of nuclear phopholipids

We found that upon either physiological (mitosis) or chemically induced (AMD) inhibition of Pol I transcription, PIP2 maintains its association with UBF and Pol I subunits, the components of Pol I pre-initiation complex, but not with fibrillarin. It has been shown that Pol I subunit PAF53 contacts UBF directly, and both PAF53 and RPA116 subunits remain associated with Pol I transcription machinery independent of the rRNA synthesis (Hanada et al., 1996; Seither et al., 1997). These data reinforce the view that PIP2 interacts with fibrillarin only upon active pre-rRNA transcription while its binding to UBF in Pol I complex is not dependent on the synthesis of rRNA. UBF associates with the extended fibers of rDNA during the entire cell cycle (Gebrane-Younes et al., 1997) and has been reported to have a role in the formation of nucleoli (Fomproix et al., 1998; Mais et al., 2005). We showed that association of PIP2 and UBF is preserved throughout the whole cell cycle, indicating a structural role of PIP2 in the formation and maintenance of nucleolar architecture. We suggest that PIP2 in complex with UBF is engaged in the formation of the core part of rDNA helix structure thus maintaining the open chromatin state of NORs independent of the Pol I transcription.

We used electron microscopy and 3D electron tomography to examine detailed PIP2 localization in the nucleus and revealed for the first time that PIP2 forms structures, different from nuclear speckles. These spherical structures, which form about one third of total nuclear pool, are 40-100 nm in diameter and we called them "PIP2 islets". The elemental mapping showed that PIP2 islets are characterized by carbon-rich interior, which is surrounded by nucleic acids and proteins. Thus, we suggest that organization of PIP2 islets reflects vesicle arrangement: hydrophobic interior surrounded by a hydrophilic outward part. Remarkably, we showed that PIP2 islets are chomatin-independent which is consistent with earlier observations that sphingomyelin is localized in the perichromatin region, where DNA replication and transcription occur, and is excluded from the condensed chromatin region (Jaunin and Fakan, 2002; Fakan, 2004; Scassellati et al., 2010).

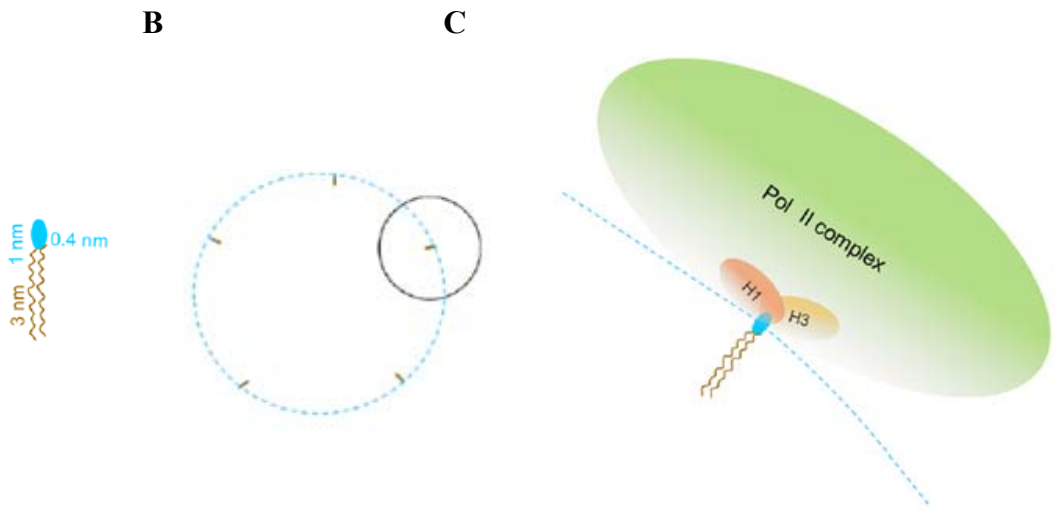


Fig. 5 The proposed model of PIP2 islet associated with RNA polymerase II transcription complex
The size of PIP2 molecule. B) PIP2 islet (blue dashed circle) is schematically drawn in proportion to the size of PIP2 molecule. C) Magnified view of the surface of PIP2 islet, corresponding to the area outlined in black. We propose that the PIP2 islet serves as a docking station for the Pol II transcription complex.

Osborne et al (2001) showed the association of PIP2 with hyperphosphorylated Pol II and snRNAs, providing an evidence of the involvement of PIP2 in mRNA splicing. We showed that PIP2 islets co-localize with nascent RNA transcripts and both Pol II CTD and TFIID TBP, which form the core of transcription complex and initiate transcription. Moreover, PIP2 hydrolysis upon PLC treatment resulted in the significant reduction of the transcription level in the whole nucleus as well as in PIP2 islets. We propose a model (Fig. 5) of the mutual arrangement of PIP2 molecules and PIP2 islet-associated proteins in the nuclear space. We

suggest that PIP2 islets provide surface for the Pol II transcription, serving as the docking stations for the formation of the Pol II transcription complexes.

CONCLUSIONS

PART I – NUCLEAR FUNCTION OF PAXILLIN

Paxillin regulates expression of growth-related genes *IGF2* and *H19* in human cells
We present a novel proliferation-regulatory pathway where paxillin enhances the transcription of *IGF2* growth-promoting peptide, while it suppresses the expression of growth-repressing gene *H19*.

Paxillin controls expression of *H19* and *IGF2* by regulating promoter-enhancer interactions
We show that paxillin regulates long-range chromosomal interactions formed between promoters of the *IGF2*/*H19* genes and the enhancer. In detail, paxillin stimulates the interaction between the enhnacer and the *IGF2* promoter and thus enhances the transcription of *IGF2*. Concurrently, it restrains the interaction between enhancer and the *H19* promoter, suppressing the expression of *H19*.

Paxillin mediates nuclear functions via binding to cohesin and Mediator complex
We show that paxillin interacts with cohesin and Mediator which have been shown to mediate long-range chromosomal looping. We propose that these interactions occur at the *IGF2*/*H19* gene cluster, regulating the formation of loops between the *IGF2*/*H19* promoters and the enhacer and thus their expression.

PART II - NUCLEAR PIP2

PIP2 is a stable component of RNA pol I transcription complex throughout the whole cell cycle
PIP2 is associated with Pol I subunits and UBF in a transcription-independent manner throughouth the whole cell cycle indicating that PIP2 plays wider role in nucleolar organization.

PIP2 forms spherical structures in nucleoplasm – „PIP2 islets“
We show that substantial part of nuclear PIP2 is located in previously uncharacterized structures, which are distinct from nuclear speckles and we refer to them as PIP2 islets. They are surrounded by nucleic acids and proteins, while the inner space seems to be mainly composed of carbon-rich compounds. We showed that PIP2 islets are evolutionary conserved from protozoa to human.

PIP2 islets are involved in RNA Pol II transcription
We show that PIP2 islets colocalize with C-terminal domain of Pol II, TATA-box binding protein (TBP) as well as nascent RNA transcripts. Moreover, PIP2 hydrolysis with PLC enzyme reduces the level of RNA pol II transcription. We propose that PIP2 islets are involved in RNA pol II transcription.

REFERENCES

Anderson R. A., Boronenkov I. V., Doughman S. D., Kunz J., Loijens J. C. (1999). Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. J. Biol. Chem., 274, 9907–9910.

Arney K. L. (2003). *H19* and *Igf2*: enhancing the confusion?. Trends Genet., 19, 17–23.

Bartolomei M. S., Webber A. L., Brunkow M. E., Tilghman S. M. (1993). Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse *H19* gene. Genes Dev., 7, 1663–1673.

Bartolomei S. M. and Ferguson-Smith A. C. (2011). Mammalian Genomic imprinting. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 3, 1-17.

Bell A. C. and Felsenfeld G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. Nature, 405, 482–485.

Berteaux N., Lottin S., Monte D., Pinte S., Quatannens B., Coll J., Hondermarck H., Curgy J. J., Dugimont T., Adriaenssens E. (2005). *H19* mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1. J. Biol. Chem., 280, 29625–29636.

Boronenkov I. V., Loijens J. C., Umeda M., Anderson R. A. (1998). Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. Mol. Biol. Cell., 9, 3547–3560.

Brunkow M. E. and Tilghman S. M. (1991). "Ectopic expression of the *H19* gene in mice causes prenatal lethality". Genes Dev., 5, 1092–1101.

Cocco L., Martelli A. M., Gilmour R. S., Ognibene A., Manzoli F. A., Irvine R. F. (1988). Rapid changes in phospholipid metabolism in the nuclei of Swiss 3T3 cells induced by treatment of the cells with insulin-like growth factor I. Bioch. Biophys. Res. Com., 154, 1266–1272.

Conaway R. C. and Conaway J. W. (2011). Function and regulation of the Mediator complex. Curr. Oppin. Genet. Dev., 21, 225-230.

Constancia M., Dean W., Lopes S., Moore T., Kelsey G., Reik W., (2000). Deletion of a silencer element in Igf2 results in loss of imprinting independent of *H19*. Nature Genetics, 26, 203–206.

Delaval K. and Feil R. (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. Curr. Opin. Genet. Dev., 14, 188–195.

Déléris P., Bacqueville D., Gayral S., Carrez L., Salles J. P., Perret B., Breton-Douillon M. (2003). SHIP-2 and PTEN are expressed and active in vascular smooth muscle cell nuclei, but only SHIP-2 is associated with nuclear speckles. J. Biol. Chem., 278, 38884-91.

Dong J. M., Lau L. S., Ng Y. W., Lim L., Manser E. (2009). Paxillin nuclear-cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation of the LD4 motif: evidence that nuclear paxillin promotes cell proliferation. Biochem. J., 418, 173–184.

Doughman R. L., Firestone A. J., Wojtasiak M. L., Bunce M. W., Anderson R. A. (2003). Membrane ruffling requires coordination between type Ialpha phosphatidylinositol phosphate kinase and Rac signaling. J. Biol. Chem., 278, 23036–23045.

Echevarría W., Leite M. F., Guerra M. T., Zipfel W. R., Nathanson M. H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. Nat. Cell. Biol., 5, 440-6.

Fakan S. (2004). Ultrastructural cytochemical analyses of nuclear functional architecture. Eur. J. Histochem., 48, 5–14.

