

**A TATA-kötő fehérje asszociált faktor 3 (TAF3)
p53-mal való kölcsönhatásának
funkcionális vizsgálata**

Ph.D. ÉRTEKEZÉS

**Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola**

Buzás-Bereczki Orsolya

**Témavezetők: Dr. Boros Imre
Dr. Bálint Éva**

**Biokémia és Molekuláris Biológia Tanszék
SZTE TTIK
Szeged, 2009**

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS

- 1.1. A p53 felfedezése
- 1.2. A p53 általános jellemzése
 - 1.2.1. A p53 fehérje fő szerkezeti elemei
 - 1.2.2. A p53 szintézis transzlációs szintű szabályozása
 - 1.2.3. A p53 poszttranszlációs módosításai
- 1.3. A p53 degradációja
 - 1.3.1. A p53 fehérje proteaszómális lebontásának szabályozása
 - 1.3.2. Az MDM2 a p53 egyik legfontosabb szabályzója
 - 1.3.3. A p53-MDM2-ARF által megvalósuló visszacsatolás
- 1.4. A p53 szerepe a DNS-t károsító ágensek által kiváltott útvonalak szabályozásában
- 1.5. A p53 transzkripciós aktivitása
 - 1.5.1. A p53 szerepe a sejtciklus szabályozásában
 - 1.5.2. A p53 szerepe az érképződés (angiogenezis) folyamatában
 - 1.5.3. A p53 apoptózisban betöltött szerepe
- 1.6. A humán p53 géncsalád (p73/p63) tagjainak jellemzése
 - 1.6.1. A p63 jellemzése
 - 1.6.2. A p73 jellemzése
 - 1.6.2.1. A p73 degradációja
- 1.7. A p53 *Drosophila* homológjának (Dmp53) jellemzése
- 1.8. A transzkripció szabályozása eukariótákban
 - 1.8.1. Az eukarióta transzkripció iniciációjának szabályozása
 - 1.8.2. A TFIID felépítése
- 1.9. A TAF-ok jellemzése
 - 1.9.1. A TAF-ok képesek egymással heterodimerizálódni és a HFD doménen keresztül kölcsönhatni
 - 1.9.2. A TAF3 homológok jellemzése
 - 1.9.2.1. A *Drosophila melanogaster* TAF3 (DmTAF3/Bip2/TAFIII155) jellemzése
 - 1.9.2.2. Az emlős TAF3 homológok jellemzése
- 1.10. A PHD domén jelentősége
- 1.11. A TAF3 eddig bizonyított funkciói
 - 1.11.1. A DmTAF3 szerepe az Ubx génnek kifejeződésében
 - 1.11.2. A DmTAF3 szerepe a *Drosophila melanogaster* szem-szárny transzformációban
 - 1.11.3. A TAF3 szerepe az izom differenciálódásban
- 1.12. A p53 és a TAF-ok között már bizonyított kölcsönhatások
 - 1.12.1. A TAF9 és a p53 közötti kölcsönhatás
 - 1.12.2. A TAF1 és a p53 kapcsolata

2. CÉLKITŰZÉSEK

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- 3.1. Plazmid konstrukciók
- 3.2. Élesztő két-hibrid kísérletek
- 3.3 *In vitro* kötési módszerek
 - 3.3.1. GST-jelölt p53 túltermelése baktériumban
 - 3.3.2. Az *in vitro* ubikvitinációs kísérletben használt humán p53 fehérje termeltetése és tisztítása
 - 3.3.3. A Dmp53 és a DmTAF3 közötti interakció *in vitro* megerősítése

- 3.3.4. GST pull down kísérlet
- 3.3.5. A humán p53 géncsalád tagjainak az emlős homológ TAF3-mal való interakciójának *in vitro* vizsgálata
- 3.4. Sejtes módszerek
 - 3.4.1. Sejtek tenyésztése
 - 3.4.2. Riporter plazmidok tranziens transzfekciója
 - 3.4.3. Luciferáz enzimaktivitás mérése
 - 3.4.4. Immunkicsapás sejtekből
- 3.5. Western blot
- 3.6. Reverz transzkripcióhoz kapcsolt kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-QPCR)
- 3.7. Ubikvitináció vizsgálata
 - 3.7.1. *In vitro* ubikvitináció
 - 3.7.2. *In vivo* ubikvitináció

4. EREDMÉNYEK

- 4.1. A DmTAF3 azonosítása a Dmp53 kölcsönható partnereként élesztő két-hibrid (Y2H) kísérletekkel
- 4.2. A TAF3 és a p53 közötti interakció evolúciósan konzervált
 - 4.2.1. A Dmp53 és a DmTAF3 kölcsönhatásának vizsgálata *in vitro*
 - 4.2.2. Az egér TAF3 és a p53 kölcsönhatásának kimutatása *in vitro* kötési kísérletekkel
 - 4.2.3. Az egér TAF3 és a p53 kölcsönhatásának kimutatása további *in vitro* kötési kísérlettel
 - 4.2.4. Az mTAF3 és a p53 kölcsönhatásának kimutatása humán sejtekben ko-immunprecipitációval
- 4.3. A DmTAF3 és a p53 rokon fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata élesztő két-hibrid módszerrel
 - 4.3.1. Az mTAF3 és a p53 rokon fehérjék kölcsönhatásának *in vitro* vizsgálata
- 4.4. Az mTAF3 hatása a p53 transzkripciót aktiváló képességére
 - 4.4.1. Az mTAF3 hatás specifikusságának vizsgálata a p53 transzkripciót aktiváló képességére
- 4.5. A p53 fehérje szintjének változása az mTAF3 hatására
- 4.6. A p53 mRNS szintjének változása az mTAF3 hatására
- 4.7. Az mTAF3 hatása a p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességére
- 4.8. A p53 rokon fehérjék szintjének változása az mTAF3 hatására U2OS sejtekben
- 4.9. Az mTAF3 PHD domén szerepének vizsgálata
 - 4.9.1. Működhet-e E3 ubikvitin ligázként az mTAF3?
 - 4.9.1.1. *In vitro* ubikvitinációs kísérlet
 - 4.9.2. *In vivo* ubikvitinációs kísérlet
- 4.10. A PHD doménben mutáns mTAF3 hatása a p53 transzkripciót aktiváló képességére
 - 4.10.1. A PHD doménben mutáns mTAF3 hatása a p53 fehérje szintjére
- 4.11. A PHD doménnel nem rendelkező hTAF3 hatása a p53 és rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességére

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

- 5.1. A p53 fehérje új kölcsönható partnere: a TAF3 fehérje
- 5.2. A TAF3 és a p53 közötti interakció evolúciósan konzervált
 - 5.2.1. A DmTAF3 és a Dmp53 kölcsönhatásának megerősítése más *in vitro* módszerrel
 - 5.2.2. Az egér homológ TAF3 és p53 *in vitro* kölcsönhat egymással
 - 5.2.3. Az egér TAF3 és p53 kölcsönhat humán sejtekben is *in vivo*
- 5.3. A TAF3 és a p53 rokon fehérjék kölcsönhatnak *in vitro*
- 5.4. A TAF3 és a p53 közötti interakció funkcionális következménye
 - 5.4.1. Az mTAF3 specifikusan gátolja a p53 transzkripciót aktiváló képességét
 - 5.4.2. A p53 fehérje szintje enyhén csökkent, viszont a mRNS szintje nem változott az mTAF3 hatására

5.5. Az egér TAF3 nem volt hatással a p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességére

5.5.1. Az egér TAF3 csökkentette a p73 α ill. fokozta a p73 β fehérje szintjét, endogén p53 jelenlétében

5.6. A TAF3 PHD doménjének funkciója

5.6.1. A PHD domén kiütése nem képes csökkenteni a p53 transzkripciót aktiváló képességét és fehérje szintjét

5.6.2. A PHD doménnel nem rendelkező hTAF3 gátolja a p53 és a p73 β transzkripciót aktiváló képességét

6. ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK

7. ÖSSZEFOGLALÁS

8. SUMMARY

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

10. HIVATKOZÁSOK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AD: aktivációs domén
ARF: Alternativ Reading Frame
BAB1: Bric-a-Brac 1
BAB2: Bric-a-Brac 2
Bax: Bcl-2 associated-x protein
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
Bip2: Bric-a-Brac kölcsönható partner 2
BTB-POZ: (**B**road-complex, **T**ramtrack and **B**ric-á-brac/**P**oxvirus and **Z**inc fingers)
CBP: CREB kötő fehérje
CMV: citomegalovírus
DBD: DNS-kötő domén
Dmp53: *Drosophila melanogaster* p53
DmTAF3: *Drosophila melanogaster* TAF3
GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
GFP: „green fluorescent protein”-zöld fluoreszcens fehérje
GST: glutation S-transzferáz
HA: hemagglutinin
HFD: Histone Fold Domain
hTAF3: humán TAF3
MDM2: mouse double-minute 2 homolog
mTAF3: *Mus musculus* TAF3
NLS: sejtmagi lokalizációs szignál
OD: oligomerizációs domén
OMM: külső mitokondriális membrán
PBS: phosphate buffered saline
PEST: P/prolin-E/glutaminsav-S/szerin-T/treonin-gazdag szekvencia
PHD: Plant homeodomain
PIC: proteáz inhibitor koktél
PR: prolin gazdag domén
p53: humán p53
Rpb4 és Rpb7: RNS polimeráz II 4-es és 7-es alegysége
RT-QPCR: reverz transzkripcióhoz kapcsolt kvantitatív polimeráz láncreakció
SAM: steril alfa motívum
SD: „standard deviation”- szórás
SDS-PAGE: SDS-poliakrilamid gél elektroforézis
SH3: sarc homológia 3
TA: transzaktivációs domén
TAF3: TATA –box-kötő fehérje asszociált faktor 3
TBP: TATA box-kötő fehérje
TRF3: TBP-related factor 3
Ub: ubikvitin
Y2H: élesztő két-hibrid

1. BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések a vezető halálokok közé tartoznak a fejlett társadalmakban.

A rák kialakulása (*carcinogenesis*) olyan folyamat, ahol felborul a sejtosztódás normális szabályozása. Általában mutációk sorozata vezet a rák kialakulásához, amelyek onkogéneket aktiválnak és tumor szuppresszor gének inaktiválását okozzák. Egy onkogén elősegíti a rák kialakulását, ha egy mutáció következtében bekapcsolódik, míg a tumor szuppresszor gének a rák kialakulását akadályozzák meg, amíg egy mutáció során ki nem kapcsolódnak. A legtöbb humán tumor esetében bebizonyították, hogy bennük mutáns a p53 tumor-szuppresszor gén vagy hibát szenved a p53-as útvonal.

A p53 egy transzkripciós faktor, amelynek kulcs szerepe van a szövetek integritásának fenntartásában a sejtek DNS-tartalmát ért sérülés esetén. A p53 tumor szuppresszor aktivitása annak köszönhető, hogy a DNS károsodás mértékétől függően beindítja a hiba kijavítását vagy súlyosabb esetben leállítja a sejtciklust és apoptózist indukál, így módon a „genom őre” -ként védelmezi a szervezetet.

A p53 fehérje e fontos folyamatokban sokféle fehérjével kapcsolatba lépve tölti be funkcióját és ezeknek a kölcsönhatásoknak a felderítése fontos alapkutatói célkitűzés, amelynek megvalósításán munkacsoportunk tagjai több éve dolgoznak. A program során kutatócsoportunk a Dmp53-nak számos kölcsönható partnerét azonosította. E kölcsönhatások funkcionális következményeinek vizsgálata alapvetően hozzájárul a p53 finom működésének megértéséhez és ezáltal a humán daganatok kialakulásának megismeréséhez és terápiás eljárások kidolgozásához.

1.1. A p53 FELFEDEZÉSE

1979-ben számos munka beszámolt egy 53 kDa molekulásúlyú fehérjéről, melyet az SV40 T-antigénnel szoros komplexben találtak transzformált egér sejtekben. A T antigénre specifikus ellenanyag segítségével rákos páciensek szérumból is gyakran ki tudták mutatni a később már p53-nak nevezett fehérjét, ami rámutatott a humán karcinogenezis folyamatában betöltött szerepére. A p53 cDNS-ének sikeres klónozását követően, lehetővé vált molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálata. Sejtekbe juttatva először azt mutatták ki, hogy a p53 együttműködik a Ras onkogénnel rosszindulatú daganatokban, de kiderült, hogy a munka során használt p53 mutációt hordozott.

Valójában a normál sejtekből izolált p53 cDNS expressziója nem volt onkogén hatású, sőt ellenkezőleg inkább gátolta a sejtek osztódását. A további kutatási eredmények megerősítették, hogy a humán tumorokban a p53 sokkal inkább tumor szuppresszorként működik, mintsem onkogénként. A p53 gén teljes kiütése egerekben egy ideig nem okoz látható abnormalitásokat, az állatok normálisan fejlődnek, de 2-3 hónapos korukban már rosszindulatú daganatok alakulnak ki bennük. Kilenc hónapos korukra pedig majdnem az összes egér elpusztul valamilyen rosszindulatú rákos betegségben (Chumakov, 2007).

1.2. A p53 ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE

A p53 fehérjét a „genom őrének” is nevezik, mert a genotoxikus károsodásokra adott sejtes válaszok koordinálásában létfontosságú szerepet tölt be. A p53 kulcsszerepet játszik a genom integritásának védelmében. Tumor szuppresszor hatásai különböző mechanizmusok révén valósulnak meg. Ez lehet a sejtciklus megállítása, az apoptózis kiváltása, a DNS hibák javításának serkentése és a sejtek öregedésének szabályozása.

A Li-Fraumeni szindrómás egyének, akik a p53 gén hibás allélját örökölték, vagy azok az egér vonalak, amelyekben kiütötték a p53 gént, sokkal nagyobb gyakorisággal mutattak rákos megbetegedést, mint a normál megfelelőik. A rákos daganatok néhány típusában a p53 inaktivációja már a tumorképződés korai szakaszában előfordul, míg más fajtákban csak a későbbi szakaszban mutatható ki.

1.2.1. A p53 fehérje fő szerkezeti elemei

A humán p53 fehérje 393 aminosavból épül fel és struktúráisan, valamint funkcionálisan is számos domént tartalmaz (Brooks és Gu, 2006). A p53 fehérje domén felépítéséből következtetni lehet legfőbb funkcióira, mely a szekvencia-specifikus DNS kötés, a transzkripció aktivációja és a tetramerizáció. E funkciók megléte tekintetében a különböző gerincesek p53 fehérjéi nagy konzerváltságot mutatnak. A fehérje az alábbi öt jellegzetes doménből épül fel (**1. ábra**).



1.ábra: A p53 fehérje domén szerkezete.