Fiume R., Keune W. J., Faenza I., Bultsma Y., Ramazzotti G., Jones D. R., Martelli A. M., Somner L., Follo M. Y., Divecha N. et al. (2012). Nuclear phosphoinositides: location, regulation and function. Subcell. Biochem., 59, 335–361.

Fomproix N., Gebrane-Younes J., Hernandez-Verdun D. (1998). Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. J. Cell Sci., 111, 359-72.

Gabory A., Jammes H., Dandolo L. (2010). The *H19* locus: Role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. Bioessays, 32, 473–480.

Gebrane-Younes J., Fomproix N., Hernandez-Verdun D. (1997). When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. J. Cell Sci., 110, 2429-40.

Gillooly D. J., Morrow I. C., Lindsay M., Gould R., Bryant N. J., Gaullier J. M., Parton R. G., Stenmark H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. FEBS Lett., 473, 222-226.

Glenney Jr. J. R. and Zokas L. (1989). Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virustransformed cells are present in the membrane skeleton. J. Cell Biol., 108, 2401–2408.

Goto K., Hozumi Y., Kondo H. (2006). Diacylglycerol, phosphatidic acid, and the converting enzyme, diacylglycerol kinase, in the nucleus. Biochim. Biophys. Acta., 1761, 535-41.

Gozani O., Karuman P., Jones D. R., Ivanov D., Cha J., Lugovskoy A. A., Baird C. L., Zhu H., Field S. J., Lessnick S. L., Villasenor J., Mehrotra B., Chen J., Rao V. R. et al. (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. Cell, 114, 99–111.

Halstead J. R., Jalink K., Divecha N. (2005). An emerging role for PtdIns(4,5)P2-mediated signaling in human disease. Trends Pharmacol. Sci., 26, 654–660.

Han L., Lee D., Szabó P. (2008). CTCF is the master organizer of domainwide allele-specific chromatin at the *H19*/Igf2 imprinted region. Mol. Cell Biol., 28, 1124–35.

Hanada K., Song C. Z., Yamamoto K., Yano K., Maeda Y., Yamaguchi K., Muramatsu M. (1996). RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. EMBO J., 15, 2217-26.

Hark A. T., Schoenherr C.J., Katz D.J., Ingram R.S., Levorse J.M., Tilghman S.M. (2000). CTCF mediates methylationsensitive enhancer-blocking activity at the *H19*/Igf2 locus. Nature, 405, 486–489.

Hokin M. R. and Hokin L. E. (1953). Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. J. Biol. Chem., 203, 967–977.

Hynes R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell, 69, 11–25.

Irvine R. F. (2003) Nuclear lipid signalling. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 4, 349–360.

Jaunin F. and Fakan S. (2002). DNA replication and nuclear architecture. J. Cell Biochem., 85, 1–9.

Kaffer Ch. R., Srivastava M., Park K-Y., Ives E., Hsieh S., Batlle J., Grinberg A., Huang S-P., Pfeifer K. (2000). A transcriptional insulator at the imprinted *H19*/Igf2 locus. Genes Dev., 14, 1908–1919.

Kagey M. H., Newman J. J., Bilodeau S., Zhan Y., Orlando D. A., van Berkum N. L., Ebmeier C. C., Goossens J., Rahl P. B., Levine S. S. et al. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. Nature, 467, 430–435.

Kato Y. and Sasaki H. (2005). Imprinting and looping: epigenetic marks control interactions between regulatory elements. Bioessays, 27, 1–4.

Kurukuti S., Tiwari V. K., Tavoosidana G., Pugacheva E., Murrell A., Zhao Z., Lobanenkov V., Reik W., Ohlsson R. (2006). CTCF binding at the *H19* imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. Proc. Natl. Acad. Sci., 103, 10684–10689.

Leighton P. A., Saam J. R., Ingram R. S., Stewart C. L., Tilghman S. M. (1995b). An enhancer deletion affects both *H19* and Igf2 expression. Genes Dev., 9, 2079–2089.

Mais C., Wright J. E., Prieto J. L., Raggett S. L., McStay B. (2005). UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. Genes. Dev., 19, 50-64.

Malik S. and Roeder, R.G. (2010). The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. Nat. Rev. Genet., 11, 761-772.

McCrea H. J. and De Camilli P. (2009). Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. Physiology, 24, 8-16.

Mellman D. L., Gonzales M. L., Song C., Barlow C. A., Wang P., Kendziorski C., Anderson R. A. (2008). A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A)polymerase controls expression of select mRNAs. Nature, 451, 1013–1017.

Murrell A., Heeson S., Bowden L., Constancia M., Dean W., Kelsey G., Reik W. (2001). "An intragenic methylated region in the imprinted Igf2 gene augments transcription," EMBO Reports, 2, 1101–1106.

Murrell A., Heeson S., Reik W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and *H19* into parent-specific chromatin loops. Nat. Genet., 36, 889–893.

Nativio R., Wendt K. S., Ito Y., Huddleston J. E., Uribe-Lewis S., Woodfine K., Krueger C., Reik W., Peters J. M., Murrell A. (2009) Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-*H19* locus. PLoS Genet., 5, e1000739.

Neri L. M., Bortul R., Borgatti P., Tabellini G., Baldini G., Capitani S., Martelli A. M. (2002). Proliferating or differentiating stimuli act on different lipid-dependent signaling pathways in nuclei of human leukemia cells. Mol. Biol. Cell., 13, 947-64.

Okamoto K., Morison I. M., Taniguchi T., Reeve A. E. (1997). Epigenetic changes at the insulinlike growth factor II/*H19* locus in developing kidney is an early event in Wilms tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 5367–5371.

Osborne S. L., Thomas C. L., Gschmeissner S., Schiavo G. (2001). Nuclear PtdIns(4,5)P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. J. Cell. Sci., 114, 2501-2511.

Pannetier M. and Feil R. (2007). Epigenetic stability of embryonic stem cells and developmental potential. Trends in Biotechnology, 25, 556–562.

Payrastre B., Nievers M., Boonstra J., Breton M., Verkleij A. J., Van Bergen en Henegouwen P. M. (1992). A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. J. Biol. Chem., 267, 5078-5084.

Rameh L. E., Tolias K. F., Duckworth B. C., Cantley L. C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Nature, 390, 192–196.

Reik W. and Walter J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nat. Rev. Genet., 2, 21–32.

Scassellati C., Albi E., Cmarko D., Tiberi C., Cmarkova J., Bouchet-Marquis C., Verschure P. J., van Driel R., Magni M. V., Fakan S. (2010). Intranuclear sphingomyelin is associated with transcriptionally active chromatin and plays a role in nuclear integrity. Biol. Cell, 102, 361–375.

Schaller M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. Biochim. Biophys. Acta, 1540, 1–21.

Schill N. J. and Anderson R. A. (2009). Two novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type Igamma splice variants expressed in human cells display distinctive cellular targeting. Biochem. J., 422, 473–482.

Shah Z. H., Jones D. R., Sommer L., Foulger R., Bultsma Y., D'Santos C., Divecha N. (2013). Nuclear phosphoinositides and their impact on nuclear functions. FEBS Journal, 280, 6295–6310.

Seither P., Zatsepina O., Hoffmann M., Grummt I. (1997). Constitutive and strong association of PAF53 with RNA polymerase I. Chromosoma, 106, 216-225.

Smith C. D. and Wells W. W. (1983a). Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes. I. Characterization of in vitro protein phosphorylation. J. Biol. Chem., 258, 9360-9367.

Smith C. D. and Wells W. W. (1983b). Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes. II. Characterization of in vitro protein phosphorylation. J. Biol. Chem., 258, 9360-9367.

Smith C. D. and Wells W. W. (1984a). Characterization of a phosphatidylinositol 4-phosphate-specific phosphomonoesterase in rat liver nuclear envelopes. Arch. Biochem. Biophys. 235, 529-537.

Smith C. D. and Wells W. W. (1984b). Solubilization and reconstitution of a nuclear envelope-associated ATPase. Synergistic activation by RNA and polyphosphoinositides. J. Biol. Chem., 259, 11890-11894.

Steenman M. J., Rainier S., Dobry C. J., Grundy P., Horon I. L., Feinberg A. P. (1994). Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of *H19* in Wilms´ tumour. Nat. Genet., 7, 433–439.

Streb H., Irvine R. F., Berridge M. J., Schulz I. (1983). Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. Nature, 306, 67–69.

Szabó P. E., Tang S. H. E., Silva F. J., Tsark W. M. K., Mann J. R. (2004). "Role of CTCF binding sites in the Igf2/*H19* imprinting control region". Mol. Cell. Biol., 24, 4791–4800.

Tanaka K., Horiguchi K., Yoshida T., Takeda M., Fujisawa H., Takeuchi K., Umeda M., Kato S., Ihara S., Nagata S., Fukui Y. (1999). Evidence that a phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein can function in nucleus. J. Biol. Chem., 274, 3919-22.

Thomas J. W., Cooley M. A., Broome J. M., Salgia R., Griffin J. D., Lombardo C. R. and Schaller M. D. (1999). The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin. J. Biol. Chem., 274, 36684-36692.

Tremblay K. D., Duran K. L., Bartolomei M. S. (1997). A 502-kilobase-pair region of the imprinted mouse *H19* gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. Mol. Cell. Biol., 17, 4322–4329.

van den Bout I. and Divecha N. (2009). PIP5K-driven PtdIns(4,5)P2 synthesis: regulation and cellular functions. J. Cell. Sci., 122, 3837–3850.

Vann L. R., Wooding F. B., Irvine R. F., Divecha N. (1997). Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei. Biochem. J., 327, 569–576.

Varrault A., Gueydan C., Delalbre A., Bellmann A., Houssami S., Aknin C., Severac D., Chotard L., Kahli M., Le Digarcher A. et al. (2006). Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. Dev. Cell, 11, 711–722.

Visnjic D. and Banfic H. (2007). Nuclear phospholipid signaling: phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phosphoinositide 3-kinase. Pflugers. Arch., 455, 19–30.

Wang Y. and Gilmore T. D. (2003). Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. Biochim. Biophys. Acta, 1593, 115–120.

Weber M., Hagege H., Murrell A., Brunel C., Reik W., Cathala G., Forne T. (2003). Genomic Imprinting Controls Matrix Attachment Regions in the Igf2 Gene. Mol. Cell. Biol., 23, 8953-8959.

Wendt K. S., Yoshida K., Itoh T., Bando M., Koch B., Schirghuber E., Tsutsumi S., Nagae G., Ishihara K., Mishiro T., Yahata K., Imamoto F., Aburatani H., Nakao M., Imamoto N., Maeshima K., Shirahige K., Peters J. M. (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. Nature, 451, 796–801.

Yokogawa T., Nagata S., Nishio Y., Tsutsumi T., Ihara S., Shirai R., Morita K., Umeda M., Shirai Y., Saitoh N., Fukui Y. (2000). Evidence that 3'-phosphorylated polyphosphoinositides are generated at the nuclear surface: use of immunostaining technique with monoclonal antibodies specific for PI 3,4-P(2). EMBO J., 19, 4577-88.

Yoon Y. S., Jeong S., Rong Q., Park K. Y., Chung J. H., Pfeifer K. (2007). Analysis of the *H19* ICR insulator. Mol. Cell. Biol.,27, 3499–510.

York J. D. and Majerus P. W. (1994). Nuclear phosphatidylinositols decrease during S-phase of the cell cycle in HeLa cells. J. Biol. Chem., 269, 7847–7850.

RESEARCH PAPERS

Paxillin interacts with cohesin and regulates the expression of *IGF2*/*H19* gene cluster

Marášek P., Dzijak R., Studenyak I., Fišerová J., Uličná L., Novák P., Hozák P.

Submitted manuscript

Marasek P. performed the experiments and wrote the manuscript.

UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity.

Sobol M., Yildirim S., Philimonenko V. V., **Marášek P.**, Castano E., Hozak P.

Nucleus 2014, 4:6, 478–486. IF: 3.148

Marasek P. designed and performed cell fractionation and immunoprecipitation experiments.

PIP2 islets in the cell nucleus as a novel nuclear compartment

Sobol M., Philimonenko V., **Marášek P.**, Kalendová A., Kalasová I., Uličná L., Pastorek L., Hozák P.

Submitted manuscript

Marasek P. optimized conditions for PIP2 hydrolysis, designed and performed transcription-related experiments.

LIST OF USED METHODS

Cloning

Lentiviral transduction

BrdU incorporation assay

Western blotting

Mass spectrometry analysis

RNA isolation and QPCR

Pull-down assays

Genotyping and allele-specific expression assay

Methylation analysis

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Luciferase reporter assay

Chromatin Conformation Capture Assay (3C)

Light microscopy, super-resolution structured illumination microscopy (SIM)

Immunoelectron microscopy

Electron energy loss spectroscopy (EELS) and elemental mapping

Detection of transcription sites, 5-Fluorouridine (FU) incorporation

CURRICULUM VITAE

Personal data:

Pavel Marášek
Date of birth: 17. 9. 1985, 29 years old
Nationality: Czech Republic

Current address:

Dept. of Biology of the Cell Nucleus, Institute of Molecular Genetics, AS CR, v.v.i.
Videnska 1083, 14220 Prague 4
marasek@img.cas.cz
tel: +420 241 063 152
fax:+420 241 062 289

Education:

2008 – present	Dept. of Biology of the Cell Nucleus, Institute of Molecular Genetics, AS CR, v.v.i., PhD student – Charles University, Faculty of Science, supervisor: Prof. Pavel Hozák
2006 – 2008	Institute of Chemical Technology in Prague, Faculty of food and biochemical technology; program General and applied biochemistry (M.Sc.)

ABSTRAKT

Paxillin i PIP2 jsou dobře známé součásti každé buňky, i když odlišné povahy. Paxillin, protein fokálních adhezí, šíří signál z extracelulární matrix prostřednictvím integrinů a receptory růstových faktorů, a tak reguluje buněčnou motilitu a migraci buněk (Schaller, 2001). PIP2, hlavní stavební kámen buněčných membrán, který je fosfolipasou C štěpen na tzv. druhé posly (Hokin and Hokin 1953; Streb et al. 1983). V nedávné době bylo prokázáno, že obě molekuly jsou také lokalizovány v jádře. Jejich dosud známé funkce jsou detailně prozkoumány, ale my nyní odhalujeme zcela odlišné funkce těchto biologických složek, a to navíc v úplně odlišných částech buňky, než kde se jejich lokalizace předpokládá.

V této práci ukazujeme, že paxillin je důležitým faktorem buněčného jádra, kde kontroluje expresi dvou důležitých genů *IGF2* a *H19*, které řídí růst buňky. Paxillin nemění alelickou expresi těchto imprintovaných genů, ale reguluje chromosomální interakce mezi promotory *IGF2/H19* a jejich společným enhancerem na aktivní alele. Přesněji řečeno, paxillin stimuluje interakci mezi enahncerem a promotorem genu *IGF2*, čímž zesiluje transkripci *IGF2*, zároveň paxillin brání interakci mezi enhancerem a promotorem *H19*, a tím snižuje transkripci *H19*. Nalezli jsme paxillin v komplexu s kohesiny a také Mediatorem RNA polymerasy II a navrhujeme, že tento komplex zprostředkovává působení na genový klastr *IGF2*/*H19*. Představujeme zde nový mechanismus genové regulace zprostředkovaný proteinem fokálních adhezí, paxillinem. Naše pozorování přispívá k vysvětlení mechanismu role paxillinu v proliferaci a při vývoji plodu.

Dále předkládáme dvě roviny funkce molekuly PIP2 lokalizovaného v buněčném jádře. Prvně ukazujeme, že PIP2 je stabilní součástí transkripčního komplexu RNA polymerasy I, a to během celého buněčného cyklu, což naznačuje, že má širší funkci v organizaci jadérka. Za druhé, poprvé uvádíme, že značná část jaderného PIP2 je lokalizována v dříve nepopsaných kruhových strukturách, které jsou odlišné od jaderných speckles a označili jsme je jako „ostrůvky“. Ty jsou obklopeny nukleovými kyselinami a proteiny, zatímco vnitřek je tvořen převážně látkami bohatými na uhlík. PIP2 ostrůvky jsou evolučně konzervované od prvoků až po člověka a jsou spojené s transkripcí RNA polymerasy II, jelikož se lokalizují do stejných míst jako nově vznikající RNA molekuly a jejich rozštěpení fosfolipasou C snižuje hladinu transkripce v buněčném jádře.

ÚVOD

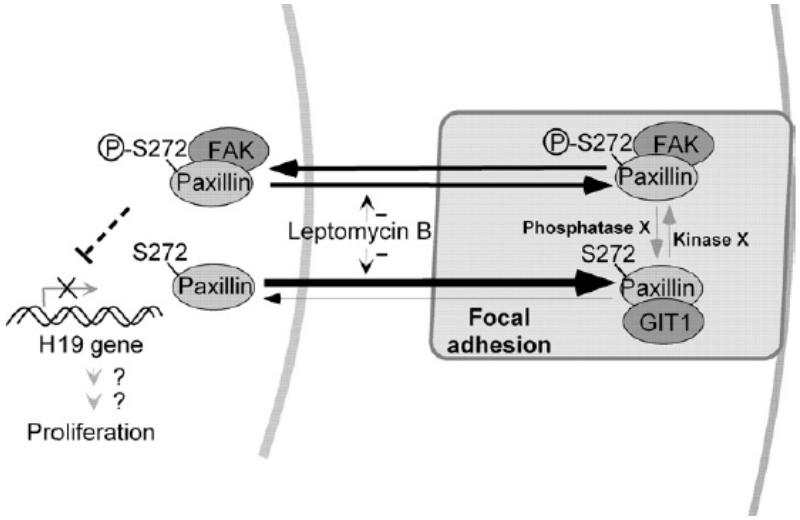
1. Paxillin and jeho jaderné funkce

Paxillin byl poprvé identifikován jako 68 kDa protein vykazující významné zvýšení fosforylace tyrosinu v buňkách transformovaných src onkogenem (Glenney Jr a Zokas, 1989). Paxillin přednostně lokalizuje do míst buněčné adheze k extracelulární matrix (ECM), které se nazávají fokální kontakty nebo fokální adheze. Tvoří strukturální spojení mezi ECM a aktinovým cytoskeletem a jsou důležitá místa přenosu signálu, zejména vyplývající z aktivace integrinů nebo v důsledku stimulace receptorů růstových faktorů (Hyneš, 1992). Paxillin nevykazuje enzymatickou aktivitu, ale slouží jako adaptér, který poskytuje platformu s více vazebnými místy pro signální a strukturní proteiny, a tím usnadňuje skládání více proteinových komplexů, které koordinují signalizaci (Schaller, 2001).

Přestože je paxillin lokalizován především ve fokálních adhezích, v poslední době se objevilo několik důkazů o translokaci paxillin do jádra a byly navrženy jeho jaderné funkce. Ošetření fibroblastů leptomycin B způsobilo retenci paxillinu v jádře, což poskytuje důkaz pro kyvadlový pohyb mezi cytoplazmou a jádrem (Woods a kol., 2002). Toto pozorování vyvolalo studium jaderného exportního signálu (NES) a jaderného lokalizačního signálu (NLS). Paxillin neobsahuje tradiční NLS. Paxillin buď využívá netradiční translokační sekvence, která dosud nebyla definována, nebo vstoupuje do jádra ve spojení s jinými proteiny, které obsahují NLS (Thomas et al, 1999; Wang a Gilmore, 2003). V poslední době byl NES paxillinu navržen v LD4 motivu. Jeho vypuštění vede k akumulaci paxillin uvnitř jádra. Kromě toho fosforylace Ser272 v LD4 blokuje jaderný exportn a také snižuje vazbu na GIT1, ale ne na FAK1 (Obr. 1). Navíc LD4 vyžaduje LD3 pro funkčnost NES. Existuje hypotéza, že je LD3 slouží jako platforma pro podporu defosforylace Ser272 (Dong a kol., 2009).