(A) A p53 fehérje egyes aminosavain kimutatható mutációk előfordulásának gyakorisága humán tumorokban. (B) A p53 domén-szerkezetének felépítése. Az N-terminális részén található a transzaktivációs és a prolinban gazdag SH3 (sarc homológia 3) domén, középen a szekvencia-specifikus DNS-kötő domén és a fehérje C-terminális részén az oligomerizációs és szabályzó domén (Chumakov, 2007).

Transzaktivációs domén:

A p53 N-terminális részén található a savas aminosavakban gazdag, transzkripciót aktiváló domén, mely 42 aminosavból áll. Ezen a doménon keresztül kapcsolódik az MDM2 fehérje a p53-hoz (Kussie és mtsai, 1996). Az MDM2, a későbbiekben részletesen ismertetett úton irányítja a p53 citoplazmába történő szállítását és lebontását (Roth és mtsai, 1998).

SH3 (sarc homológia 3) domén:

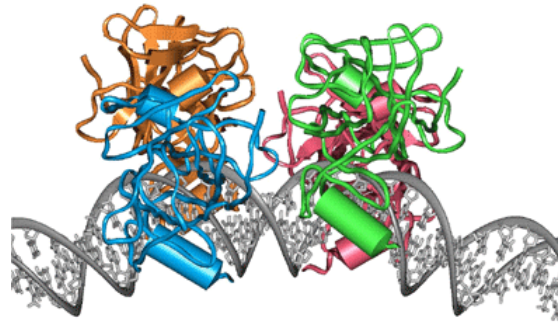
A 63. és 97. aminosav között egy prolin gazdag SH3 domén helyezkedik el. A p53 apoptotikus aktivitásának szabályozásában van fontos szerepe.

DNS kötő domén:

A fehérje középső részén helyezkedik el a szekvencia-specifikus DNS-kötő domén a 94. és a 292. aminosav között (Cho és mtsai, 1994), mely egy Zn atomot köt és számos arginint tartalmaz. A tumorok analízise azt mutatta, hogy a rákos megbetegedések felénél mutáns volt a p53, és a mutációk döntő többségben, 95%-ban a szekvencia-specifikus DNS kötésért felelős központi doménben voltak megfigyelhetők (**1. ábra A**) (Ko és Prives, 1996).

Tetramerizációs domén:

A p53 C-terminális részén a 324. és 355. aminosav között található a tetramerizációs, oligomerizációs domén. Az aktivált p53 fehérje mindig tetramer formában van jelen (**2. ábra**) (Jeffrey és mtsai, 1995).



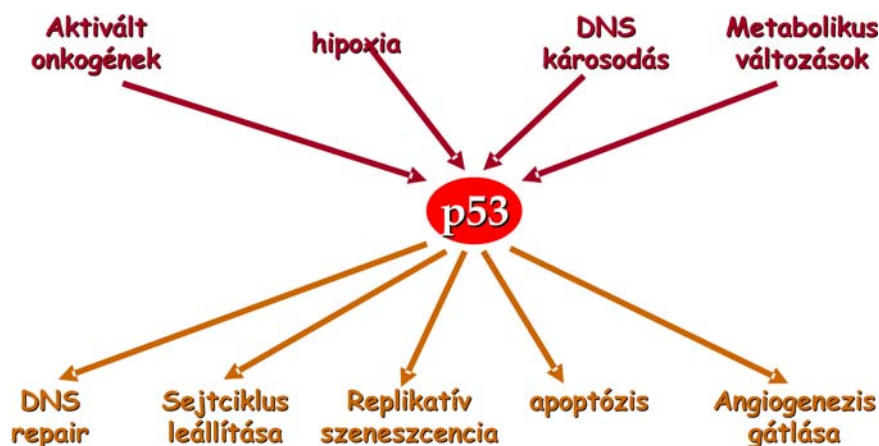
2. ábra: A p53 DNS-hez kötődése.

A p53, mint szekvencia-specifikus DNS-kötő fehérje kristályszerkezeti modeljén látható, hogy tetramer formában (arany, kék, zöld és rózsaszínnel jelölve) kötődik a DNS-hez (szürke színnel jelzett az ábra alsó részén) (Durell és mtsai, 2001).

Szabályozó domén:

A tetramerizációs domént követően pedig a 360. és 393. aminosav között figyelhető meg a szabályozó domén, mely fontos szerepet játszik a p53 aktivitásának és stabilitásának szabályzásában.

Normálisan a p53 fehérje szintje nagyon alacsony a sejtekben, viszont a sejtet érő különböző stresszhatásokra, úgymint hipoxia, aktivált onkogének, kemoterápiás szerek, ionizáló sugárzás (IR) vagy ultraibolya (UV) sugárzás által kiváltott DNS károsodás, megemelkedik a szintje, stabilizálódik és különböző válaszreakciókat indít el, amelyekről részletesen lesz szó a későbbiekben (**3. ábra**) (Ljungman, 2000).



3. ábra: A p53 tumor szuppresszor hatása többre.

A p53-t aktiváló stimulusok és a p53 által indukált sejt-szintű válaszreakciók.

1.2.2. A p53 szintézis transzlációs szintű szabályozása

A p53 képes a saját transzkripcióját és transzlációját befolyásolni egy visszacsatolós reakcióban. Ugyanis a humán p53 fehérje a p53 mRNS 3' nem transzlálódó (UTR) szekvenciáján keresztül képes csökkenteni a saját transzlációját, feltehetően a 3'UTR-hez kötődő RNS-kötő faktorokon keresztül (Fu és mtsai, 1996).

1.2.3 A p53 poszttranszlációs módosításai

A p53 működése emlősökben nem a transzkripció-transzláció szintjén szabályozódik, hanem a fehérje poszttranszlációs módosításai révén, melyek a p53 stabilizációjában és aktivációjában játszanak lényeges szerepet.

A p53 fehérje fő poszttranszlációs módosításai közé tartozik az ubikvitináció, a foszforiláció és az acetiláció (Brooks és Gu, 2003), de léteznek más módosításai is, mint pl. a sumoiláció, a neddiláció és a metiláció (Chuikov és mtsai, 2004). A p53 N-terminális része foszforilálódhat, míg a C-terminális részén, mely szerinben és argininben gazdag, a foszforiláció mellett további módosításokat is megfigyeltek: acetiláció, metiláció és különböző ubikvitin-szerű fehérjék kovalens kötődése, mint a SUMO (Rodriguez és mtsai, 1999) és a NEDD-8 (Xirodimas és mtsai, 2004).

Foszforiláció:

A foszforiláció általában a p53 aktivációjához járul hozzá, azonban nem minden esetben, hiszen pl. a Ser15 foszforilációja a p53 transzaktiváló képességét gátolja, azáltal, hogy megszünteti a p53 és a TATA box-kötő fehérje (TBP) közötti kölcsönhatást, viszont a Ser15 és Ser37 együttes foszforilációja visszaállítja a p53 transzaktiváló képességét, viszont megszünteti az MDM2-p53 közötti interakciót (Pise-Masison és mtsai, 1998).

A p53 N-terminális részén bekövetkező további módosítások közé tartozik a Ser15, Ser20 és Thr18 aminosavak foszforilációja, mely módosítás interferál az MDM2 p53-hoz ill. más E3 ligázok kötődésében, mely elvezet a fehérje stabilizációjához.

A p53 C-terminális része foszforilálódik a Ser315 (CDC14 foszfatáz), a Ser376 (ismeretlen foszfatáz) (Cuddihy AR és mtsai, 1999a; Cuddihy AR és mtsai, 1999b) és a PKR foszfatáz révén a Ser392-es aminosavon, mely pozitívan szabályozza a p53 DNS-hez kötődését és tetramerizációját *in vitro* (Sakaguchi és mtsai, 1997).

Ubikvitináció:

Az ubikvitin izopeptid kötést hoz létre az ubikvitin-szerű fehérjék C-terminális karboxil csoportja és a módosítandó fehérje lizinjének ϵ -amino csoportja között (Ciechanover, 1998). A p53 proteaszóma-függő irányított degradációjában fontos szerepet játszik az MDM2 (mouse double-minute 2 homolog) fehérje (Brooks és Gu, 2006), azonban a p53 ubikvitin-függő lebontásának az MDM2 mellett más szereplői is vannak pl. a COP1, PIRH2, ARFBP/MULE, CHIP ubikvitin E3 ligázok.

Sumoiláció:

A p53 sumoilációja aktiváló hatású módosítás, mely fokozza a p53 transzkripciót aktiváló képességét, azonban a fehérje szintjében nem okoz drámai változást (Rodriguez és mtsai, 1999).

Neddiláció:

A neddiláció egy olyan poszttranszlációs módosítás, amely csökkenti a p53 transzaktiváló képességét (Xirodimas és mtsai, 2004). Kimutatták, hogy a p53 degradációját kiváltó MDM2 képes indukálni a p53 fehérje C-terminális részén levő K370, K372 és K373-as lizinek neddilációját.

Acetiláció:

A p53 C-terminális részének acetilációja megvédi a p53-t az ubikvitinációtól. Sőt a p53 373 és 382-es lizinjének acetilációja fokozza a DNS-kötő aktivitását *in vivo* (Gu és Roeder, 1997; Luo és mtsai, 2004) és elősegíti a p300/CBP (CREB Binding Protein)-vel való kapcsolódását (Barlev és mtsai, 2001).

UV és IR sugárzás hatására a p53 C-terminális részén a Lys382 acetilálódik a p300 révén, ily módon fokozza a p53 stabilitását (Sakaguchi és mtsai, 1998). Ugyancsak UV és IR sugárzást követően a PCAF is acetilálja a p53 C-terminális részén a Lys320-as helyen, így fokozza a p53 szekvencia-specifikus kötődését (Liu és mtsai, 1999).

Metiláció:

Chuikov és mtsai kimutatták, hogy a Set9 metiltranszferáz képes metilálni a p53 C-terminális szabályozó doménben lévő K372-es lizin oldalláncot. A p53 Lys372 Set7/9-függő metilációja a p53 stabilizációját és a transzkripció aktivációját eredményezi.

A p53 C-terminális részén metilálódhat a Lys370 is (Huang és mtsai, 2006) az SMYD2 (SET/MYND Domain-2) fehérje révén, mely képes metilálni a H3-as hiszton K36-os lizinjét is *in vitro* (Brown és mtsai, 2006). A Lys370-es metiláció megakadályozza, hogy a p53 DNS-hez tudjon kötődni. DNS károsodás hatására a Lys370 metiláció gátlódik a Set7/9-függő Lys372 metiláció által (Huang és mtsai, 2006).

Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a különböző poszttranszlációs módosítások egymásra is hatással vannak. Például a p53 N-terminális részén levő Ser33, Ser37 foszforiláció elősegíti a C-terminális Lys320 acetilációját (Sakaguchi és mtsai, 1998). Hasonlóan a Ser6, Ser9, Ser15 és a Thr18 foszforilációja fokozza a p53 p300/CBP által szabályzott acetilációját (Saito és mtsai, 2003).

1.3. A p53 DEGRADÁCIÓJA

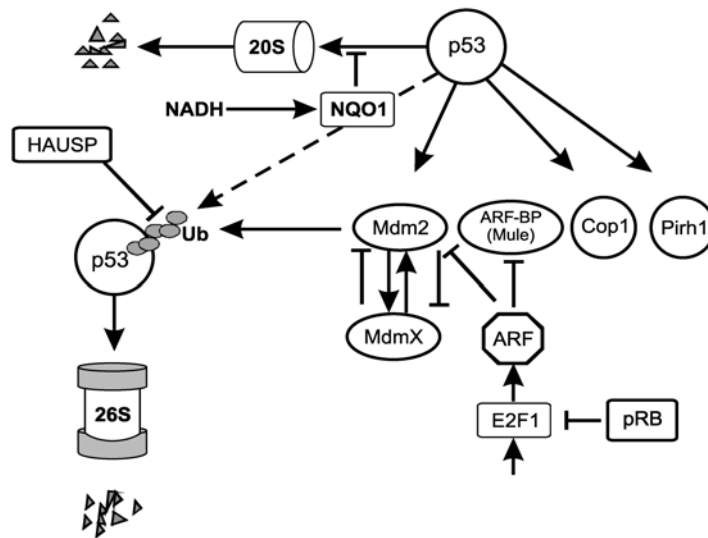
A p53 tumor szuppresszor fehérje gátolja a sejtek osztódását azáltal, hogy megállítja a sejtciklust vagy apoptózist indukál. A stresszmentes sejtekben a p53 fehérje szintje nagyon alacsony, egy proteaszóma-függő irányított degradációs mechanizmus eredményeként. Ebben a folyamatban bizonyítottan nagy szereppel bír az MDM2 fehérje, mely a p53 fehérje N-terminálisához szorosan kötődve, ubikvitin ligáz aktivitásának köszönhetően (Brooks és Gu, 2006) lebontásra jelöli a p53-t.

1.3.1. A p53 fehérje proteaszómális lebontásának szabályzása

A p53 proteaszómális lebontása történhet ubikvitin-függő vagy ubikvitin-független mechanizmus révén (**4. ábra**).

Az **ubikvitin-független** mechanizmus során a 20S proteaszómában történik meg a p53 lebontása (Asher és Shaul, 2005). Ebben a folyamatban fontos szerepet játszik a NAD(P)H-függő quinine oxidoreduktáz (NQO1), ugyanis DNS károsodást kiváltó stresszhatásra képes fokozni az NQO1 p53-hoz kötődését, így a p53 felhalmozódásához járul hozzá (Chumakov, 2007).

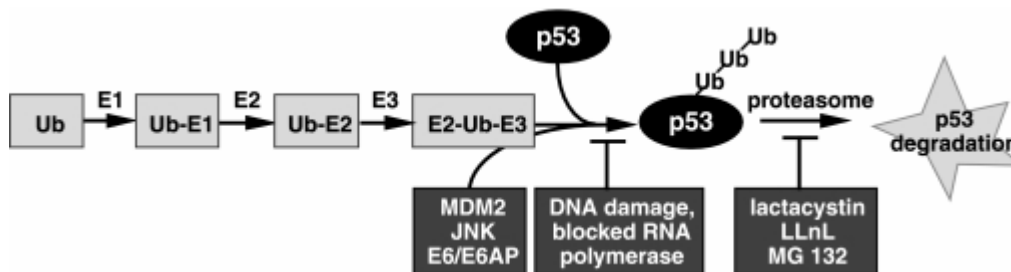
Az **ubikvitin-függő** lebontás főbb szereplői a következő E3 ubikvitin-ligázok (MDM2, COP1, PIRH1, ARFBP/ MULE, CHIP), melyek fontos szerepet játszanak a p53 ubikvitinnal való megjelölésében és végül a 26S proteaszómában bomlik le a p53 fehérje. A PIRH1 egy RING-H2 domént tartalmazó fehérje, mely kölcsönhat a p53-mal és elősegíti az MDM2-független ubikvitinációját és degradációját (Leng és mtsai, 2003). Egy másik fontos E3 ligáza a p53-nak a COP1 (Dornan és mtsai, 2004).