Velmi málo je známo o činnosti paxillinu v jádře. Translokace paxillinu do jádra podporuje syntézu DNA a buněčnou proliferaci. Vzhledem k tomu, že zvýšená hladina paxillinu (převážně cytoplazmatického) není schopna regulovat tyto procesy, N-zkrácená forma, která je nabohacena v jádře, je dostatečná pro zvýšení počtu buněk, které vstupují do buněčného cyklu, a tedy buněčnou proliferaci (Dong a kol., 2009). Při regulaci transkripce, se paxillin podílí na regulaci exprese genu H19. Tento objev byl učiněn po overexpresi paxillinu (Dong a kol., 2009). H19 byl první identifikovaný imprintovaný gen nacházející se v IGF2/H19 lokusu. Gen H19 kóduje 2,5 kb RNA, která podstupuje všechny modifikace, včetně polyadenylace, ale není translatována (Arney, 2003). I přes značný zájem, není funkce genu

H19 známa. Bylo navrženo, že funguje jako nádorový supresor, stejně jako původce vzniku nádorových onemocnění (Steenman et al, 1994;. Okamoto et al, 1997;. Berteaux a kol., 2005).



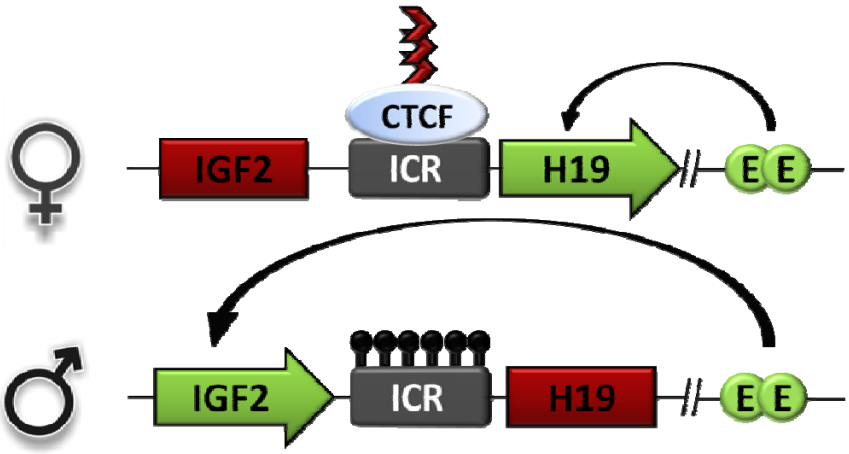
Obr. 1 Navrhovaný model regulace pohybu paxillinu mezi cytoplasmou a jádrem
Fosforylace paxillin na Ser272 podporuje vazbu na kinázu fokálních adhezí (FAK) a může přispívat k jaderné akumulaci paxillinu, kde by mohl být také spojena s jadernou FAK. V jádře paxillin potlačuje expresi genu H19, a tak podporuje proliferaci (Dong a kol., 2009).

2. Mammalian Igf2/H19 imprinted cluster

Imprinting genů Igf2 a H19 geny je mechanisticky propojen. H19 je exprimována z matčiny alely a Igf2 z otcovy alely. Regulace imprintingu je závislá na alelicky specifické metylaci DNA v diferenčně metylovaných oblastech (DMRs) pro udržení monoallelické exprese. Existují dvě DMR oblasti pro Igf2 a obě jsou methylovány na otcovské alele. DMR2 se nachází v exonu 6 Igf2 a slouží jako enhancer aktivovaný metylací (Constancia et al, 2000; Murrell a kol., 2001). Kromě toho bylo zjištěno, že oblast MAR slouží ke kontrole správného imprintingu genu Igf2 v novorozeneckých játrech (Weber a kol., 2003). H19 má jednu DMR (ICR), který je umístěna 2-4 kb od počátku transkripce genu z H19 a je také methylována na otcovské alele (Bartolomei a kol., 1993; Tremblay a kol., 1997). Delece H19 ICR a Igf2 DMR1 ma za následek bialelickou expresi obou H19 a Igf2 (Arney, 2003).

Během vývoje sdílejí oba geny regulační prvky, které jsou umístěny níže od genu H19. Dvě sady endoderm specifických enhancerů jsou umístěny ~ 10 kb níž než H19 a bylo prokázáno, že regulují expresi H19 i Igf2 (Obr. 2; Leighton et al 1995b; Kaffer et al, 2000). V poslední době bylo ukázáno, že tyto enhancery jsou vázány transkripčním faktorem ZAC1, který ovlivňuje hladinu RNA z těchto dvou genů, jakož i další imprintované geny (Dlk1 a Cdkn1c; Varrault a kol., 2006). Bylo prokázáno, že mechanismus imprintingu lokusu Igf2/H19 zahrnuje také kohesinem řízené intrachromozomální smyčky. Bylo vytvořeno několik

modelů, které ukazují zvláštní strukturu jednotlivých (mateřskou a otcovskou) alel v důsledku interakce mezi jednotlivými kontrolními oblastmi (Weber a kol., 2003, Kurukuti a kol., 2006, Murrell a kol., 2004, Yoon a kol., 2007, Kato a Sasaki, 2005, Han a kol., 2008).



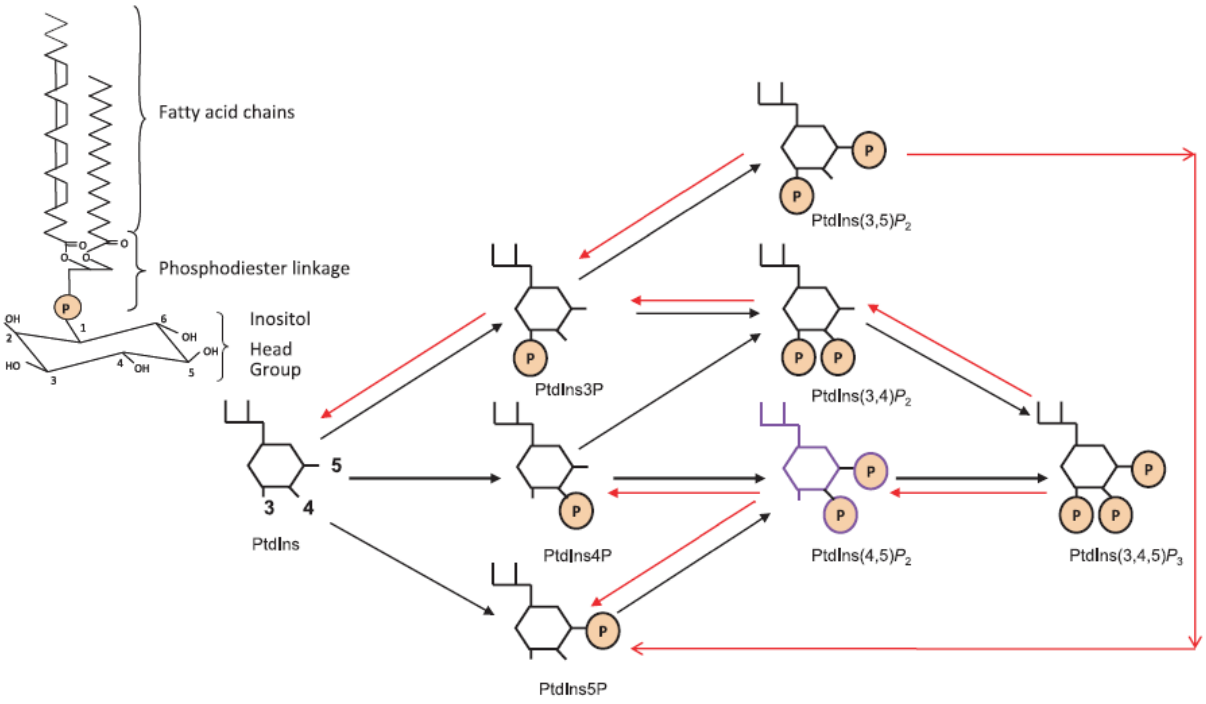
Obr. 2 Zjednodušený model regulace imprintovaného klastru Igf2/H19
Imprinting tohoto klastru zahrnuje evolučně konzervovaný CCCTC-vázající faktor (CTCF). Tento izolátorový protein se váže výhradně na nemetylovaný ICR na matčině alele (Bell a Felsenfeld, 2000; Hark et al, 2000), a působí jako izolátor, blokující přístupu enhanceru na Igf2 promotor (Szabó et al, 2004). Metylace H19 ICR na otcovské alele inhibuje vazbu CTCF, který umožňuje enhanceru přístup k Igf2 promotoru na otcovské alele (Murrell a kol., 2004; Kurukuti a kol., 2006). červený box - neaktivní gen, zelený box - aktivní gen, černá lízátka - metylace, tmavě červené šipky - bariéra.

Zatímco Igf2 lokus kóduje inzulinu podobný růstový faktor-2 (Igf2), což je peptidový hormon podporující růst, lokus H19 kóduje nekódující RNA (ncRNA), ze které vznikají mikroRNA (miRNA), které mají opačný účinek na buněčnou proliferaci (Gabory a kol., 2010). Dvojí funkce "jin-jang" tohoto lokusu vyžaduje správně vyváženou expresi Igf2 a H19, rozhodující především pro normální vývoj plodu (Reik a Walter, 2001, Pannetier a Feil, 2007, Bartolomei a Ferguson-Smith, 2011).

3. Fosfoinositidy a jejich struktura

Fosfoinositidy obsahují dva dlouhé hydrofobní mastné acylové ocasy spojené skupinou glycerolu, který je vázán prostřednictvím fosfodiesterové vazby na hydrofilní skupiny inositolové hlavy. Jaké mají různé acylové zbytky vliv na následné funkce PIP není dobře známé. Reversibilní fosforylace v poloze 3, 4 nebo 5 myo-inositolového-kruhu vytváří sedm různých fosfoinositidů (Obr. 3) : PI3P, PI4P, PI5P, PI(3,4)P2, PI(3,5)P2, PI(4,5)P2 a PI(3,4,5)P3 (Irvine, 2003). Řada kináz, fosfatáz a fosfolipáz udržuje hladinu PIPů a aktivita

těchto enzymů se může změnit v závislosti na různých podnětech, což vede ke změně profilu PIPů (van den Bout a Divecha, 2009).



Obr. 3 Struktura a komplexní mapa jaderných fosfoinositidů (PIPy)
PIPy se skládají ze dvou hydrofobních mastných acylových řetězců a hydrofilní skupiny, inositol hlavy, spojené skupinou glycerolu. Řada kináz a fosfatáz generuje sedm různých fosfoinositidů: PI3P, PI4P, PI5P, PI(3,4)P2, PI(3,5)P2, PI(4,5)P2 a PI(3,4,5)P3. Tyto kinázové reakce jsou označeny černými šipkami a reakce fosfatáz jsou označeny červenými šipkami, pro jednoduchost nejsou enzymy zobrazeny; přejato od Shah a kol., 2013.

3.1. Jaderné fosfoinositidy a jejich funkce

V cytosolu jsou fosfoinositidy (PIPy) pevně ukotveny v membráně, kde koncentrují upstream regulátory a následné cíle, což vede k rychlejší signalizaci a specifičnosti (Cocco a kol., 1988; McCrea a De Camilliho, 2009). Metabolismus fosfoinositidů se odehrává také v jádře. Když byly izolované jádra inkubovány s radioaktivně značeným 32P-ATP, radioaktivita byla začleněna do fosfatidylinositol fosfátů (PIPy; Smith a Wells, 1983a, b, 1984a, b). Jaderné i cytoplazmatické PIPy sdílejí regulační enzymy, většina z nich nejsou výlučně lokalizovány do cytoplazmy nebo do jádra (Boronenkov a kol., 1998; Doughman et al, 2003, Schill a Anderson, 2009). PIPy tak mohou být syntetizovány v jádře. Jaderné funkce různých PIPů jsou shrnuty v Tabulce I.

Tabulka I Funkce různých jaderných fosfolipidů

Inositolová molekula	Enzym	Lokalizace	Efektory	Funkce	Reference
PI3P	PI3-kinase	Jadérko, NM	?	Regulace buň. cyklu	Gillooly a kol., 2000; Visnjic and Banfic, 2007
PI4P	PI4-kinase	NM	?	Buň. cyklus, PI4,5P2 prekurzor	Payrastre a kol. 1992
PI5P	PI5-kinase	NM, chromatin	ING, jiné?	Organizace chromatinu, apoptosa, opravy DNA	Gozani a kol., 2003
PI3,4P2	SHIP-2, PIPK IIβ	Membrána, jaderné speckles	?	Pre-mRNA splicing	Yokogawa a kol., 2000; Déléris a kol., 2003
PI4,5P2	PIPK Iα, PIPK Iiβ	Membrána, Jaderné speckles, NM, chromatin	Star-PAP, ING2, ALY, BRG1	3´-end procesing, splicing, organizace chromatinu, prekursor IP3	Osborne a kol., 2001; Mellman a kol., 2008
PI3,4,5P3	PIPK I, PIP3K	NM	PIP3BP, jiné?	Buň. cyklus, diferenciace proliferace	Tanaka a kol., 1999; Neri a kol., 2002
DAG	PI-PLC	NM	?	Buň. cyklus, diferenciace proliferace	Goto a kol., 2006
Ins4,5,P3	PI-PLC	NM	?	Signalizace vápníku	Echevarría a kol., 2003
IPn	IPn kinases	NM, chromatin	?	mRNA export, chromatinová struktura	York and Majerus, 1994; Steger a kol., 2003

Fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP2) je převládající regulační molekula nejen v cytoplazmě, ale také v jadře. Existují tři třídy fosfatidylinositol fosfátových kináz (I, II a III). Oba typy, I a II, dovedou generovat PIP2, i když s využitím různých substrátů, PI4P, respektive PI5P (Rama et al, 1997; Anderson et al, 1999; Halstead et al, 2005; Fiume et al, 2012). Metabolickým značením radioizotopy v jádrech potkaních jater bylo zjištěno, že převládajícím způsobem výroby PIP2 v jádře je fosforylace PI4P kinázou typu I, což je stejné pro celou buňku (Vann a kol., 1997).

CÍLE

ČÁST I – JADERNÉ FUNKCE PAXILLINU

1) Jaký mechanismus stojí za rolí paxillinu v genové expresi?
2) Jaká je role paxillinu ve vztahu k imprintovanému klastru *IGF2/H19*?
3) S jakými protein/proteinovými komplexy interaguje paxillin v jádře?

ČÁST II - JADERNÝ PIP2

1) Závisí interakce mezi PIP2 a transkripčním komplexem RNA polymerasy I na aktivní transkripci nebo přetrvává během celého buněčného cyklu?

2) Jaká je detailní lokalizace PIP2?

3) Jaké jsou možné funkce PIP2 ostrůvků? Ovlivňují transkripci RNA polymerasy II?

VÝSLEDKY

I. JADERNÉ FUNKCE PAXILLINU

Knockdown paxillinu zvyšuje expresi genu H19 a zpomaluje proliferaci lidských buněk HepG2

V souladu s publikovanými daty, snížení hladiny paxillin má za následek upregulaci transkripce H19 asi dvojnásobně v porovnání s kontrolními buňkami . Pozorovali jsme mírný pokles v expresi IGF2, ale rozdíl nebyl statisticky významný ($p > 0,05$) . BrdU test ukázal, že knockdown paxillinu a následná upregulace H19 snižuje počet buněk obsahujících BrdU v DNA, a tedy proliferaci.

Paxillin reguluje promotory genů IGF2 a H19 prostřednictvím jejich společného enhanceru

Snízení hladiny paxillin zvyšuje aktivitu H19 promotoru prostřednictvím jeho enhanceru a snižuje aktivitu IGF2 promotoru. Jinými slovy, normální hladina paxillinu má represivní účinek na H19 promotor a pozitivní vliv na IGF2 promotor. Důležité je, že paxillin nereguluje tyto promotory přímo, ale prostřednictvím sdíleného enhanceru.

Paxillin interaguje s IGF2P3/H19 promotory a jejich enhancerem

ChIP analýza ukázala, že paxillin interaguje převážně s H19 promotorem. Interakce paxillinu s IGF2 P3 promotorem a jejich společným enhancer byla slabší, zatímco nebyla zjištěna žádná vazba k regionu ICR. Tyto výsledky naznačují, že paxillin váže oba hlavní transkripční prvky - promotor a enhancer - a může tudíž regulovat jejich vzájemnou interakci.

Paxillin reguluje interakci IGF2P3/H19 promotor-enhancer

Paxillin reguluje aktivaci IGF2 P3 a H19 promotorů pomocí sdíleného enhanceru, a že tak činí opačným způsobem. Jinými slovy, paxillin podporuje kontakt mezi IGF2 P3 promotorem a enhancerem, a současně blokuje aktivaci promotoru H19 .

Paxillin váže SMC1, SMC3 a MED v buněčném jádře

Dva proteiny cohesinové rodiny byly opakovaně identifikovány v pull-down experimentech, a to Structural maintenance of chromosomes 1A (SMC1A) and Structural maintenance of chromosomes 3 (SMC3). Dále jsme také identifikovali 3 podjednotky MED komplexu, konkrétně MED15, MED24 a MED23. Specifita identifikovaných interakcí byla potvrzena metodou Western blot. Oba proteiny SMC1 a SMC3, jakož i MED23 byly nalezeny v pull-down frakcích, ale ne v v kontrole, což odpovídá našim MS datům.

II. PIP2 A TRANSKRIPCE RNA POLYMERASY I

PIP2 asociuje s pre-iniciačním komplexem RNA polymerázy I v mitotických buňkách

Odhalili jsme, že UBF a dvě podjednotky Pol I, PAF53 a RPA116, ko-immunoprecipují s PIP2. To jasně ukazuje, že PIP2 interaguje s transkripčním komplexem Pol I v průběhu mitózy.

PIP2 je stabilní součástí pre-iniciačního komplexu Pol I v průběhu všech fází mitózy

Pozorovali jsme kolokalizaci PIP2 a UBF během všech fází mitózy. SIM ukázala kolokalizaci mezi PIP2 a UBF v NORech během celé profáze a metafáze, pokračující v "dceřinných" NORech v anafázi a telofázi. Elektronová mikroskopie potvrdila kolocalization PIP2 s UBF v jasně rozeznatelných NORech od profáze po telofázi.

Inhibice transkripce ruší vazbu PIP2 s fibrillarinem, avšak ne s UBF a Pol I

Asociace PIP2 s Pol I a UBF není závislá na aktivní transkripci Pol I, zatímco fibrillarin asociuje s PIP2 pouze tehdy, když je transkripce Pol I aktivní.

III. PIP2 OSTRŮVKY

Distribuce PIP2 v jádře

Odhalili jsme, že jaderný PIP2 se nachází ve třech různých oblastech: speckles, jadérka a významná část jaderného PIP2 je soustředěna v dříve necharakterizovaných strukturách. Tyto

struktury jsou jasně odlišitelné od jaderných species, velikostí a tvarem. Zde o nich hovoříme jako o PIP2 ostrůvkach.

PIP2 ostrůvky jsou obohaté na sloučeniny uhlíku a jsou obklopeny nukleovými kyselinami a proteiny

Ukázali jsme, že PIP2 ostrůvky jsou obklopeny nukleovými kyselinami a proteiny, přičemž ve vnitřním prostoru PIP2 ostrůvků tyto komponenty chybí. Odhalili jsme, že vnitřek PIP2 ostrůvků se skládá hlavně z látek bohatých na uhlík.

PIP2 ostrůvky jsou evolučně konzervované jaderné struktury

Prokázali jsme, že 40 až 100 nm velké PIP2 ostrůvky jsou přítomny v jádrech kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) , prvoků (*Giardia lamblia, Tetrahymena thermophila*), fazolí (*Vicia;* meristémové buňky klíčících fazolí), myších buněk (*Mus musculus*; primární kožní fibroblasty), a lidských buněk (*Homo sapiens* : mezenchymální kmenové buňky, stimulované lymfocyty, buňky cervikálního karcinomu) .