4. ábra: A p53 proteaszómális lebontásának ubikvitin-függő és ubikvitin-független mechanizmusa.

Az ubikvitin-függő lebontásában a következő E3 ubikvitin-ligázok (MDM2, COP1, PIRH2, ARFBP/ MULE, CHIP) játszanak fontos szerepet és a végső lebontást a 26S proteaszóma végzi. Ezzel szemben az ubikvitin-független mechanizmus során a 20S proteaszóma végzi a p53 lebontását (Chumakov, 2007).

A p53 lebontása során az ubikvitinnel történő megjelölése a következő egymást követő enzimatis reakció során valósul meg.

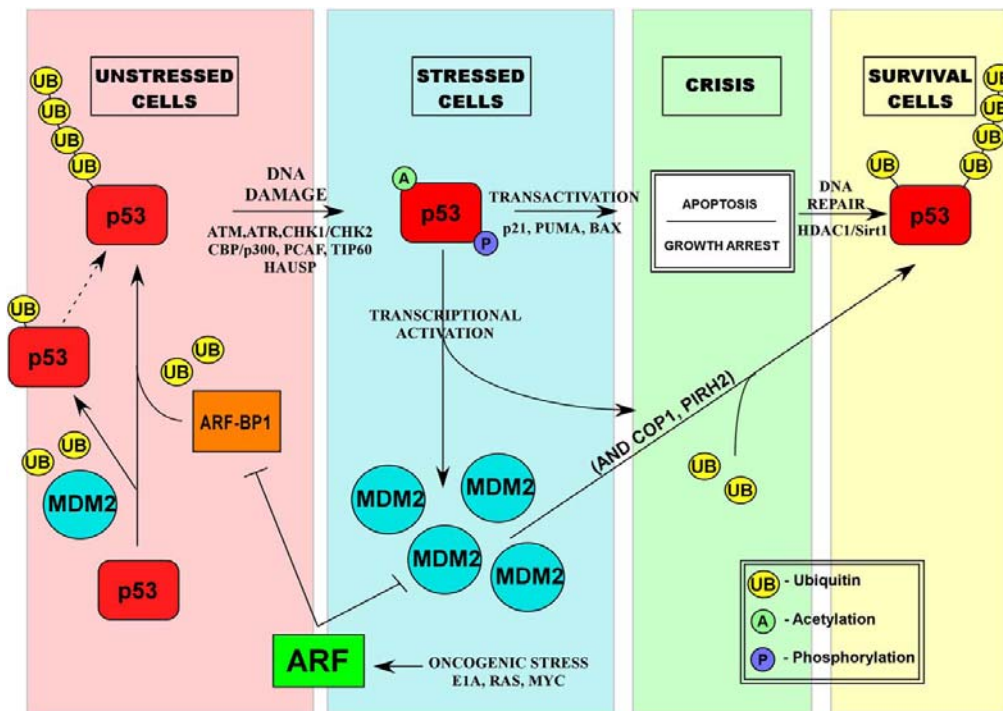


5. ábra: A p53 ubikvitin-függő lebontása.

Az E1 ubikvitin-aktiváló enzim révén aktiválódik az ubikvitin (Ub) ATP felhasználásával. Ezáltal az ubikvitin C-terminális glicinje adenilálódik és tioészterkötést létesít az E1 fehérjében levő cisztein között. Az E1 ubikvitin-aktiváló enzimről az ubikvitin egy transzészterifikációs reakcióban átkerül az E2 ubikvitin-konjugáló enzimre, majd onnan az E3 ubikvitin ligáz enzimre. Sok esetben az E3 ligáz ismeri fel a fehérje szubsztrátot és katalizálja az izopeptidkötést az ubikvitin C-terminálisa és a célfehérje lizinének ε-amino csoportja között (Hershko és Ciechanover, 1992). Az ubikvitinált p53 fehérjét a 26S proteaszóma bontja le (Ljungman, 2000).

Az MDM2-höz hasonlóan mind a COP1, mind a PIRH2 p53-érzékeny célgének, melyek stresszhatásra erősen aktiválódnak. Ezzel szemben az ARF-BP1 nem érzékeny a p53 transzaktivációra, így elképzelhető, hogy nem stresszelt körülmények között van fontos szerepe a p53 turnover-ében, míg az MDM2 a COP1 és PIRH2-vel együtt kulcs szerepet játszik a p53 funkció gátlásában a stresszelt sejtekben (6. ábra).

Míg emberben és egérben mind a PIRH2, COP1, MDM2 és ARF-BP1 jelen van, addig *Drosophila melanogaster*-ben csak a Pirh2 és az Arf-bp1, *Caenorhabditis elegans*-ban csak az Arf-bp1 homológja van jelen. Létezik azonban deubikvitináló enzim (DUBs) is, mint például a HAUSP (=herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease), mely képes kötődni a p53-hoz és stabilizálni annak szintjét, így indukálja a p53 általi sejtnövekedés leállítását és az apoptózist (Hu és mtsai, 2002).



6. ábra: Az MDM2 szerepe a sejtek túlélésében.

A nem stresszelt sejtekben, az alacsony szintű MDM2 aktivitás a p53 monoubikvitinációját indukálja csak, mely nem elegendő a degradációjához, viszont az ARF-BP1 ebben az esetben a fő E3 ligáz, mely felelős a p53 ubikvitinációjáért és degradációjáért. DNS károsodás hatására a p53 aktiválódik és stabilizálódik számos poszttranszkripciós módosítás révén, mely elvezet az mdm2, cop1 és pirh2 gének indukciójához. (Brooks és Gu, 2006)

1.3.2. Az MDM2 a p53 legfontosabb szabályzója

Az MDM2 kötőhelye a p53 N-terminális régiójában van, így képes gátolni a p53-irányította transzkripció aktivitást, azáltal, hogy blokkolja a p53 kölcsönhatását további transzkripció koaktivátorokkal (Momand és mtsai, 1992). Az MDM2 fehérje számos konzervált domént tartalmaz, beleértve az N-terminális p53-kötő, a C-terminális RING finger domént, mely a p53 ubikvitinációját és saját autoubikvitinációját is irányítja (Honda és Yasuda, 2000). Ezen kívül tartalmaz egy középső, savas régiót is, mely szabályozó funkcióval rendelkezik (Argentini és mtsai, 2001). Számos fehérje esetében kimutatták a savas doménnel való interakciót, ilyen pl. a p14^{ARF} (Midgley és mtsai, 2000) fehérje és a TATAbox-kötő fehérje (TBP) (Léveillard és Wasyluk, 1997). Ez is egy fontos bizonyítéka annak, hogy a transzkripciót aktiváló faktoroknak (TAF) fontos összekötő szerepük van a szekvencia-specifikus transzkripció faktorok és az alap transzkripció gépezet között (Farmer és mtsai, 1996). Kimutatták, hogy a p53 C-terminális részén levő 6 lizin (K370, K372, K373, K381, K382, K386) szolgál az MDM2 számára a fő ubikvitinációs helynek. Az alacsony szintű MDM2 aktivitás a p53 monoubikvitinációját és a p53 sejtmagi exportját szolgálja, míg a magas szintű aktivitása a p53 poliubikvitinációját és degradációját idézi elő (Shirangi és mtsai, 2002). Az MDM2 elősegíti a p53 sejtmagból citoplazmába történő szállítását, azáltal, hogy ubikvitinálja a p53 C-terminális részét. Ugyanis a p53 fehérje két sejtmagi export szekvenciát (NES=nuclear export sequence) tartalmaz, egyet az N terminális, egyet a C-terminális részén (Stommel és mtsai, 1999).

Az mdm2 kiütése korai embrionális letalitást okoz a kontrollálatlan p53-irányította apoptózis révén (De Rozières és mtsai, 2000). Az MDM2 mellett a Jun kináz (JNK) is szerepet játszik a p53 lebontásában nem stresszelt sejtekben. Míg a p53-t az MDM2-vel komplexben főleg a sejtciklus S és G₂/M fázisaiban, addig a JNK-p53 komplexet főleg a G₀/G₁ fázisban lehet kimutatni (Fuchs és mtsai, 1998). Ebből is szépen látszik, hogy a p53 lebontása az MDM2 ill. a JNK révén a sejtciklus különböző szakaszaiban valósul meg egymástól függetlenül.

1.3.3. A p53-MDM2-ARF által megvalósuló visszacsatolás

A p53 szabályozza a saját negatív szabályzójának, az MDM2-nek az expresszióját egy visszacsatolós folyamatban, mivel az MDM2 expressziója transzkripciósan aktiválódik a p53 által (Barak és mtsai, 1993). Az MDM2 azon képessége, hogy kötődik a p53-hoz és ubikvitinálja, gátolható a p14^{ARF} (Alternative Reading Frame, p14^{ARF} humánban, p16^{ARF} egérben) tumor szuppresszor révén (Midgley és mtsai, 1997).

A p14^{ARF} fizikális kölcsönhatásban áll az MDM2 fehérjével és ez az interakció gátolja az MDM2 ubikvitin ligáz funkcióját. A p14^{ARF} expresszióját olyan onkogének indukálják, mint a Myc, a Ras, az E2F-1 transzkripciós faktor és az E1A virális fehérje. A vad típusú p53 expressziója elvezet a p14^{ARF} transzkripciójának gátlásához, ezáltal valósul meg a p53 és a p14^{ARF} közötti visszacsatoló reakció. Tehát az ARF protein szupresszálja az aberráns sejtnövekedést az onkogén aktivációra adott válaszként, részben a p53 útvonal indukciójával (Sharpless és DePinho, 2004).

1.4. A p53 SZEREPE A DNS-T KÁROSÍTÓ ÁGENSEK ÁLTAL KIVÁLTOTT ÚTVONALAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

A p53 indukciójának mechanizmusa két különböző DNS-károsító ágens (UV fény és ionizáló sugárzás) esetében eltérő lehet, bár mindkettő a DNS károsodását indukálja és a p53 felhalmozódásához vezet.

Az **UV sugárzás** hatására kiterjedt léziók (károsodások) jelennek meg és blokkolódik az RNS polimeráz (Ljungman és mtsai, 1999). Ezt követően az ATR kináz aktiválódik (Tibbetts és mtsai, 1999), mely közvetlenül foszforilálja a p53 Ser15-ös aminosavat és egyben aktiválja a Chk1 kinázt, mely képes foszforilálni a p53-t a Ser20-as helyen (Chehab és mtsai, 1999). Ezzel szemben az **ionizáló sugárzás** a DNS szál törését okozza a transzkripció gátlása nélkül, ugyanakkor egy gyors p53 indukciót okoz emlős sejtekben (Lu és Lane, 1993).

Az ionizáló sugárzás okozta DNS szál törés kijavítása általában sokkal gyorsabb, mint a kiterjedt léziók kijavítása (Ljungman, 1999). A szignál érzékelését követően az ATM kináz aktiválódik, mely foszforilálja a p53-t a Ser15-ös helyen (Sarkaria és mtsai, 1999). Másik fontos target a Chk2 fehérje kináz (Matsuoka és mtsai, 1998), mely az ATM-mel együttműködve szabályozza a sejtciklus megállítását és közvetlenül foszforilálja a p53 Ser20 aminosavat (Chehab és mtsai, 2000). Ez a mechanizmus fokozott stabilitást biztosít a p53-nak, azáltal, hogy megvédi az MDM2 irányította lebontástól (Matsuoka és mtsai, 1998).

Tehát a p53 mind védő, mind pedig apoptózist-elősegítő szereppel rendelkezik a DNS-t károsító ágens hatását követően. Azt, hogy az adott sejt megmeneküljön-e vagy inkább elpusztuljon sok faktor pl. a sejt típusa, a károsodás mértéke és a sejt onkogén státusza együttesen határozza meg: (Sionov és Haupt, 1999).

1.5. A p53 TRANSZKRIPCIÓS AKTIVITÁSA

A p53 általi tumor szuppresszor hatása a p53 transzkripció aktivátor funkcióján alapul (Levine és mtsai, 1994). Az előzőekben bemutattam, hogy a p53 hogyan stabilizálódik és aktiválódik különböző stressz-hatásokra. Az aktiválódott p53 többféle sejt választ indít el (**3. ábra**). A p53, mint transzkripció faktor, aktiválja célgénjeit, melyeken keresztül részt vesz a sejt ciklus szabályzásában (p21, ciklin G, Bax stb), a keletkezett hibák kijavításában, a DNS javító (repair) folyamatokban DNS polimeráz η , MSH2, PCNA, MLH1, PMS2, RAD51, WRN, RecQ4 géneken keresztül és az érképződés (angiogenezis) gátlásában, végül az apoptózisban (Chumakov, 2007). A p53-kötő helyben a PuPuPuCA/TA/TGPyPyPy szekvencia kétszer ismétlődik. P53-kötő helyeket nem csak a célgének promóterében, hanem intronjaiban és enhancerekben is azonosítottak.

1.5.1. A p53 szerepe a sejt ciklus szabályzásában

Az aktiválódott p53 fehérje kötődik a p21 gén promóterében lévő p53-kötő helyekhez és a p21 gén kifejeződését váltja ki. A p21 fehérje gátolja a ciklin-függő kinázok működését (Cdk2-cyclin E), melyek fontos szerepet játszanak a sejt ciklus G1 fázisból S fázisba való átmenet során. Így a p21 fehérje megállást okoz a sejt ciklus G1 fázisban és megakadályozza a sejtek S fázisba való belépését. Ha a sejtek már beléptek az S fázisba, akkor a p21 blokkolja a kis magi nukleáris fehérje, a PCNA (=Proliferating Cell Nuclear Antigen) aktivitását, mely a DNS replikációban és a DNS javító folyamatokban játszik fontos szerepet.

A p53 által elindított kaszkád folyamatok révén a p21-en keresztül leállítja a sejt ciklust és öngyilkosságra ítéli a sejteket (Dulic és mtsai, 1994). A sejtosztódás másik fontos negatív szabályzója a Gadd45 (Kastan és mtsai, 1992), mely szintén a p53 célgénje.

1.5.2. A p53 szerepe az érképződés (angiogenezis) folyamatában

A tumoros, abnormális sejtek növekedésének szabályzásában fontos szerepet játszik a p53, többek között a tumorok érképződésének gátlásával. A p53-által szabályzott gének közé tartozik az angiogenezis gátló thrombospondin TSP-1, GD-AIF, BAI1, a tumorok elterjedésének és az áttétek (metasztázis) kialakulásában gátló szerepet játszó KAI1, a kollagenáz MMP2, MASPIN és a plazminogén aktivátor fehérjét gátló PAI-1 és számos szekretáló fehérje faktor, mely gátolja a károsodott sejtek növekedését (Chumakov, 2007).