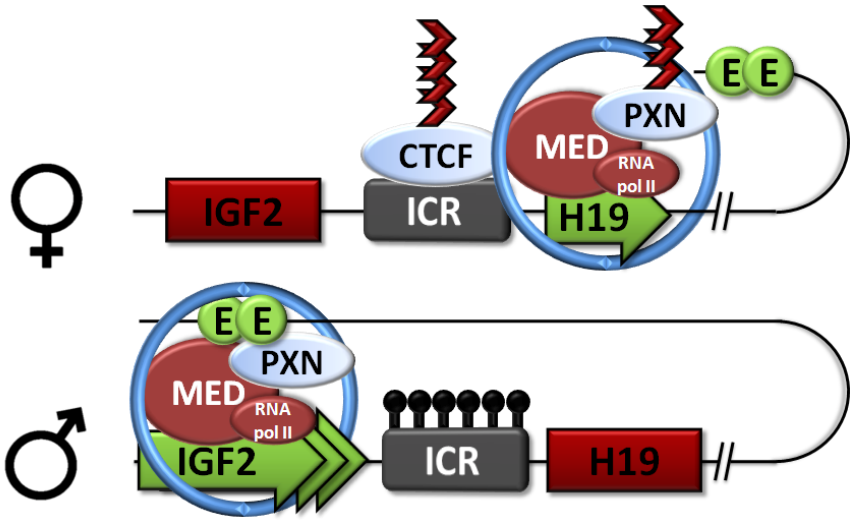
PIP2 ostrůvky jsou zapojeny do transkripce RNA polymerázy II

Ukázali jsme, že PIP2 ostrůvky kolokalizují s C-terminální doménou Pol II, TATA-box vázajícím proteinem (TBP) a také se vznikajícími RNA transkripty. Hydrolyzovali jsme PIP2 inkubací buněk s enzymem fosfolipázou C. To mělo za následek snížení úrovně transkripce o 36,5 %. Stejný účinek byl pozorován u PIP2 ostrůvků, kde snížení hladiny PIP2 o 18,1% mělo za následek snížení úrovně transkripce o 36,1 %

DISKUZE

Jaderné funkce paxillinu

Ukázali jsme, že paxillin reguluje tvorbu dalekosáhlých interakcí mezi promotory genů H19 a IGF2 a jejich společným enhancerem. Identifikovali jsme interakci paxillinu s kohesinovým komplexem (podjednotkami SMC1, SMC3). Zajímavé je, že kohesinový komplex byl popsán jako hlavní regulátor dalekosáhlých chromatinových interakcí na IGF2/H19 klasteru (Wendt a kol. 2008; Nativio a kol., 2009). Navíc bylo zjištěno, že kohesin kolokalizuje s Mediatorem (Kagey a kol., 2010). Bylo prokázáno, že tyto proteiny zprostředkovávají dalekosáhlé interakce mezi enhancery a promotory klíčových transkripčních faktorů regulujících pluripotenci v myších embryonálních kmenových buňkách (Conaway a Conaway, 2011).



Obr. 4 Model regulace *IGF2*/*H19* paxillinem

Model regulace lokusu IGF2/H19. Paxillin asociuje s kohesinem a Mediátorem a zprostředkovává dalekosáhlé chromozomální interakce mezi IGF2 nebo H19 promotorem a sdíleným enhacerem, a tím reguluje jejich transkripci. Konkrétně, paxillin zvyšuje interakci mezi enhancerem a IGF2 promotorem , ale blokuje interakci H19 promotor-enhancer, což má za následek stimulaci exprese IGF2 a potlačení exprese H19. Model ukazuje otcovskou a mateřskou alelu genů; červený obdelník - neaktivní gen, zelený obdelník - aktivní gen, černá lízátka - metylace, modrý kruh - kohesinový komplex, tmavě červené šipky - ICR bariéra.

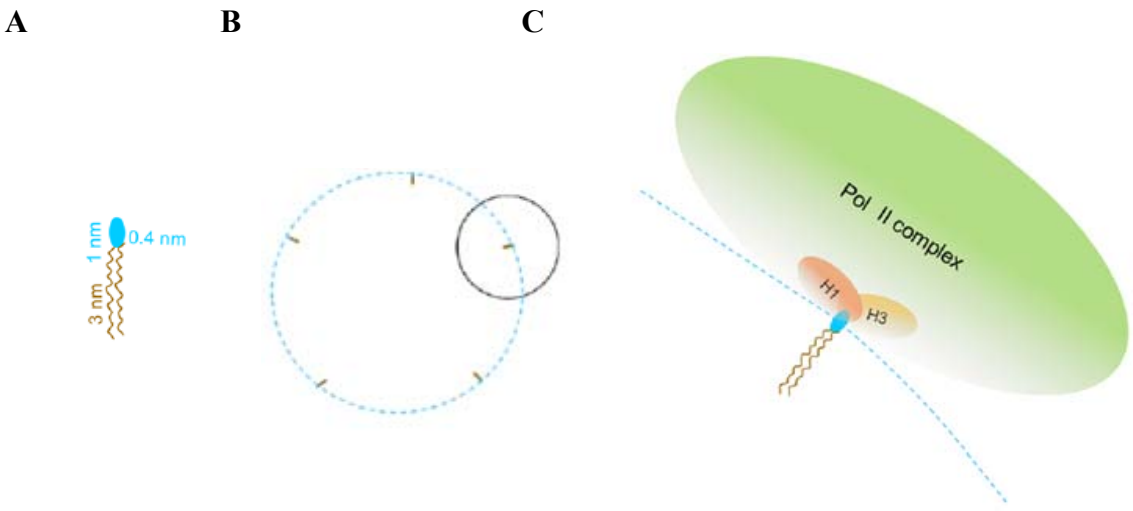
Zjistili jsme že, podjednotky Mediatoru, zejména pak jeho ocas (Malik a Roeder, 2010), se nachází v pull-down frakcích. Proto navrhujeme model (Obr. 4), kde paxillin asociuje s kohesinem a Mediátorem a zprostředkovává dalekosáhlé chromozomální interakce mezi IGF2 nebo H19 promotorem a sdíleným enhacerem, a tím reguluje jejich transkripci. Konkrétně, paxillin zvyšuje interakci mezi enhancerem a IGF2 promotorem, ale blokuje interakci H19 promotor-enhancer, což má za následek stimulaci IGF2 a potlačení exprese H19. Náš model také vysvětluje výrazný pokles v buněčné proliferaci po depleci paxillinu, protože to způsobuje upregulaci H19 nekódující RNA, ze které vznikají mikroRNA potlačující růst (miRNA, Gabory a kol., 2010). Geny IGF2 a H19 jsou exprimovány zejména během embryonálního vývoje, poté jsou downregulovány (s výjimkou kosterních svalů, Brunkow a Tilgham, 1991; DeLaval a Feil, 2004). Jejich správná exprese je tedy velmi důležitá především při vývoji plodu (Delaval a Feil, 2004, Pannetier a Feil, 2007,. Gabory a kol., 2010). Přesto, že tyto regulační mechanismy jsou zachovány při kultivaci somatických buněk, předpokládáme, že skutečný význam tohoto regulačního modelu spočívá ve vývojových stádiích.

Na základě našich zjištění, navrhujeme nový regulační mechanismus pro lokus IGF2/H19, kde paxilllin v komplexu s kohesinem a Mediátorem zprostředkovávají interakce promotor-

enhacer. Vezmeme-li v úvahu, že paxillin jeprotein fokálních adhezí, ukazuje to, že buňky regulují expresi genů s využitím fyzické bariéry tvořené jaderným obalem, a tak řídí přístup regulátorů k jejich cílovým genům.

Lokalizace a funkce jaderných fosfolipidů

Zjistili jsme, že po fyziologické (mitóza) nebo chemicky indukované (AMD) inhibici Pol I transkripce, PIP2 zůstává asociován s UBF a podjednotkou Pol I, součástmi Pol I pre-iniciačního komplexu, ale ne s fibrillarinem. Bylo prokázáno, že Pol I podjednotka PAF53 váže UBF přímo, a obě PAF53 a RPA116 podjednotky zůstávají spojeny s Pol I transkripční jednotkou nezávisle na syntéze rRNA (Hanada a kol., 1996;. Seither a kol., 1997). Tyto data posilují názor, že PIP2 interaguje s fibrillarinem pouze při aktivní pre-rRNA transkripci, zatímco jeho vazba na UBF v Pol I komplexu není závislá na syntéze rRNA. UBF asociuje s vláknem rDNA v průběhu celého buněčného cyklu (Gebrane-Younes a kol., 1997), a bylo ukázáno, že to hraje roli při tvorbě jadérka (Fomproix et al, 1998;. Mais et al., 2005). Ukázali jsme, že asociace PIP2 a UBF je zachována v průběhu celého buněčného cyklu, což ukazuje na strukturní úlohu PIP2 při tvorbě a udržování jadérkové architektury. Navrhujeme, že PIP2 v komplexu s UBF tvoří základní část struktury helixu rDNA, a tím udržuje otevřený stav chromatinových NORů nezávisle na Pol I transkripci.



Obr. 5 Navrhovaný model ostrůvku PIP2 asociovaného s transkripčním komplexem RNA polymerasy II
A) Velikost PIP2 molekuly. B) PIP2 ostrůvek (modrá čárkovaná kružnice) je schematicky zobrazen v poměru k velikosti PIP2 molekuly. C) Zvětšený pohled na povrch PIP2 ostrůvku, odpovídající zakroužkované oblasti. Navrhujeme, že PIP2 ostrůvek slouží jako dokovací stanice pro Pol II transkripční komplex.

Použili jsme elektronovou mikroskopii a 3D elektronovou tomografii pro detailní zkoumání PIP2 lokalizaci v jádře a odhalili jsme jako první struktury PIP2, které se liší od jaderných speckles. Tyto kulovité struktury, které tvoří asi třetinu celkového jaderného poolu, mají 40 až 100 nm v průměru, a zde je označujeme jako "PIP2 ostrůvky". Elementární mapování ukázalo, že vnitřek PIP2 ostrůvků se vyznačuje sloučeninami bohatými na uhlík, obklopeny jsou nukleovými kyselinami a proteiny. Proto navrhujeme, že organizace PIP2 ostrůvků odráží uspořádání micel: hydrofobní jádro obklopené hydrofilní vnější částí. Pozoruhodné je, že jsme ukázali, že PIP2 ostrůvky jsou nezávislé na chromatinu, což je v souladu s dřívějšími pozorováními, kdy je sfingomyelin lokalizován v perichromatinové oblasti, kde se odehrává DNA replikace a transkripce, a je vyloučen z oblastí kondenzovaného chromatinu (Jaunin a Fakan, 2002; Fakan, 2004; Scassellati a kol., 2010).

Osborne a kol. (2001) ukázali, že PIP2 asociuje s hyperfosforylovanou Pol II a snRNA, což dokazuje zapojení PIP2 v sestřihu mRNA. My jsme ukázali, že PIP2 ostrůvky kolokalizují s nově vznikajícími RNA transkripty a oběma Pol II CTD a TFIID TBP, které tvoří jádro transkripčního komplexu a iniciují transkripci. Kromě toho, hydrolýza PIP2 po ošetření PLC má za následek významné snížení hladiny transkripce v celém jádře, stejně jako v PIP2 ostrůvcích. Navrhujeme model (Obr. 5) vzájemného uspořádání PIP2 molekul a proteinů asociovaných s PIP2 ostrůvky v jaderném prostoru. Domníváme se, že PIP2 ostrůvky poskytují povrch pro transkripci Pol II, sloužící jako dokovací stanice pro formování transkripčních komplexů Pol II.

ZÁVĚRY

ČÁST I – JADERNÉ FUNKCE PAXILLINU

Paxillin reguluje expresi genů IGF2 a H19 v lidských buňkách
Představujeme nový regulační mechanismus, kde paxillin zvyšuje transkripci růst-stimulujícího peptidu IGF2, zatímco potlačuje expresi růst-brzdícího genu H19.

Paxillin kontroluje expresi H19 a IGF2 regulací interakcí promotor-enhancer
Ukázali jsme, že paxillin reguluje dalekosáhlé chromozomální interakce tvořené mezi promotory IGF2/H19 genů a enhancerem. Detailně, paxillin stimuluje interakci mezi enhnacerem a IGF2 promotorem, a tím zvyšuje transkripci IGF2. Paralelně s tím brání interakci mezi enhancerem a promotorem H19, a potlačuje expresi H19.

Jaderné funkce paxillinu jsou zprostředkovány vazbou na kohesin a Mediator
Ukázali jsme, že paxillin spolupracuje s kohesinem a Mediátorem, které zprostředkovávají dalekosáhlé chromozomální smyčky. Navrhujeme, že se tyto interakce uplatňují na IGF2/H19 genového klastru, regulují tvorbu smyček mezi IGF2/H19 promotory a enhacerem, a tím i jejich expresi.

ČÁST II – JADERNÝ PIP2

PIP2 je stabilní součástí transkripčního komplexu RNA pol I během celého buněčného cyklu
PIP2 je spojena s podjednotkami Pol I a UBF během celého buněčného cyklu bez ohledu na transkripci což naznačuje, že PIP2 hraje roli v organizaci jadérka.

PIP2 tvoří kulovité struktury v nukleoplazmě - "PIP2 ostrůvky"
Ukázali jsme, že podstatná část jaderného PIP2 se nachází v dříve necharakterizovaných strukturách, které jsou odlišné od jaderných speckles, a my je označujeme jako PIP2 ostrůvky. Jsou obklopeny nukleovými kyselinami a proteiny, přičemž vnitřní prostor je složen hlavně z látek bohatých na uhlík. Ukázali jsme, že PIP2 ostrůvky jsou evolučně konzervované od prvoků po člověka.

PIP2 ostrůvky jsou zapojeny v transkripci RNA Pol II
Ukázali jsme, že PIP2 ostrůvky kolokalizují s C-terminální doménou Pol II, TATA-box vázajícím proteinem (TBP) a nově vznikajícími RNA transkripty. Kromě toho, hydrolýza PIP2 enzymem PLC snižuje hladinu RNA pol II transkripce. Navrhujeme, že PIP2 ostrůvky jsou zapojeny do transkripce RNA pol II.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Anderson R. A., Boronenkov I. V., Doughman S. D., Kunz J., Loijens J. C. (1999). Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. J. Biol. Chem., 274, 9907–9910.

Arney K. L. (2003). *H19* and *Igf2*: enhancing the confusion?. Trends Genet., 19, 17–23.

Bartolomei M. S., Webber A. L., Brunkow M. E., Tilghman S. M. (1993). Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse *H19* gene. Genes Dev., 7, 1663–1673.

Bartolomei S. M. and Ferguson-Smith A. C. (2011). Mammalian Genomic imprinting. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 3, 1-17.

Bell A. C. and Felsenfeld G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. Nature, 405, 482–485.

Berteaux N., Lottin S., Monte D., Pinte S., Quatannens B., Coll J., Hondermarck H., Curgy J. J., Dugimont T., Adriaenssens E. (2005). *H19* mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1. J. Biol. Chem., 280, 29625–29636.

Boronenkov I. V., Loijens J. C., Umeda M., Anderson R. A. (1998). Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. Mol. Biol. Cell., 9, 3547–3560.

Brunkow M. E. and Tilghman S. M. (1991). "Ectopic expression of the *H19* gene in mice causes prenatal lethality". Genes Dev., 5, 1092–1101.

Cocco L., Martelli A. M., Gilmour R. S., Ognibene A., Manzoli F. A., Irvine R. F. (1988). Rapid changes in phospholipid metabolism in the nuclei of Swiss 3T3 cells induced by treatment of the cells with insulin-like growth factor I. Bioch. Biophys. Res. Com., 154, 1266–1272.

Conaway R. C. and Conaway J. W. (2011). Function and regulation of the Mediator complex. Curr. Oppin. Genet. Dev., 21, 225-230.

Constancia M., Dean W., Lopes S., Moore T., Kelsey G., Reik W., (2000). Deletion of a silencer element in Igf2 results in loss of imprinting independent of *H19*. Nature Genetics, 26, 203–206.

Delaval K. and Feil R. (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. Curr. Opin. Genet. Dev., 14, 188–195.

Déléris P., Bacqueville D., Gayral S., Carrez L., Salles J. P., Perret B., Breton-Douillon M. (2003). SHIP-2 and PTEN are expressed and active in vascular smooth muscle cell nuclei, but only SHIP-2 is associated with nuclear speckles. J. Biol. Chem., 278, 38884-91.

Dong J. M., Lau L. S., Ng Y. W., Lim L., Manser E. (2009). Paxillin nuclear-cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation of the LD4 motif: evidence that nuclear paxillin
promotes cell proliferation. Biochem. J., 418, 173–184.

Doughman R. L., Firestone A. J., Wojtasiak M. L., Bunce M. W., Anderson R. A. (2003). Membrane ruffling requires coordination between type Ialpha phosphatidylinositol phosphate kinase and Rac signaling. J. Biol. Chem., 278, 23036–23045.

Echevarría W., Leite M. F., Guerra M. T., Zipfel W. R., Nathanson M. H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. Nat. Cell. Biol., 5, 440-6.

Fakan S. (2004). Ultrastructural cytochemical analyses of nuclear functional architecture. Eur. J. Histochem., 48, 5–14.

Fiume R., Keune W. J., Faenza I., Bultsma Y., Ramazzotti G., Jones D. R., Martelli A. M., Somner L., Follo M. Y., Divecha N. et al. (2012). Nuclear phosphoinositides: location, regulation and function. Subcell. Biochem., 59, 335–361.

Fomproix N., Gebrane-Younes J., Hernandez-Verdun D. (1998). Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. J. Cell Sci., 111, 359-72.

Gabory A., Jammes H., Dandolo L. (2010). The *H19* locus: Role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. Bioessays, 32, 473–480.

Gebrane-Younes J., Fomproix N., Hernandez-Verdun D. (1997). When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. J. Cell Sci., 110, 2429-40.

Gillooly D. J., Morrow I. C., Lindsay M., Gould R., Bryant N. J., Gaullier J. M., Parton R. G., Stenmark H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. FEBS Lett., 473, 222-226.

Glenney Jr. J. R. and Zokas L. (1989). Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virustransformed cells are present in the membrane skeleton. J. Cell Biol., 108, 2401–2408.

Goto K., Hozumi Y., Kondo H. (2006). Diacylglycerol, phosphatidic acid, and the converting enzyme, diacylglycerol kinase, in the nucleus. Biochim. Biophys. Acta., 1761, 535-41.

Gozani O., Karuman P., Jones D. R., Ivanov D., Cha J., Lugovskoy A. A., Baird C. L., Zhu H., Field S. J., Lessnick S. L., Villasenor J., Mehrotra B., Chen J., Rao V. R. et al. (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. Cell, 114, 99–111.

Halstead J. R., Jalink K., Divecha N. (2005). An emerging role for PtdIns(4,5)P2-mediated signaling in human disease. Trends Pharmacol. Sci., 26, 654–660.

Han L., Lee D., Szabó P. (2008). CTCF is the master organizer of domainwide allele-specific chromatin at the *H19*/Igf2 imprinted region. Mol. Cell Biol., 28, 1124–35.

Hanada K., Song C. Z., Yamamoto K., Yano K., Maeda Y., Yamaguchi K., Muramatsu M. (1996). RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. EMBO J., 15, 2217-26.

Hark A. T., Schoenherr C.J., Katz D.J., Ingram R.S., Levorse J.M., Tilghman S.M. (2000). CTCF mediates methylationsensitive enhancer-blocking activity at the *H19*/Igf2 locus. Nature, 405, 486–489.

Hokin M. R. and Hokin L. E. (1953). Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. J. Biol. Chem., 203, 967–977.

Hynes R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell, 69, 11–25.

Irvine R. F. (2003) Nuclear lipid signalling. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 4, 349–360.

Jaunin F. and Fakan S. (2002). DNA replication and nuclear architecture. J. Cell Biochem., 85, 1–9.

Kaffer Ch. R., Srivastava M., Park K-Y., Ives E., Hsieh S., Batlle J., Grinberg A., Huang S-P., Pfeifer K. (2000). A transcriptional insulator at the imprinted *H19*/Igf2 locus. Genes Dev., 14, 1908–1919.

Kagey M. H., Newman J. J., Bilodeau S., Zhan Y., Orlando D. A., van Berkum N. L., Ebmeier C. C., Goossens J., Rahl P. B., Levine S. S. et al. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. Nature, 467, 430–435.

Kato Y. and Sasaki H. (2005). Imprinting and looping: epigenetic marks control interactions between regulatory elements. Bioessays, 27, 1–4.

Kurukuti S., Tiwari V. K., Tavoosidana G., Pugacheva E., Murrell A., Zhao Z., Lobanenkov V., Reik W., Ohlsson R. (2006). CTCF binding at the *H19* imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. Proc. Natl. Acad. Sci., 103, 10684–10689.