1.5.3. A p53 apoptózisban betöltött szerepe

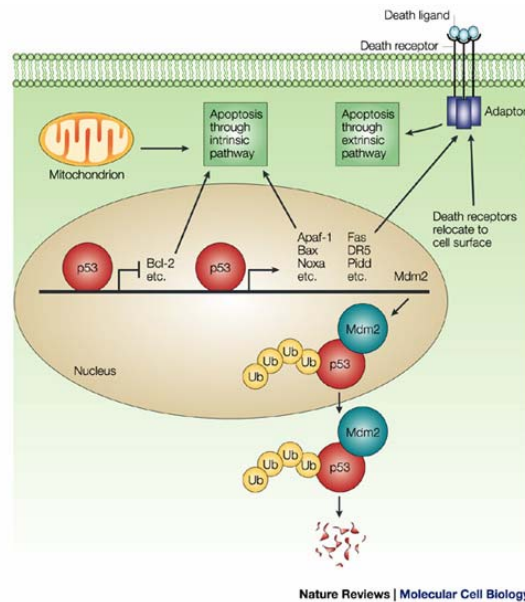
A p53 az apoptózist kétféle úton válthatja ki, transzkripció-függő és független mechanizmus révén (Moll és mtsai, 2005).

A sejtmagi p53 a transzkripció aktivitásának köszönhetően indukálja a Puma, Noxa és Bid fehérjéket, ez az útvonal valósítja meg a **transzkripció-függő mechanizmust**, míg a citoszolikus ill. mitokondriális p53 egy **transzkripció-független mechanizmussal** közvetlenül aktiválja a Bax/Bak fehérjéket és gátolja a Bcl-2/Bcl-xL anti-apoptotikus hatását. Mindkét útvonal megegyezik abban, hogy közvetve vagy közvetlenül képes aktiválni a pro-apoptotikus Bcl-2 család tagjait, mely elvezet az OMM permeabilizációjához (=áteresztő képességéhez), a citokróm-c felszabadulásához és a kaszpáz-3 aktivációjához.

A p53 fehérje mind külső, mind belső, mitokondriális apoptotikus útvonalon keresztül képes apoptózist indítani (**7. ábra**).

A **külső** apoptotikus útvonal a halál receptorok aktivációján keresztül valósul meg, majd ezt követi az iniciátor kaszpáz 8 aktivációja.

A **belső** apoptotikus útvonal a mitokondriumokban a citokróm-c felszabadulását követően, az APAF-1 adaptor fehérjén keresztül az iniciátor kaszpáz 9 aktivációjával valósul meg (Vousden és Lu, 2002).

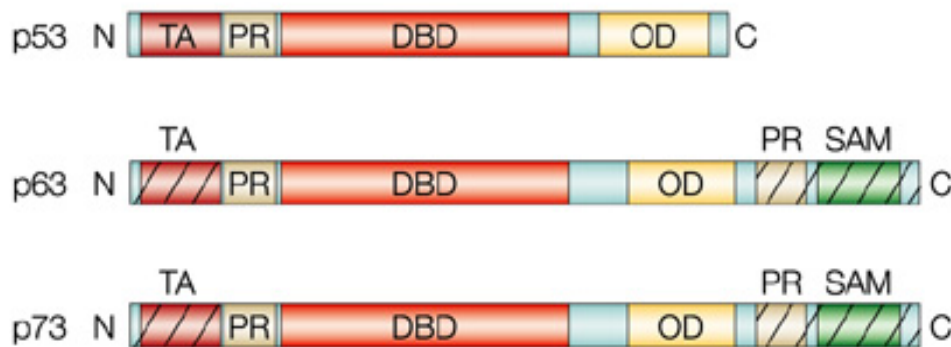


7. ábra: A p53 apoptózisban betöltött szerepe.

A p53 két úton képes apoptózist indukálni, egy külső (extrinsic) útvonalon a halál receptorok aktivációján keresztül (Fas, DR5, Pidd) és egy belső, mitokondriális útvonalon, mely az anti-apoptotikus Bcl-2 transzkripciójának represszálásával és a pro-apoptotikus Bax, Noxa, Puma gének transzkripciójának aktivációjával valósul meg. Bcl-2 (=B-cell lymphoma 2); Apaf (=Apoptotic protease-activating-factor); Bax (=Bcl-2 associated X protein); DR5 (=death receptor 5); Pidd (= p53 protein induced, with death domain). (Jesenberger és Jentsch, 2002)

1.6. A HUMÁN P53 GÉNCSALÁD (P73/P63) TAGJAINAK JELLEMZÉSE

Gerincesekben a p53 géncsaládnak további két tagja van, a p63 és p73. Mindkettő számos izoformát képes kifejezni alternatív promóter használat és alternatív splicing (mRNS érés) révén. A p63 és p73 géneket 1997-ben azonosították. A humán p63 és a p73, strukturálisan hasonlítanak a p53-hoz (**8. ábra**) és bár nem közvetlenül vesznek részt a tumor szuppresszióban, szerepüket az apoptózisban számos cikk bizonyította (Yang, 1998). A család tagjai között fennálló hasonlóságnak köszönhetően a p63 és a p73 képesek transzaktiválni a p53 célgénjeit (Di Como és mtsai, 1999; Gaiddon és mtsai, 2001), és ezáltal sejtciklus megállást és apoptózist indukálni. A p53 és a p73 közötti funkcionális hasonlóság ellenére a p73 funkcióját szabályozó mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak (Murray-Zmijewski és mtsai, 2006).



8. ábra: A humán p53 géncsalád tagjai p53, a p63 és p73.

A családtagok doménszerkezete erős konzerváltságot mutat. TA (transactivation domain); PR (proline-rich domain), DBD (DNA-binding domain), OD (oligomerization domain), SAM (sterile alpha motif) (Melino és mtsai, 2002).

1.6.1. A p63 jellemzése

Egérben végzett genetikai kísérletek igazolták a p63 esszenciális szerepét az epidermisz és a végtagok kifejlődésében. Emberben a p63 ivarsejtvonalbeli mutációjához hat ritka autoszómális domináns fejlődési betegséget (EEC, ADULT, LMS, Hay-Wells, SHFM és Rapp-Hodgkin szindróma) kötnek. Az EEC és ADULT szindrómák esetében a p63 DNS-kötő doménjében történik missense mutáció.

1.6.2. A p73 jellemzése

A p73 gén 7 alternatív C-terminális izoformát (α , β , γ , δ , ϵ , ζ és η) és 4 alternatív N terminális izoformát képes kifejezni.

A $\Delta Np73$ izoformák (hiányzik a transzaktivációs domén) erősen expresszálódnak fejlődő egér agyban, szemben a TAp73 izoformákkal, melyek tartalmazzák a transzaktivációs domént az N-terminális részen. A p73 gén kifejeződése fejlődésileg szabályzott a vese fejlődése során ill. fontos szerepet játszik a fejlődő nefronok végső differenciációjában. A C-terminális splice variánsok eltérő transzkripció aktivitással rendelkeznek. A p73 α és p73 β a normál myeloid differenciációval, míg a p73 γ , p73 δ és p73 ϵ a leukémiás blasztokkal hozható kapcsolatba, sőt a p73 ϵ abszolút specifikus a leukémiás blaszt sejtekre. További bizonyíték a sejtes differenciációban betöltött szerepükre, hogy a Tap73 γ és Tap73 δ részt vesz a humán bőr keratinociták terminális differenciációjában.

A p73 hiányos egereknek olfaktoriális és neuronális rendellenességei vannak. Azokban az egerekben, ahol az összes p73 izoforma funkcionálisan hibás, súlyos defektusokat figyeltek meg, ilyen pl. a hippocampusz fejletlensége, vízfejűség, krónikus fertőzések és gyulladások, a feromon érzékelő útvonalak hibái, bár nem mutattak fokozottabb hajlamosságot a rák kialakulására. A p73 hiányos hím egerekben hiányzik a szexuálisan érett nőstények iránti érdeklődés és agresszívan viselkednek más hímekkel. Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy az érzékelő és hormonális rendszer hibái hozzájárulhatnak a szaporodási és viselkedésbeli fenotípusokhoz.

A p73 eltérő szinten fejeződik ki számos tumor esetében pl. a húgyhólyag, mell, tüdő, a máj ill. az idegrendszert érintő karcinómákban. Érdekes módon az egyik N-terminálisan csonkolt p73 (ex2p73) rák-specifikus izoformának tűnik, mivel a normál, egészséges szövetekben nem termelődik, viszont pl. a neuroblasztoma ill. hüvely és petefészekrák esetében megfigyelhető. Szemben a p63-mal, a p73 gén ivarsejtvonalbeli mutációját eddig még semmilyen humán genetikai rendellenességben nem találták meg (Murray-Zmijewski és mtsai, 2006).

1.6.2.1. A p73 degradációja

A p53 MDM2 kötő régiója már nagyon jól jellemzett és a p73 ezen doménje nagy hasonlóságot mutat a p53-éhoz (Picksley és mtsai, 1994). Kimutatták, hogy nemcsak a p53, de a p73 α is képes kötődni az MDM2-höz és hogy mindkét fehérje az MDM2 hasonló régiójához kötődik. Míg a p53 MDM2 együttes ko-transzfekciója sejtekben csökkentette a p53 fehérje szintjét, addig a p73 α fehérje szintjében nem okozott csökkenést. Ez részben magyarázható azzal, hogy valószínűleg a p73 α és az MDM2 közötti kötés nem olyan hatékony, mint a p53 és az MDM2 között létrejövő.

Tehát valószínűleg a p73 α stabilitását nem az MDM2 szabályozza. Bár az MDM2 nem képes lebontani a p73 α fehérjét, mégis nagymértékben képes csökkenteni a p73 α transzkripciót aktiváló képességét (Balint és mtsai, 1999). A p53-mal szemben az MDM2 nem képes a rokon fehérjék (p73 α , p73 β) sejtmagi exportjának kiváltására. Az eredményekből tehát egyértelműen látszik, hogy a p53 és p73 gének szabályozása egészen másképp valósul meg (Balint és mtsai, 1999).

1.7. A P53 *DROSOPHILA* HOMOLÓGJÁNAK (DMP53) JELLEMZÉSE

Míg emlősökben a p53 géncsaládnak további két tagja van, addig *Drosophila melanogaster*-ben a p53-nak egyetlen ortológja ismert. A 385 aminosavból felépülő *Drosophila* p53 (Dmp53) fehérje struktúráisan és funkcionálisan is homológ az emlős p53-mal. A Dmp53 és a humán p53 (p53) között legnagyobb azonosságot aminosav szinten a központi, DNS-kötésért felelős domén esetében találtak (25%), míg az N- és C-terminális részek között kisebb mértékű volt csak a hasonlóság (13%). A Dmp53 és a humán p53 DNS-kötő doménjei közötti nagymértékű hasonlóság magyarázza, hogy a Dmp53 képes humán p53 konszenzus kötőhelyéhez kötődni (Jin és mtsai, 2000). A humán p53-mal szemben a *Drosophila* p53 N-terminális része nem tartalmaz MDM2-kötőhelyet (Kussie és mtsai, 1996), viszont tartalmaz egy ún. PEST-szekvenciát, mely a p53-ban nem figyelhető meg. Ez protein degradációs szignálként működik, úgy tűnik tehát, hogy a Dmp53 fehérje stabilitásának szabályozása ezen a szekvencián keresztül valósul meg (Rechsteiner és Rogers, 1996). További lényeges különbség, hogy az emlős p53-mal szemben a Dmp53 túltermelődése nem indukál G1 sejtciklus megállást. A Dmp53 által indukált apoptózis kiváltása számos pro-apoptotikus gén aktivációján keresztül valósul meg, mint pl. a *reaper* (*rpr*), *sickle* (*skl*), *grim* (*grm*) (Chen és mtsai, 1996) és a *hid* (head involution defective). *Drosophila* szem diszkuszban a Dmp53 overexpressziója sejthalált indukál és durva szem fenotípust okoz (Jin és mtsai, 2000), míg a domináns negatív Dmp53 gátolja a gamma-sugárzás okozta apoptózist. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a humán p53 ektópikus expressziója *Drosophila* szem diszkuszban sejtciklus megállást és apoptózist indukál (Yamaguchi és mtsai, 1999) ill. *Drosophilában* a sugárzást követően a sejtciklus G2/M fázisában mutat megállást (Brodsky és mtsai, 2000).

A Dmp53 nem esszenciális az állat normális fejlődéséhez, viszont a Dmp53 null mutánsok mutagén-érzékeny fenotípust mutatnak UV sugárzásra is (Ujfaludi és mtsai, 2007), mely csökkent életképességben, kromoszóma instabilitásban nyilvánul meg.

1.8. A TRANZKRIPTCIÓ SZABÁLYZÁSA EUKARIÓTÁKBAN

Eukariótákban a transzkripció folyamata sokkal komplexebb, mint baktériumokban, ahol a transzkripció beindulása a core RNS polimeráz mellett csak a szigma faktor (σ) jelenlétét igényli.

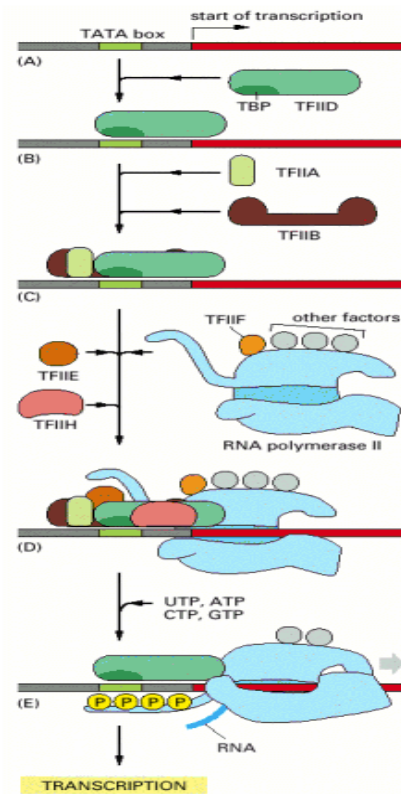
A baktériumokkal szemben az eukarióta RNS polimeráz további fehérjék, úgynevezett *általános transzkripciós faktorok* segítségével együtt képes a transzkripció iniciációjára. Ezeket a fehérjéket, a funkciójukra utalva, RNS polimeráz II transzkripciós faktornak, röviden TFII-nek szokták nevezni.

Míg baktériumokban egyetlen RNS polimeráz létezik, addig eukariótákban három struktúráisan egymáshoz hasonló RNS polimeráz működik, melyek különböző típusú gének átírását szolgálják. Az *RNS polimeráz I* a riboszómális gének, az *RNS polimeráz III* a transfer RNS gének, az *RNS polimeráz II* pedig az összes fehérjét kódoló gén átírását szolgálja.