Leighton P. A., Saam J. R., Ingram R. S., Stewart C. L., Tilghman S. M. (1995b). An enhancer deletion affects both *H19* and Igf2 expression. Genes Dev., 9, 2079–2089.

Mais C., Wright J. E., Prieto J. L., Raggett S. L., McStay B. (2005). UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. Genes. Dev., 19, 50-64.

Malik S. and Roeder, R.G. (2010). The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. Nat. Rev. Genet., 11, 761-772.

McCrea H. J. and De Camilli P. (2009). Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. Physiology, 24, 8-16.

Mellman D. L., Gonzales M. L., Song C., Barlow C. A., Wang P., Kendziorski C., Anderson R. A. (2008). A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A)polymerase controls expression of select mRNAs. Nature, 451, 1013–1017.

Murrell A., Heeson S., Bowden L., Constancia M., Dean W., Kelsey G., Reik W. (2001). "An intragenic methylated region in the imprinted Igf2 gene augments transcription," EMBO Reports, 2, 1101–1106.

Murrell A., Heeson S., Reik W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and *H19* into parent-specific chromatin loops. Nat. Genet., 36, 889–893.

Nativio R., Wendt K. S., Ito Y., Huddleston J. E., Uribe-Lewis S., Woodfine K., Krueger C., Reik W., Peters J. M., Murrell A. (2009) Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-*H19* locus. PLoS Genet., 5, e1000739.

Neri L. M., Bortul R., Borgatti P., Tabellini G., Baldini G., Capitani S., Martelli A. M. (2002). Proliferating or differentiating stimuli act on different lipid-dependent signaling pathways in nuclei of human leukemia cells. Mol. Biol. Cell., 13, 947-64.

Okamoto K., Morison I. M., Taniguchi T., Reeve A. E. (1997). Epigenetic changes at the insulinlike growth factor II/*H19* locus in developing kidney is an early event in Wilms tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 5367–5371.

Osborne S. L., Thomas C. L., Gschmeissner S., Schiavo G. (2001). Nuclear PtdIns(4,5)P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. J. Cell. Sci., 114, 2501-2511.

Pannetier M. and Feil R. (2007). Epigenetic stability of embryonic stem cells and developmental potential. Trends in Biotechnology, 25, 556–562.

Payrastre B., Nievers M., Boonstra J., Breton M., Verkleij A. J., Van Bergen en Henegouwen P. M. (1992). A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. J. Biol. Chem., 267, 5078-5084.

Rameh L. E., Tolias K. F., Duckworth B. C., Cantley L. C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Nature, 390, 192–196.

Reik W. and Walter J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nat. Rev. Genet., 2, 21–32.

Scassellati C., Albi E., Cmarko D., Tiberi C., Cmarkova J., Bouchet-Marquis C., Verschure P. J., van Driel R., Magni M. V., Fakan S. (2010). Intranuclear sphingomyelin is associated with transcriptionally active chromatin and plays a role in nuclear integrity. Biol. Cell, 102, 361–375.

Schaller M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. Biochim. Biophys. Acta, 1540, 1–21.

Schill N. J. and Anderson R. A. (2009). Two novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type Igamma splice variants expressed in human cells display distinctive cellular targeting. Biochem. J., 422, 473–482.

Shah Z. H., Jones D. R., Sommer L., Foulger R., Bultsma Y., D'Santos C., Divecha N. (2013). Nuclear phosphoinositides and their impact on nuclear functions. FEBS Journal, 280, 6295–6310.

Seither P., Zatsepina O., Hoffmann M., Grummt I. (1997). Constitutive and strong association of PAF53 with RNA polymerase I. Chromosoma, 106, 216-225.

Smith C. D. and Wells W. W. (1983a). Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes. I. Characterization of in vitro protein phosphorylation. J. Biol. Chem., 258, 9360-9367.

Smith C. D. and Wells W. W. (1983b). Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes. II. Characterization of in vitro protein phosphorylation. J. Biol. Chem., 258, 9360-9367.

Smith C. D. and Wells W. W. (1984a). Characterization of a phosphatidylinositol 4-phosphate-specific phosphomonoesterase in rat liver nuclear envelopes. Arch. Biochem. Biophys. 235, 529-537.

Smith C. D. and Wells W. W. (1984b). Solubilization and reconstitution of a nuclear envelope-associated ATPase. Synergistic activation by RNA and polyphosphoinositides. J. Biol. Chem., 259, 11890-11894.

Steenman M. J., Rainier S., Dobry C. J., Grundy P., Horon I. L., Feinberg A. P. (1994). Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of *H19* in Wilms´ tumour. Nat. Genet., 7, 433–439.

Streb H., Irvine R. F., Berridge M. J., Schulz I. (1983). Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. Nature, 306, 67–69.

Szabó P. E., Tang S. H. E., Silva F. J., Tsark W. M. K., Mann J. R. (2004). "Role of CTCF binding sites in the Igf2/*H19* imprinting control region". Mol. Cell. Biol., 24, 4791–4800.

Tanaka K., Horiguchi K., Yoshida T., Takeda M., Fujisawa H., Takeuchi K., Umeda M., Kato S., Ihara S., Nagata S., Fukui Y. (1999). Evidence that a phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein can function in nucleus. J. Biol. Chem., 274, 3919-22.

Thomas J. W., Cooley M. A., Broome J. M., Salgia R., Griffin J. D., Lombardo C. R. and Schaller M. D. (1999). The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin. J. Biol. Chem., 274, 36684-36692.

Tremblay K. D., Duran K. L., Bartolomei M. S. (1997). A 502-kilobase-pair region of the imprinted mouse *H19* gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. Mol. Cell. Biol., 17, 4322–4329.

van den Bout I. and Divecha N. (2009). PIP5K-driven PtdIns(4,5)P2 synthesis: regulation and cellular functions. J. Cell. Sci., 122, 3837–3850.

Vann L. R., Wooding F. B., Irvine R. F., Divecha N. (1997). Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei. Biochem. J., 327, 569–576.

Varrault A., Gueydan C., Delalbre A., Bellmann A., Houssami S., Aknin C., Severac D., Chotard L., Kahli M., Le Digarcher A. et al. (2006). Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. Dev. Cell, 11, 711–722.

Visnjic D. and Banfic H. (2007). Nuclear phospholipid signaling: phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phosphoinositide 3-kinase. Pflugers. Arch., 455, 19–30.

Wang Y. and Gilmore T. D. (2003). Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. Biochim. Biophys. Acta, 1593, 115–120.

Weber M., Hagege H., Murrell A., Brunel C., Reik W., Cathala G., Forne T. (2003). Genomic Imprinting Controls Matrix Attachment Regions in the Igf2 Gene. Mol. Cell. Biol., 23, 8953-8959.

Wendt K. S., Yoshida K., Itoh T., Bando M., Koch B., Schirghuber E., Tsutsumi S., Nagae G., Ishihara K., Mishiro T., Yahata K., Imamoto F., Aburatani H., Nakao M., Imamoto N., Maeshima K., Shirahige K., Peters J. M. (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. Nature, 451, 796–801.

Yokogawa T., Nagata S., Nishio Y., Tsutsumi T., Ihara S., Shirai R., Morita K., Umeda M., Shirai Y., Saitoh N., Fukui Y. (2000). Evidence that 3'-phosphorylated polyphosphoinositides are generated at the nuclear surface: use of immunostaining technique with monoclonal antibodies specific for PI 3,4-P(2). EMBO J., 19, 4577-88.

Yoon Y. S., Jeong S., Rong Q., Park K. Y., Chung J. H., Pfeifer K. (2007). Analysis of the *H19* ICR insulator. Mol. Cell. Biol.,27, 3499–510.

York J. D. and Majerus P. W. (1994). Nuclear phosphatidylinositols decrease during S-phase of the cell cycle in HeLa cells. J. Biol. Chem., 269, 7847–7850.

SEZNAM ČLÁNKŮ

Paxillin interacts with cohesin and regulates the expression of *IGF2*/*H19* gene cluster

Marášek P., Dzijak R., Studenyak I., Fišerová J., Uličná L., Novák P., Hozák P.

Submitted manuscript

Marasek P. provedl experiment a sepsal manuskript.

UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity.

Sobol M., Yildirim S., Philimonenko V. V., **Marášek P.**, Castano E., Hozak P.

Nucleus 2014, 4:6, 478–486. IF: 3.148

Marasek P. navrhl a proved buněčnou frakcionaci a immunoprecipitaci.

PIP2 islets in the cell nucleus as a novel nuclear compartment

Sobol M., Philimonenko V., **Marášek P.**, Kalendová A., Kalasová I., Uličná L., Pastorek L., Hozák P.

Submitted manuscript

Marasek P. zoptimalizoval podmínky pro hydrolyze PIP2, navrhl a proved experimenty týkající se transkripce

SEZNAM POUŽITÝCH METOD

Klonování

Lentivirová transdukce

Inkorporace BrdU

Western blotting

Analýza hmotnostní spektrometrií

Izolace RNA a QPCR

Pull-down experiment

Genotypování a analýza alelické exprese

Metylační analýza

Chromatin immunoprecipitace (ChIP)

Analýza luciferasových reporter

Chromatin Conformatin Capture (3C)

Světelná mikroskopie, super-rezoluční mikroskopie (SIM)

Imunoelektronová mikroskopie

Elementární mapování (EELS)

Detekce transkripčních mist, inkorporace 5-fluorouridinu (FU)

ŽIVOTOPIS

Osobní údaje:

Pavel Marášek
Datum narození: 17. 9. 1985, 29 let
Národnost: Česká republika

Současná adresa:
Odd. Biologie buněčného jádra, Ústav molekulární genetiky, AV ČR, v.v.i.
Vídeňská 1083, 14220 Praha 4
marasek@img.cas.cz
tel: +420 241 063 152
fax:+420 241 062 289

Vzdělání:

2008 – dosud	Odd. Biologie buněčného jádra, Ústav molekulární genetiky, AV ČR, PhD student – Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, vedoucí: Prof. Pavel Hozák
2006 – 2008	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie; studijní program Obecná a aplikovaná biochemie (Ing.)