1.8.1. Az eukarióta transzkripció iniciációjának szabályzása

Eukariótákban a fehérjétt-kódoló gének transzkripciója a TBP (TATA box-binding protein) és 5 alap transzkripciós faktor TFII-A, -B, -E, -F,-H-ból felépülő pre-iniciációs komplex (PIC) összeszerelődését igényli (Buratowski és mtsai, 1989) a promóter régióban. Sőt az eukarióta transzkripció iniciációjakor a DNS-t hozzáférhetővé kell tenni a transzkripciós apparátus számára, ami a magasabbrendű kromatin struktúra és a nukleoszómák fellazítását igényli.

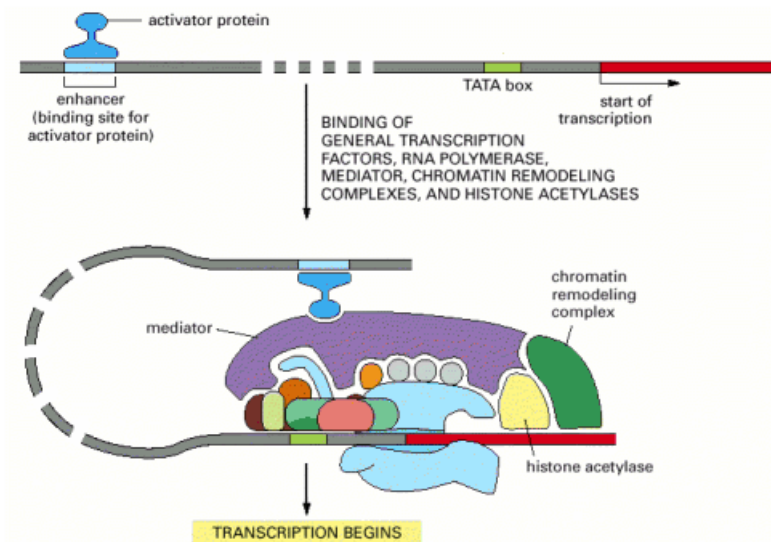
A transzkripció iniciációjának első kulcs lépése a TBP-t tartalmazó TFIID komplex bekötődése a transzkripciós startponttól 25 nukleotiddal előrébb elhelyezkedő úgynevezett TATA box régióba. Ez egy nagy torzulást idéz elő a DNS-en, így lehetővé válik további általános transzkripciós faktorok és az RNS polimeráz II bekötődése a megfelelő helyre. Egy másik kulcs lépés az RNS polimeráz II C-terminális farki részének (CTD) foszforilációja a TFIIH segítségével, ami olyan konformációs változást idéz elő, melynek hatására a polimeráz elengedi az általános faktorokat és elindulhat a transzkripció elongációja (**9. ábra**).



9. ábra: Az eukarióta transzkripció iniciációja.

(A) A transzkripció kezdőpontjától 25 nukleotidra helyezkedik el a TATA box-nak nevezett DNS szekvencia. (B) A TATA box-ot a TFIID transzkripciós faktor alegysége a TBP ismeri fel, mely komplex formában kötődik hozzá és lehetővé teszi a TFIIB és TFIIA bekötődését (C). (D) Az általános transzkripciós faktorok többi tagja (TFIIE, TFIIH, TFIIF) és maga az RNS polimeráz II is bekötődik végül a promóter régióba. (E) A TFIIH foszforilálja az RNS polimeráz C-terminális farki részét és ATP-t használva kiemeli a DNS dupla hélix-et a transzkripciós start pontból, így elkezdődhet a transzkripció. (Alberts és mtsai, 2002)

Eukariótákban a transzkripció iniciációja a fentiekben ismertetett általános transzkripciós faktorok mellett még további szabályozó fehérjék bekötődését igényli. Ide tartoznak a transzkripciós aktivátorok (enhancer), az aktivátor fehérjék RNS polimeráz II-vel és az általános transzkripciós faktorokkal való kommunikációját szolgáló mediátor komplex és a kromatin újrendezésében fontos szereppel bíró, kromatin átrendező (remodeling) és hiszton acetiltranszferáz komplexek (10. ábra).



10. ábra: Az RNS polimeráz II katalizálta transzkripció iniciációja eukariótákban.

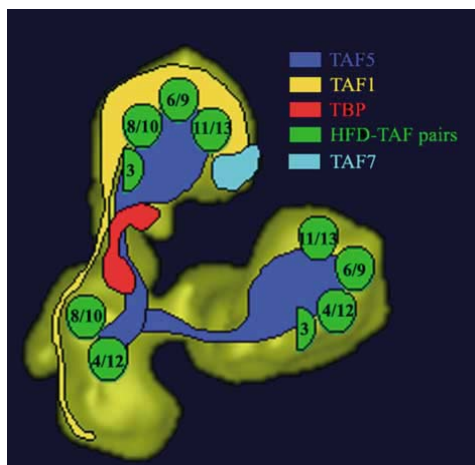
Az eukarióta transzkripció iniciációjához szükséges preiniciációs komplex, mely tartalmazza a TBP-TFIID komplexet, a többi általános transzkripciós faktortól együtt, az RNS polimeráz II enzimet, az aktivátort, a mediátort, a kromatin remodeling és a hiszton acetiltransferáz komplexet. (Alberts és mtsai, 2002)

1.8.2. A TFIID felépítése

Számos RNS polimeráz II által átírt gén transzkripció iniciációjának kulcs szereplője a TFIID szekvencia-specifikus DNS-kötő transzkripciós faktor. A TFIID a TATA box-kötő fehérjéből és a TBP-hez kapcsolódó faktorokból (TAFs=TBP-associated factors) (Frontini és mtsai, 2005) szerelődik össze. A TFIID felépítése jól jellemzett mind *Drosophila*, humán és élesztő szervezetekben is (Farmer és mtsai, 1996).

Saccharomyces cerevisiae-ben a TFIID 14 TBP-asszociált faktorból és a TBP-ből épül fel (Sanders és mtsai, 2002). Elektronmikroszkópos analízise azt mutatta, hogy a komplex 3 lebenyre (A, B, C) osztható. A TBP az A és C lebeny közötti összekötő doménben helyezkedik el. A TAF1 N-terminális része a C lebenyben, míg a hiszton acetiltransferáz doménje az A lebenyben található a TAF7-tel együtt.

A TAF5 két példányban van jelen a komplexben, mivel a C-terminális része az A és B lebenyben, míg mindkét példány N-terminális vége a C lebenyben helyezkedik el (Leurent és mtsai, 2004). Az általam vizsgált TAF3 fehérje elhelyezkedését az A és B lebenyben gondolják (11. ábra).



11. ábra: A TAFok elhelyezkedése az élesztő TFIID (yTFIID) 3 dimenziós modeljén.

A hiszton-fold tartalmú párok elhelyezkedését a zöld körök jelzik (Leurent és mtsai, 2002). A TAF1 és TAF5 kiterjedése két lobusban is megfigyelhető. A színezett területek mérete és alakja nem egyezik meg a jelzett fehérjék polipeptid tömegével. (Leurent és mtsai, 2004)

1.9. TAF-OK JELLEMZÉSE

A fentiekben jellemzett TFIID komplex számos TBP-asszociált faktorból épül fel. Mivel munkám során az egyik TAF fehérje, a TAF3 szerepét vizsgáltam, ezért a következőkben a TAF fehérjéket szeretném részletesebben bemutatni.

A TFIID felépítése erős konzerváltságot mutat az evolúció során (Tora, 2002). A *Drosophila*, humán és élesztő TFIID összehasonlítása megmutatta, hogy a komplexet alkotó TAF-ok milyen magas szintű konzerváltságot mutatnak az egyes fajok között.

Az **1. táblázat** 13 evolúciósan konzervált TAF (Sanders és Weil, 2000) *Drosophila* és humán ortológjainak elnevezését foglalja össze (Tora, 2002).

New name	<i>H. sapiens</i> [hs]	<i>D. melanogaster</i> [dm]
TAF1	TAF _{II} 250	TAF _{II} 230
TAF2	TAF _{II} 150	TAF _{II} 150
TAF3	TAF _{II} 140	TAF _{II} 155 or BIP2
TAF4	TAF _{II} 130/135	TAF _{II} 110
TAF4b	TAF _{II} 105	
TAF5	TAF _{II} 100	TAF _{II} 80
TAF5b		
TAF5L	PAF65 β	Cannonball
TAF6	TAF _{II} 80	TAF _{II} 60
TAF6L	PAF65 α	(AAF52013)
TAF7	TAF _{II} 55	(AAF54162)
TAF7L	TAF2Q	
TAF8	(BAB71460)	Prodos
TAF9	TAF _{II} 32/31	TAF _{II} 40
TAF9L	TAF _{II} 31L (AAG09711)	
TAF10	TAF _{II} 30	TAF _{II} 24
TAF10b		TAF _{II} 16
TAF11	TAF _{II} 28	TAF _{II} 30 β
TAF11L		
TAF12	TAF _{II} 20/15	TAF _{II} 30 α
TAF13	TAF _{II} 18	(AAF53875)
TAF14		
TAF15	TAF _{II} 68	
<hr/>		
BTAF1	TAF _{II} 170/TAF-172	Hel89B

1. táblázat: Az új Pol II TAF-nevezéktan a megfelelő ortológokkal és paralógokkal.
(Tora, 2002).

Az élesztő TAF-kódoló gének esszenciálisak az életképesség szempontjából (Tora, 2002). Számos csoport leírta már a TAF-ok szerepét a promóter felismerésében és kiválasztásában (Burke és Kadonaga, 1997; Chalkley és Verrijzer, 1999; Verrijzer és mtsai, 1994). A TAF-ok teljes kiütése és a hőmérséklet érzékeny (TS) mutánsok is bizonyítják a TAF-ok központi szerepét élesztő és emlős sejtekben a génexpresszió szabályzásában és az antiapoptotikus faktorokkal való együttműködésben (Chen és Manley, 2000; Green, 2000; Metzger és mtsai, 1999).

Caenorhabditis elegans-ban kimutatták, hogy az egyes TAFok (TAF4, TAF5, TAF9 és TAF10) kiütése RNS interferencia módszerrel, eltérő hatást gyakorolt az embrió fejlődésére és a génexpresszióra. Míg a TAF4 esszenciális az összes korai embrionális mRNS transzkripciójában, addig a TAF5, TAF9 és TAF10 szerepe kevésbé kruciális (Walker és Blackwell, 2003; Walker és mtsai, 2001). Egyes TAF-oknak léteznek paralóg génjei, melyek gyakran TAF-szerű /TAF-like (L)/ fehérjéket kódolnak sejt-típus ill. szövet-specifikus expressziós mintázattal. Ilyen géneket írtak már le *C. elegans*, *Drosophila* és a humán genomban is (Aoyagi és Wassarman, 2000; Georgieva és mtsai, 2000; Hiller és mtsai, 2001; Tora, 2002).

1.9.1. A TAF-ok képesek egymással heterodimerizálódni és a HFD doménon keresztül kölcsönhatni

A TAF fehérjék felépítésére jellemző, hogy az N-terminális részükön tartalmaznak egy ún. Hiszton-fold-domént (HFD), mely 3 α -hélix motívumból épül fel. A HFD domén jelentős szerepet játszik a más TAF-okkal való kölcsönhatás kialakításában.

Az élesztő TAF10-nek három HFD domén tartalmú kölcsönható partnere van: a *S. cerevisiae* TAF3, TAF8 és az Spt7. A TAF10 nem tartalmaz magi lokalizációs szignált (NLS) és a magba történő szállítását nagymértékben meghatározza a HFD doménnal rendelkező TAF3, TAF8 vagy az Spt7-tel való interakciója, valamint az interakciós partnerek sejtmagi lokalizációs szignáljának jelenléte (Soutoglou és mtsai, 2005).

Drosophila melanogaster-ben a TAF10 homológot két párhuzamos gén kódolja (TAF10 és TAF10b), mely különböző szinten expresszálódik a *Drosophila* embrionális fejlődés során. A *D. melanogaster* TAF10 megtalálható mind a TFIID, mind pedig a TFTC komplexben, viszont a TAF10b csak a TFIID-ben figyelhető meg (Georgieva és mtsai, 2000; Muratoglu és mtsai, 2003). Emlős sejtekben is a TAF10 tagja mind a TFIID, mind pedig a GCN5-tartalmú fehérje komplexeknek: a TFTC, PCAF/GCN5 és a STAGA komplexeknek (Martinez, 2002). A TAF10 hiánya sejtciklus megálláshoz és sejthalálhoz vezet egér F9 embrionális karcinóma sejtekben (Metzger és mtsai, 1999).

Az emlős és a *Drosophila* TAF3 homológ tartalmaz egy N-terminális HFD domént, mely szelektíven kölcsönhat a TAF10 család tagjaival. Míg a humán TAF3 izolált HFD doménje kölcsönhat a humán TAF10-zel, addig a *D. melanogaster* TAF3 HFD doménje csak a *D. melanogaster* TAF10-zel mutat interakciót, a TAF10b-vel nem (Gangloff és mtsai, 2001). A *Drosophila* Prodós, másnéven *D. melanogaster* TAF8 HFD doménje a *D. melanogaster* TAF3-mal ellentétben képes heterodimerizálódni a *D. melanogaster* TAF10b-vel, viszont a TAF10-zel nem (Hernandez-Hernandez és Ferrus, 2001).

1.9.2. A TAF3 homológok jellemzése

1.9.2.1 A *Drosophila melanogaster* TAF3(DmTAF3/Bip2/TAFIII155) jellemzése

A DmTAF3-at (más néven *bip2*=*Bric a brac kölcsönható partner 2*) elsőként egy élesztő két-hibrid szűrésben azonosították, mint a *Bric a brac 1* (BAB1) és *Bric a brac 2* (BAB2) fehérjék kölcsönható partnerét (Pointud és mtsai, 2001) majd kimutatták, hogy az élesztő yTAF_{II}47 *Drosophila* homológja (Gangloff és mtsai, 2001).

A funkcionális kapcsolatban levő fehérjék BAB1 és BAB2 sejtmagi BTB/POZ (**B**road-complex, **T**ramtrack and **B**ric-à-brac/**P**oxvirus and **Z**inc fingers) domént tartalmazó fehérjék. A BTB/POZ domén (DiBello és mtsai, 1991) egy evolúciósan konzervált fehérje-fehérje interakciós domén, mely számos fejlődésben szabályzott transzkripció faktor N-terminális végén előfordul (Zollman és mtsai, 1994).

A DmTAF3 fehérje felépítésére jellemző, hogy az N-terminális részen tartalmaz egy HFD domént, míg a C-terminális részen egy PHD domént, mely a Cys4-His-Cys3 típusú Zn-finger szerkezetű PHD domének osztályába tartozik (Saha és mtsai, 1995). A DmTAF3 kimutatható embrióban, L3-as lárva stádiumban és a felnőtt állatok ováriumában. A TFIID komponenseként a DmTAF3 (Gangloff és mtsai, 2001) közvetlen kapcsolatot teremt az alap transzkripció gépezet és a BTB/POZ doménnel rendelkező fehérjék között. A DmTAF3 a politén kromoszómákon kizárólag a dekondezált régiókban, a puffokban és az interbandekben lokalizálódik, mely a transzkripcionálisan aktív kromatinon az RNS polimeráz II kezdőpontjának felel meg (Kramer és mtsai, 1980).

1.9.2.2. Az emlős TAF3 homológok jellemzése

Az egér mTAF3 (mTAFIII140) 932 aminosavból épül fel, a DmTAF3-hoz hasonlóan az N-terminális részen tartalmaz egy HFD domént, a C-terminális részen pedig egy Cys4-His-Cys3 típusú PHD domént.

A humán (hTAFIII140) és egér homológ szekvenciájának vizsgálata erős homológiát mutatott az N-terminális HFD domének között. Viszont alapvető különbség a két emlős homológ között, hogy az általunk és más csoport által vizsgált (Gangloff és mtsai, 2001) HeLa sejtvonalban a humán TAF3 (AJ292190) nem tartalmazza a C-terminális részén a PHD domént (**12. ábra**).

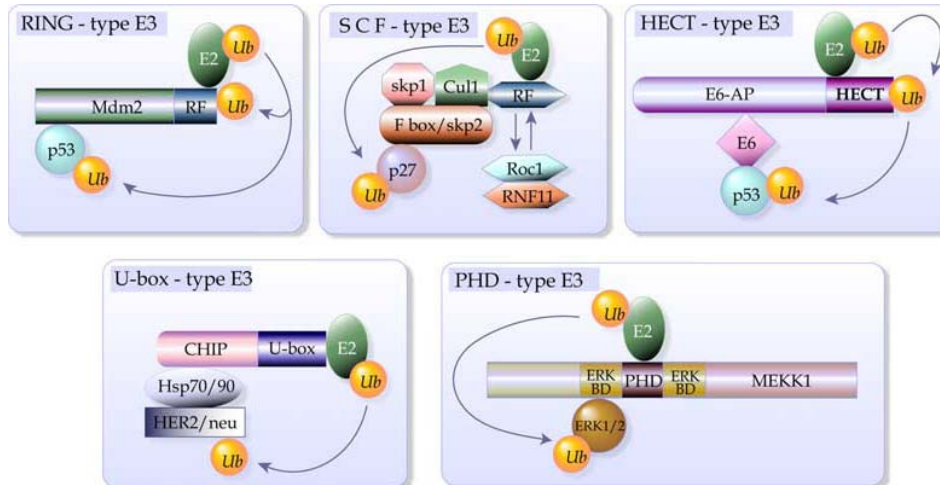
1.10. A PHD DOMÉN JELENTŐSÉGE

A TAF3 fehérjében is megtalálható plant homeodómén (PHD) egy specifikus Zn-finger motívum, melyet elsőként Schindler és mtsai az *Arabidopsis* homeobox fehérje esetében írtak le (Schindler, 1993).

A PHD domén vagy leukémia-asszociált-fehérje (LAP) domén hasonlít a RING finger doménre. Nyolc konzervált fém-kötő ligandot tartalmaz hasonló felosztásban (Borden és Freemont, 1996). A PHD domén majdnem 300 fehérjében megtalálható, melyek nagyrésze sejtmagi lokalizációt mutat (Pascual és mtsai, 2000), szerepét a DNS kötésben és a fehérje-fehérje interakciókban több csoport is kimutatta (Linder és mtsai, 2000). Azok a fehérjék, melyek tartalmazzák a PHD domént, represszor aktivitással köthetők össze, úgymint hiszton-deacetilázokkal és a heterokromatinnal lehetnek kölcsönhatásban (Aasland és mtsai, 1995).

A legtöbb PHD motívumot tartalmazó fehérje a kromatinnal való interakció szabályzásában játszik fontos szerepet (Vermeulen és mtsai, 2007; Aravind és mtsai, 2003; Scheel és Hofmann, 2003), de az irodalomban számos cikk beszámol a PHD doménnel rendelkező fehérjék lehetséges E3 ubikvitin ligáz aktivitásáról is.

Az E3 ligázoknak két fő típusa ismert: a HECT-domén tartalmú ill. a RING-finger doménnel vagy U box-szal rendelkező E3 ligázok (Hatakeyama és mtsai, 2001) (13. ábra).



13. ábra: E3 ligázok főbb típusai. A RING-típusú E3 ligázok közé tartozik pl. az MDM2. Az SCF (Skp1-Cullin-F-bokszt protein) –típusú ligázok szubsztrátjai főként a sejtciklus előrehaladásában, a szignál transzdukcióban és a transzkripcióban játszanak fontos szerepet, ilyen pl. a p27. Az E6-AP egy HECT-típusú, a CHIP egy U-box típusú, míg a MEKK1 egy PHD-domén tartalmú E3 ligáz. RING, really interesting new protein; RNF-11, RING-finger protein 11; MDM2, mouse double minute 2; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; Hsp 70/90, heat shock protein 70/90; CHIP, carboxyl terminus of hsp 70-interacting protein; E6-AP, E6 associated-protein. (Burger és Seth, 2004)

1.11. A TAF3 EDDIG BIZONYÍTOTT FUNKCIÓI

1.11.1. A DmTAF3 szerepe az Ubx gének kifejeződésében

Egy élesztő két-hibrid szűrésben a DmTAF3 (Bip2/TAF_{II}155) fehérjét, a GAGA-faktor erős kölcsönható partnereként azonosították (Chopra és mtsai, 2008). A GAGA-faktort (GAF) elsőként egy homeotikus gén, az *Ultrabithorax (Ubx)* *in vitro* transzkripciós aktivátoraként azonosították (Biggin és Tjian, 1988). A GAF szerepet játszik a kromatin újrendeződésében azáltal, hogy képes módosítani a promóter elérhetőségét a nukleoszóma pozicionálásának változtatásával, így lehetővé téve más transzkripciós faktor bekötődését (Tsukiyama és mtsai, 1994). A GAF fehérje az N-terminális részén egy BTB/POZ doménnel rendelkezik (Vaquero és mtsai, 2000). A GAF és a DmTAF3 együttesen szükséges az Ubx gének expressziójához.

1.11.2. A DmTAF3 szerepe a Drosophila melanogaster szem-szárny transzformációban

A homeotikus gének (HOX) felelősek a morfológiai változatosság kialakításáért az anteroposterior-tengely mentén az állatok fejlődése során (Lewis, 1978). A HOX gének erősen konzervált transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek homeodomén (HD) DNS-kötő domént tartalmaznak (McGinnis és mtsai, 1984).

Ezen kívül az összes HOX fehérjében található egy YPWM motívum, mely egy fehérje-fehérje kölcsönható motívum, és erős konzerváltságot mutat az állatvilágban (Izpisua-Belmonte és mtsai, 1991). Az *Antennapedia (Antp)* HOX gén specifikusan meghatározza a második tor szegmensén (T2) egy pár szárny és a középső pár láb kifejlődését *Drosophila melanogaster*-ben. Az *Antp* YPWM motívuma specifikusan kölcsönhat a DmTAF3 fehérjével *in vitro* és *in vivo*, sőt genetikai interakciót is találtak közöttük. Az *Antp* YPWM motívuma és a homeodomén DNS-kötő specificitása szerepet játszik az antenna-láb és a szem-szárny transzformáció indukálásában. A DmTAF3-Antp kölcsönhatás funkcionális jelentőségét mutatja, hogy a DmTAF3 az Antp kofaktoraként fokozza a szem-szárny transzformációt (Prince és mtsai, 2008).

1.11.3. A TAF3 szerepe az izom differenciálódásban

Egerekben az izom differenciációjának folyamata az izom prekursor sejtek, azaz a növekvő myoblasztok izomrostokká történő differenciálódását foglalja magába (Pownall és mtsai, 2002). A myoblaszt-izomrost átalakulás számos sejtípus-specifikus alap helix-loop-helix (bHLH) transzkripciós aktivátor (Myf5, MyoD, Myogenin és Mrf4) programjának kaszkádján keresztül valósul meg.

A TAF3 izomdifferenciációban betöltött alapvető szerepét mutatja, hogy a TAF3, ill. a TAF3-mal kölcsönható TRF3 (TBP-related factor 3) kiütése blokkolja a myoblasztok izomrostokká differenciálódását. A TAF3/TRF3 komplex ugyanis szignifikáns szerepet játszik a sejt típus-specifikus gének szabályozásában az izomdifferenciáció során (Deato és Tjian, 2007).

Míg a három általános TFIID alegység a TAF1, TAF4 és TBP, valamint a TFTC és STAGA alegységei a TAF9 és TAF10 fehérje is drámai csökkenést mutatott, addig a TAF3 és a TRF3 mennyisége mindvégig magas maradt a differenciált izomrostokban. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a TBP és más általános TFIID alegység hiányában a TAF3 a TRF3-mal együtt funkcionálisan helyettesítheti az esszenciális promóter felismerő aktivitást differenciált izomrostokban, mely irányítja az izom-specifikus gének transzkripcióját.

1.12. A P53 ÉS A TAF-OK KÖZÖTT MÁR BIZONYÍTOTT KÖLCSÖNHATÁSOK

Mivel kísérleteink során a p53 és a TAF3 kölcsönhatását, és az interakció funkcionális jelentőségét vizsgáltuk, ezért végül azokat az irodalmi adatokat foglalom össze, amelyekben a különböző TAF fehérjék p53 működésére gyakorolt hatását tanulmányozták.

A p53-t közvetlen interakcióban találták a *Drosophila* TAF9, TAF6-tal és humán homológjaikkal (Lu és Levine, 1995; Thut és mtsai, 1995). Már korábban kimutatták, hogy a humán TBP és a p53 együttesen kötődik a TATA box-ot tartalmazó DNS fragmentumhoz és a p53-kötő helyhez (Chen és mtsai, 1993).

1.12.1. A TAF9 és a p53 közötti kölcsönhatás

A TAF9 (hTAF_{II}31) a TFIID komplex részeként kötődik a vad típusú p53 fehérje N-terminális részéhez. A TAF9 kötődési helye megegyezik az MDM2-kötőhellyel, ily módon fontos szerepet játszik a p53 fehérje stabilitásának szabályzásában. A TAF9-p53 kölcsönhatás ugyanis gátolja az MDM2-irányította ubikvitinációját és transzkripció koaktivátor funkciójának kifejtését (Lu és Levine, 1995). A TAF9 expressziója p53-függő módon leállítja a sejtciklust a G1 fázisban, így elvezet a p53 irányította növekedés megálláshoz (Buschmann és mtsai, 2001). A TAF9b overexpressziója gyengébb hatással van a p53 stabilizálására, mint a TAF9. Mindkét gén esszenciális a sejt életképessége szempontjából, mivel kimutatták, hogy a TAF9b humán sejtekben esszenciális a sejt növekedésében (Chen és Manley, 2003) és hogy a TAF9 kiütése apoptózishoz vezet csirke sejtekben (Chen és Manley, 2000).

Más TAF kapcsolódását pl. a TAF6-ét is megfigyelték már a p53 N-terminális transzkripciót aktiváló részéhez, mely hasonlóan a TAF9-hez koaktivátor szerepet tölt be (Thut és mtsai, 1995).

1.12.2. A TAF1 és a p53 kapcsolata

A TAF1 (TAFII250) a TFIID komplex legnagyobb komponense, mely megegyezik a CCG1, sejtciklus szabályzó fehérjével, fontos szerepet játszik a G1 fázis előrehaladásában és az apoptózisban (Sekiguchi és mtsai, 1991). A humán TAF1 rendelkezik belső fehérje kináz aktivitással (Dikstein és mtsai, 1996), hiszton acetiltranszferáz aktivitással (Mizzen és mtsai, 1996) és ubikvitin-aktiváló és konjugáló aktivitással (Pham és Sauer, 2000). A retinoblastoma (Rb) fehérje közvetlenül kölcsönhat a TAF1-gyel és gátolja annak kináz aktivitását (Siegert és Robbins, 1999). A p53 C-terminális doménje képes kölcsönhatni a TAF1-gyel a TFIID komplexben. Az interakció eredményeként a TAF1 közvetlenül foszforilálja a p53-t a Thr-55-ös helyen *in vivo*. A Thr-55 foszforiláció pedig a p53 degradációjához vezet, azáltal, hogy fokozza a p53 MDM2-vel való kölcsönhatást. A TAF1 közvetlenül kölcsönhat az MDM2 RING finger doménjával (Léveillard és Wasylyk, 1997) és ily módon segíti elő a p53 MDM2-általi degradációját. A p53 kölcsönhatása a TAF1-gyel tehát fokozza a G1 fázis előrehaladását (Li és mtsai, 2004).

A fentiekből látható, hogy a p53-TAF kölcsönhatás fokozhatja, vagy gátolhatja is a p53 működését, attól függően, hogy milyen típusú TAF fehérjével alakul ki kapcsolat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A p53 szabályozási útvonal jobb megismerésére kutatócsoportunk célul tűzte ki a Dmp53 fehérjével kölcsönhatásba lépő fehérjék azonosítását. Előzőleg élesztő két-hibrid kísérletekben a DmTAF3-t a Dmp53 kölcsönható partnereként azonosítottuk. Az én feladatomban a kölcsönhatás további jellemzése és az interakciók funkcionális jelentőségének vizsgálata volt, ennek érdekében a következő kérdésekre kerestük a választ.

1) Élesztő két-hibrid rendszer segítségével megvizsgálni, hogy vajon a DmTAF3 a Dmp53 emlős homológjával ill. a p53 géncsalád más tagjaival (p73 α , p73 β) is kölcsönhatásba lép-e?

2) A lehetséges interakciók fennállásának további *in vitro* és *in vivo* módszerekkel történő megerősítése:

-a *Drosophila* homológok (Dmp53 és a DmTAF3) közötti interakciót *in vitro*, GST pull down módszerrel,

-a megfelelő emlős homológok közti kölcsönhatást (humán p53 ill. a p73 α , p73 β és az egér TAF3) *in vitro* kötési tesztekkel és *in vivo* ko-immunprecipitációval.

3) A p53 ill. további p53 géncsalád tagok és a TAF3 közötti interakció funkcionális jelentőségének felderítése céljából megvizsgálni, hogy a kölcsönhatás befolyásolja-e

-a p53 transzkripciót aktiváló képességét

- a p73 α , p73 β transzkripciót aktiváló képességét

- a p53 mRNS, ill. fehérje mennyiségét, stabilitását

- a p73 α , p73 β fehérje mennyiségét?

4) Mi lehet a funkciója a TAF3 C-terminálisán elhelyezkedő PHD doménnek? Működhet-e a TAF3 E3 ubikvitin ligázként a p53 esetében?

5) Módosíthatja-e a PHD domén mutációja a TAF3 hatását a p53 transzkripciót aktiváló képességére ill. a p53 fehérje mennyiségére, stabilitására?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Plazmid konstrukciók

Az élesztő két-hibrid kísérletekhez használt plazmidok:

A következő csali plazmidokat hoztuk létre: pBTM116-Dmp53 Δ N (47-385 aminosav), pBTM116-Dmp53C (277-385 aminosav), pBTM116-Dmp53C1 (277-351 aminosav) és pBMT116-Dmp53C2 (349-385 aminosav), melyeket a Dmp53 cDNS-ről a következő primerek használatával PCR technika segítségével állítottunk elő: Dmp53F1-Dmp53R1, Dmp53F3-Dmp53R1, Dmp53F3-Dmp53R2 és Dmp53F4-Dmp53R1. Az oligonukleotid primerek szekvenciája a **2. táblázatban** látható. Az amplifikált fragmenteket EcoRI és BamHI emésztés után pBTM116 plazmidba klónoztuk. A pBTM116-Dmp53 Δ N Δ C (47-294 aminosav) plazmidot úgy hoztuk létre, hogy a pBTM116-Dmp53 Δ N plazmidot StyI és BamHI enzimekkel emésztettük, Klenow enzimmel feltöltöttük és ligáltuk. A humán p53-t a pSP65-p53Pro konstrukcióból pBTM116 vektorba klónoztuk EcoRI és BamHI enzimekkel, ezután a transzaktivációs domént kódoló szakaszt EcoRI és NcoI emésztéssel lehasítottuk, majd Klenow enzimmel feltöltöttük és ligáltuk. A humán Δ Np73 α és a Δ Np73 β -t a pCDNA3-HA-p73 α és a pCDNA3-HA-p73 β konstrukciókból EcoRI enzimmel klónoztuk pBTM116 vektorba.

Az *in vitro* kötési kísérletekhez használt plazmidok:

A Dmp53C-t klónoztuk pGEX-4T1 vektorba EcoRI és SalI helyekre. A teljes hosszúságú egér TAF3-at (mTAFIII140) F9 embrionális karcinóma cDNS könyvtárból amplifikáltuk, majd pXJ41 emlős expressziós vektorba klónoztuk EcoRI-XhoI restriktív helyekre, ezt a franciaországi kooperáló partnerünk (IGBMC, Strasbourg) készítette és bocsájtotta rendelkezésünkre. A DmTAF3-at kódoló cDNS-t (514-924 aminosav) pET28c vektorba (Novagen) klónoztuk. A teljes hosszúságú humán p53-t pGEX6P1 vektorba (Amersham Biosciences) klónoztuk BamHI és XhoI restriktív helyekre.

A p53 transzkripciót aktiváló képességének teszteléséhez használt plazmidok:

Először létrehoztuk a pCDNA3-flag konstrukciót, olyan módon, hogy a pCDNA3.1+ vektort emésztettük HindIII és EcoRI enzimekkel, majd a flag oligonukleotidokat feloldottuk 10XTE (1M NaCl, 100 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA) –ben és egymáshoz hibridizáltuk. Ezután a kétszálú oligonukleotidot beépítettük az emésztett pCDNA3 vektorba. A használt flag1, flag2 oligonukleotid primerek szekvenciája a **2. táblázatban** látható.

Az adatbázisban AJ292190-es számú levő hTAF3 szekvencia alapján egy részleges (400-680 aminosav) és egy általunk teljes hosszúságúnak nevezett (1-680 aminosav) fehérjét kódoló formát sikerült amplifikálnunk HeLa cDNS könyvtárból PCR technika alkalmazásával. A teljes hosszúságú forma létrehozásához a 2. táblázatban feltüntetett hTAFfullfw és hTAFrev primereket, míg a részleges formához a hTAFrészlegesfw és hTAFrev primereket használtuk. A létrejött PCR terméket pCDNA3-Flag vektorba klónoztuk EcoRI és Sall helyekre.

Az *in vitro* transzlációs rendszerben használt plazmidok:

Az Sf9 sejtben létrehozott Flag-TAF3-at expresszáló rekombináns baculovírust kooperáló partnerünk (IGBMC, Strasbourg) laborjában készítették el (Leurent és mtsai, 2004). Az *in vitro* transzláció templátját úgy hoztuk létre, hogy a teljes hosszúságú mTAF3-at kódoló cDNS-t kivágtuk a pVL1392 baculovírus expressziós vektorból EcoRI és BamHI enzimekkel, majd beklónoztuk a pXJ41 expressziós vektor megfelelő helyére.

A PHD domén vizsgálatára irányuló kísérletekhez használt plazmidok:

A PHD doménben mutáns mTAF3 konstrukciókat a kooperáló partner (IGBMC, Strasbourg) készítette pVL1392 vektorban, melyből EcoRI és XhoI enzimekkel vágtuk ki az N-terminálisán Flag kódoló részt tartalmazó mTAF3-at ill. a 3 PHD mutánst: a H893A pontmutánst, a V849 Stop és a K620 Stop deléziós mutánsokat és pXJ41 vektorba klónoztuk EcoRI – XhoI helyekre.

Név	Szekvencia (5'-3')
Dmp53F1	GGGAATTCTTGCAGGGATTAAGCTCCG
Dmp53F3	GCGAATTCAGCAAGAAGCGCAAGTCC
Dmp53F4	GAATTCGGCATGATT AAGGAGGCGGC
Dmp53R1	CGGGATCCTCATGGCAGCTCGTAGGC
Dmp53R2	GGATCCAATCATGCCCTCGATGCTCT
flag1	p- AGCTTACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGG
flag2	p-AATTCCTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCATGGTA
hTAFrészlegesfw	AGAATTCGAGCGAGAGCCAGATCCT
hTAFfullfw	AGAATTCAGTTACTCCAGGTCGTTGTTG
hTAFrev	AAAGTCGACGGAAGCACTGGCAACAAAG

2. táblázat: A felhasznált oligonukleotidok szekvenciája.

Az *in vivo* ubikvitinációs kísérletben használt plazmidok:

Az mTAF3-at (pXJ41-mTAF3), humán p53-t (pCDNA3-p53), üres vektort (pHC624), ill. a 6-hisztidin-jelölt ubikvitint (6-His-Ub), MDM2-t (pCoc-MDM2) kódoló plazmidokat készen kaptuk az utrechti kooperáló partnerünktől (University Medical Center Utrecht).

3.2. Élesztő két-hibrid kísérletek

Az élesztő két-hibrid kísérleteket a MATCHMAKER lexA két-hibrid rendszer (Clontech Laboratories, Inc.) segítségével végeztük el követve a gyártó javaslatait. A MATCHMAKER *Drosophila* embrionális cDNS könyvtár pACT2 vektorban állt rendelkezésünkre (Clontech Laboratories, Inc.). A pozitív klónokat β -galaktozidáz kolónia-filter módszerrel kerestük ki (Breden és Nasmyth, 1985) olyan módon, hogy az élesztő telepről filter másolatot készítettünk, amelyeket folyékony nitrogénbe helyeztünk, hogy a sejtek feltáródjanak. Ezután a filtert Z-pufferben oldott (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM Mercaptoetanol) 20mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) tartalmú oldattal átítatott szűrőpapírra helyeztük élesztő telepekkkel felfelé. 30 °C-on kb. 3 órát inkubáltuk, majd vizsgáltuk a kék szín kifejlődését, melyből következtettünk az interakció kialakulására. A kolóniákból, melyek pozitívnak bizonyultak a His-auxotrófia komplementációs tesztben és termeltek β -galaktozidázt is, plazmid DNS-t izoláltunk, szekvenciájukat meghatároztuk és BLAST homológia kereső program segítségével azonosítottuk a kölcsönható partnert (Altschul és mtsai, 1997). A Bip2-nek a Dmp53 különböző doménjaihoz való kötődését egyrészt a pACT2-Bip2 plazmid valamint a Dmp53 nyitott leolvasási keretének különböző régióit tartalmazó pBTM116 plazmidok L40-es *Saccharomyces cerevisiae* élesztő sejtekbe történő ko-transzformációjával vizsgáltuk. A használt élesztő törzs genotípusa: *MATa his3 Δ 200 trp1-90 leu2-3,2-11 ade2 LYS2::lexA-HIS URA3::lexA-lacZ gal4*.

A Dmp53 humán homológját tartalmazó pBTM116-p53 konstrukciót, valamint a humán p53 géncsaládba tartozó p73 két variánsát kódoló konstrukciókat, a pBTM116-p73 α és pBTM116-p73 β plazmidokat a pACT2-Bip2-vel együtt L40-es élesztőbe kotranszformáltuk. A potenciális kölcsönható partnereket hisztidin-mentes táptalajban való növekedés és a β -galaktozidáz enzimaktivitás vizsgálatával határoztuk meg.

3.3 *In vitro* kötési módszerek

3.3.1. *GST-jelölt p53 túltermelése baktériumban*

A pGEX4T1-Dmp53C, a pGEX6P1 ill. a pGEX6P1-p53 konstrukciókat *E. coli* BL21 sejtekbe transzformáltuk és ampicillint (100 mg/ml) tartalmazó LB lemezre szélesztettük. Másnap a kinőtt telepekből egyet-egyet leoltottunk folyadék tápoldatba és 37°C-os vízfürdőben növesztettük OD= 0,4-0,6 közötti érték eléréséig. A minták egy részét tovább növesztettük, ezek lettek a nem indukált minták, míg a minták maradék részét 1 mM végkoncentrációban IPTG-vel (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) indukáltuk és tovább növesztettük 37°C-os vízfürdőben éjszakán át. Másnap centrifugáltuk a sejteket 13000 rpm-mel 1 percig és a csapadékot felszuszpendáltuk szonikációs pufferben (50 mM Tris pH 7.9, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl), melyet frissen kiegészítettünk 1 mM DTT-vel és 1 mM PMSF-fel. Ezután feltártuk a sejteket 10 x 20 s-ig tartó ultrahangos kezeléssel, ezután 13000 rpm 1 percig tartó centrifugálással összegyűjtöttük a csapadékot és ismét felszuszpendáltuk szonikációs pufferben, majd hozzámértünk ugyanannyi térfogat 2X SDS fehérje felvivő puffert (100 mM Tris pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 20% glicerin, 0,2% brómfenolkék), majd 5 percig forraltuk és megfuttattuk SDS-poliakrilamid gélen. A futtatást követően a gél Coomassie oldattal (0,15% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% metanol, 10% ecetsav) festettük 30 percig, majd színtelenítő, differenciáló oldatban (30% etanol, 10% ecetsav, 60% desztillált víz) ismét 30 percig mostuk legalább kétszer. Végül éjszakán át rázattuk gélzáritó oldatban (30% etanol, 5% glicerin, 65% desztillált víz) és másnap kifeszítettük a gél.

3.3.2. *Az in vitro ubikvitinációs kísérletben használt humán p53 fehérje termeltetése és tisztítása*

A GST-p53 konstrukciót BL21 sejtekbe transzformáltuk, majd a sejteket ampicillint (100 mg/ml) tartalmazó LB lemezre szélesztettük. Egy telepet leoltottunk folyadék kultúrába, másnap 1:50 hígítást követően ampicillinnel (100 mg/ml) kiegészített LB tápoldatban növesztettük a sejteket. A baktériumokat OD₆₀₀=0.6-0.8 közötti érték eléréséig növesztettük. 0.2 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk a fehérje expressziót 37°C-on 3 óra hosszáig. Majd a sejteket felszuszpendáltuk *E. coli* lízis pufferben (50 mM Tris pH 8.0, 20% sucrose, 2 mM EDTA, 300 mM KCl, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT, PIC=proteáz inhibitor koktél /Sigma, 100x hígítás/ 0,1% Triton X-100). Ezután lizozim enzimet (25 mg/ml) mértünk hozzájuk és 10 percre jégre tettük a mintákat, majd folyékony nitrogénben háromszor lefagyasztottuk és felolvasztottuk, hogy teljesen feltáródjanak a sejtek.

Centrifugáltuk 25000 rpm-mel 1 óra hosszúra 4 °C-on, a felülúszót jégre tettük, ez tartalmazta az oldható fázist. Poliakrilamid gélen elválasztottuk a fehérjéket, majd Coomassie festékkel megfestettük a gélt és differenciáló oldattal mostuk kétszer, így ellenőriztük a fehérje expresszió mértékét az indukciót követően ill. megvizsgáltuk, hogy az oldható frakcióban vagy csapadékban van-e a p53 fehérje. GA agaróz (glutation-agaróz) oszlopot készítettünk, ekvibráltuk E. coli lízis pufferrel (tízszerez oszlopmennyiséggel), az oldható lizátum oszlopra mérése után, az átfolyó frakciókat összegyűjtöttük. Mostuk ötszörös oszlopmennyiségű 1-es mosó pufferrel (50 mM Tris pH 8.0, 20% sucrose, 2 mM EDTA, 300 mM KCl, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, PIC /Sigma, 100x hígítás/), majd ötszörös oszlopmennyiségű 2-es mosópufferrel (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM KCl, 10 µM ZnCl, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, PIC /Sigma, 100x hígítás/). Ezután eluáltuk elúciós pufferrel (50 mM redukált glutation is tartalmazó 2-es mosó puffer, pH 8.0). Az elúciós frakciókat poliakrilamid gélen megfuttattuk az 1-es mosó, 2-es mosó frakciókkal együtt, végül Coomassie festékkel (BioSafe, Biorad) láthatóvá tettük a fehérjéket.

3.3.3. A Dmp53 és a DmTAF3 közötti interakció *in vitro* megerősítése

A kísérletben használt radioaktív jelölt DmTAF3 (514-924) fragmentumot *in vitro* átírással és transzlációval állítottuk elő a pET28c-DmTAF3 5-ös (számú) klónból triciált (³H) leucin jelenlétében a TNT T7 Quick-coupled retikulocita lizátum kittel (Promega) a cég utasításait követve. A baktériumokban túltermeltetett GST-Dmp53C-t ill. GST-t glutation szefaróz gyöngyökhöz (Amersham Biosciences) kötöttük követve a gyártó utasításait. Az *in vitro* transzlált DmTAF3 fehérje fragmentumot és a GST-Dmp53C-kötött gyöngyöket összekevertük PD pufferben (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH 8.0, 1 mM β-mercaptoethanol, 1% Nonidet P40) és 2 óra hosszúra 4°C-on tartottuk. A gyöngyöket négyszer mostuk 0.1% Nonidet P40-et tartalmazó PD pufferrel és egyszer Nonidet P40-et nem tartalmazó PD pufferrel. A mintákat SDS-PAGE-en futtattuk és a gélt inkubáltuk 30 percig izopropanol:víz:ecetsav (25:65:10) tartalmú oldatban fixáltuk, majd 30 percig Amplify Fluorographic reagensben inkubáltuk. Ezután a gélt Whatman papírra helyeztük, és gél szárítóban 45 perc alatt megszáritottuk. A megszáritott gél tetejére filmet helyeztünk, majd másnap előhívtuk a filmet.

3.3.4. GST pull down kísérlet

A GST pull down kísérletekhez baktériumban túltermeltetett GST, GST-Dmp53C ill. GST-p53-t használtunk. Az mTAF3 fehérjét pedig a baculovírus expressziós rendszer (Soutoglou és mtsai, 2005) segítségével előállított Sf9 sejt kivonatban túltermelt formában használtuk.

Az mTAF3-at tartalmazó Sf9 sejt kivonatot, használat előtt négyszeresére hígítottuk sótlan pufferrel (25 mM Tris pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, melyet használat előtt kiegészítettünk 0,3 mM DTT, 0,1% NP40 és PIC /Sigma, 100x hígítás/) és glutation szefaróz gyöngyöz kötött bakteriálisan expresszált GST, GST-Dmp53C ill. GST-p53-mal éjszakán át inkubáltuk 4°C-on. Másnap a gyöngyöket mostuk emelkedő sókoncentrációjú IP200 (25 mM Tris pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 200 mM KCl, használat előtt kiegészítve 0,3 mM DTT, 0,1% NP40 és PIC /Sigma, 100x hígítás/) ill. IP400 (25 mM Tris pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 400 mM KCl, használat előtt kiegészítve 0,3 mM DTT, 0,1% NP40 és PIC /Sigma, 100x hígítás/) pufferrel háromszor, a mosások között 500g 5 percig 4°C-on centrifugáltunk. Ezt követően a gyöngyökhöz ugyanannyi térfogat 2X SDS fehérje felvivő puffert mértünk, 5 percig forraltuk és a mintákat SDS-PAGE gélen futtattuk. A gélt nitrocellulóz membránra (Amersham Biosciences) blottoltuk 200 mA-en 2 órán keresztül. Ezután a membránt 5% tejport tartalmazó TBST (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) oldatban blokkoltuk 1 órán keresztül, majd az anti-TAF3 egér elsődleges ellenanyaggal (39TA1C7, 1:1000 hígításban) inkubáltuk 1% tejpor TBST-ben éjszakán át 4°C-on himbán kevertetve. Másnap egér másodlagos ellenanyaggal (anti-mouse-HRP, Dako Cytomation) 1:2000 hígításban 1% tejpor TBST-ben inkubáltuk 1 órán át. Végül a membránt az Immobilon™ Western Chemoluminescent HRP szubsztrátot használva a gyártó (Millipore) utasításait követve előhívtuk.

3.3.5. A humán p53 géncsalád tagjainak az emlős homológ TAF3-mal való interakciójának in vitro vizsgálata.

A TAF3-mal való interakció kimutatásához radioaktívan jelölt humán p53, p73 α , p73 β , DmAda2a (negatív kontroll) és szentjánosbogár luciferáz (negatív kontroll) fehérjékre volt szükségünk, amiket egy *in vitro* transzlációs rendszerrel állítottunk elő. Az *in vitro* transzlációhoz a TNT T7 Quick-coupled transcription-translation kitjét (Promega) használtuk a gyártó utasításait követve.

Első lépésben összemértük a TnT reakciót, mely a ³⁵S-Metioninnal jelölni kívánt fehérjét kódoló DNS-t (p53, p73 α , p73 β , Ada2a, luciferáz) a TnT mix-szet és a vizet tartalmazta.

A reakcióelegyet 37°C-os vízfürdőben 90 percig inkubáltuk. Mindegyik mintából tettünk félre bemérési kontrollnak. A maradék részt immunprecipitációs kísérletben használtuk a következők szerint. A megfelelő radioaktív fehérjét egér mTAF3-at overexpresszáló Sf9 fehérje kivonattal és egér anti-TAF3 (39TA2F5, 1:1000) ellenanyaggal inkubáltuk PIC (Sigma, 100x hígítás) és 0,1% NP40-et tartalmazó PBS-ben. Az elegyet jégen inkubáltuk 120 percig. A Protein-A-Sepharose preparálása után, a mintákat hozzámértük a gyöngyökhöz és 4°C-on inkubáltuk 120 percig. Centrifugálást követően a gyöngyöket háromszor mostuk PBS-sel, a mosások között centrifugáltunk, a harmadik mosás után 200 mM KCl-dal kiegészített PBS-sel végeztünk még egy mosást, amit 10 percig kevertettünk szobahőmérsékleten, majd ismét lecentrifugáltunk. A precipitátumokhoz és a bemérési kontroll mintákhoz 2X SDS fehérje felvivő puffert mértünk, összekevertük, majd 5 perc forralás után a mintákat SDS-PAGE-en futtattuk. A gélt 30 percig izopropanol:víz:ecetsav (25:65:10) tartalmú fixáló oldatban inkubáltuk, végül az Amplify Fluorographic reagensben inkubáltuk 30 percig. Ezután a gélt Whatman papírra helyeztük és gélzáritóban 45 perc alatt megszáritottuk. A megszáritott gél tetejére filmet helyeztünk, majd másnap előhívtuk a filmet.

3.4. Sejtes módszerek

3.4.1. Sejtek tenyésztése

HeLa humán méhnyakrák sejtvonal, U2OS és Saos2 humán csont sarcoma sejtvonal, 293T humán embrionális vese sejtvonal növesztése 5% (HeLa esetében), 10% (U2OS és a 293T esetében) ill. 15% (Saos2 esetében) magzati borjú szérummal (FCS) kiegészített DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tápoldatban történt állandó 5% CO₂ tartalmú légkörben, 37°C-os inkubátorban.

3.4.2. Riporter plazmidok tranziens transzfekciója

A HeLa ill. U2OS sejteket 6-lyukú csészébe osztottuk ki, majd másnap 0,5 µg pGL2NaLuc riporter (az *mdm2* génből származó p53-érzékeny konstrukció) ill. pCDNA3-luc riporter és 0,5 µg pCDNA3p53Pro ill. az ábrákon jelölt mennyiségű pXJ41-mTAF3 ill. pCDNA3flag-hTAF3ΔC vagy pCDNA3HA-p73α vagy pCDNA3HA-p73β, pCDNA3-H893AmTAF3, pCDNA3-K620mTAF3, pCDNA3-V849mTAF3 ill. pCDNA3-wtmTAF3 vektorokkal transzfektáltuk. Minden mintát kiegészítettünk üres plazmiddal (pHC624), annak érdekében, hogy mindegyik sejtet ugyanakkora stresszhatás érje.

A transzfekciót ExGene transzfekciós reagenssel (ExGen 500 *in vitro* Transfection Reagent – Fermentas) végeztük a gyártó utasításait követve. Eppendorf csövekbe 150mM NaCl-ot, megfelelő mennyiségű DNS-t és 1 µg DNS / 3,3 µl ExGen transzfekciós reagenst mértünk, röviden összekevertük, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk 10 percig. Ezután rácsepegtettük a sejtekre és összekevertük őket, majd visszahelyeztük 37°C-os inkubátorba.

3.4.3. Luciferáz enzimaktivitás mérése

24 órával a transzfekciót követően a médium eltávolítása után a sejteket mostuk kétszer 1XPBS-sel, majd felkapartuk őket 1XPBS-ben és lecentrifugáltuk 13.000 rpm-mel 5 percig 4°C-on. A felülúszót eltávolítottuk és a sejteket feltártuk jégen tartva fél óráig a következő pufferben: Cell Culture Lysis Reagent (Promega). Majd lecentrifugáltuk a sejtörmelékeket 13000 rpm-mel 5 percig 4°C-on. A felülúszó egy részéből luciferin hozzáadásával (Promega) luciferáz enzimaktivitást mértünk egy házi gyártmányú Luminométer (SZBK) ill. egy LUMIStar OPTIMA nevű luminométer segítségével. A mérés kontrolljaként minden lizátumban a fehérje mennyiségét kolorimetriásan (Bradford, 1976) határoztuk meg. A szórás (standard deviation=SD) értékét Excel programmal állapítottuk meg. A szignifikancia meghatározásához szintén Excel programban t-tesztet végeztünk. * P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,005 a t-tesztben.

3.4.4. Immunkicsapás sejtekből

A ko-immunprecipitációs kísérlethez 293T sejteket transzfektáltunk 15cm-es lemezekben JetPEI (Q-Bio Gene) transzfekciós reagens alkalmazásával 7 µg pCDNA3p53Pro és 7 µg pXJ41-mTAF3 vagy üres vektor DNS-t tartalmazó vektorral. Minden minta esetében ugyanannyi DNS-t transzfektáltunk, ahol szükséges volt ott kiegészítettük üres (pSG5) vektor DNS-sel. A sejteket 48 órával a transzfekciót követően lizáltuk és a TAF3-komplexeket egér anti-TAF3 (39TA1C7) antitest segítségével immunprecipitáltuk (Gangloff és mtsai, 2001). Az immunkomplexeket proteinG-szefaróz gyöngyökhöz kötöttük. Kétszer 500mM KCl, majd kétszer 100mM KCl tartalmú IP pufferrel (összetételét lásd a 3.3.4. GST pull down kísérletek fejezetben) mostuk a mintákat. A gyöngyök forralását követően, SDS-PAGE gélen futtattuk meg a mintákat, majd Western blot kísérletet (lásd a következő fejezetben) végeztünk p53 ellenanyaggal.

3.5. Western blot

A HeLa ill. U2OS sejteket a médium leszívása után PBS-sel mostuk, összekapartuk, centrifugálással összegyűjtöttük és 2X SDS fehérje felvivő pufferben (100 mM Tris pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 20% glicerin, 0,2% brómfenolkék) intenzív keveréssel és 5 perces forralással feltártuk. A lizátumok fehérje mennyiségét SDS-poliakrilamid gélen történő futtatás után Coomassie festéssel ellenőriztük és a lizátumok fehérje mennyiségét figyelembe véve megközelítőleg ugyanannyi fehérjét vittünk fel mindegyik lizátumból. A vizsgált fehérje molekulatömegétől függően 8-10%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk a mintákat, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra (Amersham Biosciences) vittük át. A fehérjék kimutatásához a következő elődleges antitesteket használtuk: egér monoklonális anti-humán p53 DO-7 (Dako Cytomation, 1:1000), egér monoklonális anti-TAF3 (IGBMC, házilag gyártott 39TA1C7, 39TA2F5, 1:1000), ill. nyúl poliklonális anti-GFP (Invitrogen, 1:10000). Az aktin fehérje vizsgálatával ellenőriztük, hogy valóban azonos mennyiségű fehérje került-e át a nitrocellulóz membránra minden minta esetén. Az aktin kimutatása nyúl anti-aktin (Sigma, A5060, 1:2000) elsődleges ellenanyaggal történt. Másodlagos antitestek torna-peroxidáz konjugált anti-nyúl ill. anti-egér ellenanyagok (Dako Cytomation) voltak. Az immunkomplexeket kemilumineszcens detekciós módszerrel (Pierce) röntgen filmen tettük láthatóvá.

Az *in vivo* immunkicsapási kísérlet Western blot részét a következő módon végeztük el. A filtert anti-p53 DO-1 (Santa Cruz Biotechnology) elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk éjszakán át 4°C-on, majd anti-egér-kappa-HRP (IGBMC saját ellenanyag) másodlagos ellenanyaggal 2 óra hosszáig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az immunkomplexeket kemilumineszcens detekciós módszerrel (Pierce) röntgen filmen tettük láthatóvá.

A 3.7.1. fejezetben leírt *in vitro* ubikvitinációs kísérlet végén anti-p53 DO-7 (Dako Cytomation, 1:1000) ill. streptavidin HRP-konjugált anti-ubikvitin (P4D1, Santa Cruz, 1:1000) elsődleges és a p53 esetében anti-egér (Dako Cytomation) másodlagos ellenanyagot használtunk.

A HA-tag-gel jelölt p73 α és p73 β fehérjék Western blot kísérletben történő kimutatása anti-HA (sc-7392, Santa Cruz, 1:2000) elsődleges ellenanyaggal történt.

A PHD doménben mutáns Flag-taggel ellátott mTAF3 fehérjék kimutatása anti-Flag (Sigma, 1:10000) egér elsődleges ellenanyaggal és torna-peroxidáz konjugált anti-egér másodlagos ellenanyaggal történt.

3.6. Reverz transzkripcióhoz kapcsolt kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-QPCR)

RNeasy mini kit (Qiagen Inc.) használatával össz-RNS-t izoláltunk követve a gyártó javaslatait. Egy szálú cDNS-t szintetizáltunk 2 µg össz-RNS-ből random hexamer primerekkel, TaqMan Reverz Transzkripció Reagens (Applied Biosystems) használatával. A PCR reakciót ABI Prism 7500 real-time PCR készülékkel, SYBR-Green PCR Master Mix és a következő primerek segítségével végeztük el: p53For CCCTTCCCAGAAAACCTACC, p53Rev CTCCGTCATGTGCTGTGACT, GAPDHfor ACCTGACCTGCCGTCTAGAA, GAPDHrev TCCACCACCCTGTTGCTGTA. A p53 C_t értékét a GAPDH belső kontrollhoz normalizáltuk és a vizsgált gének expressziós szintjének változását a ΔΔC_t módszerrel számoltuk ki.

3.7. Ubikvitináció vizsgálata

3.7.1. *In vitro* ubikvitináció

Az *in vitro* ubikvitinációs reakcióhoz használt enzimek a következők voltak:

-E1 ubikvitin aktiváló enzim (Boston Biochem, U-560)

-E2 ubikvitin konjugáló enzim: tisztított GST-UbcH5B, amelyről a GST thrombinnal le lett hasítva

-E3 ubikvitin ligáz: tisztított, His-tag-gel ellátott CNOT4 (pozitív kontroll) vagy tisztított Flag-tag-gel ellátott mTAF3. A tisztított humán p53 fehérje előállítását ld. a 3.3.2. fejezetben.

A kísérletet T. Albert és mtsai leírása (2002) alapján hajtottuk végre. A reakcióba a fenti enzimeket, ATP-t (2 mM), ubikvitint (biotin N-term. Ubi) mértünk. A következő ubikvitin reakció puffert használtuk (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA pH 8.0, 0,25 mM DTT). A reakcióelegyeket 90 percig 30°C-on inkubáltuk. Végül azonos térfogat 2X SDS fehérje felvivő puffert mértünk a mintákhoz és 5 percig forraltuk őket. A mintákat 10%-os poliakrilamid gélen megfuttattuk és Western blot kísérletet végeztünk ld. a 3.5. fejezetben.

3.7.2. *In vivo* ubikvitináció

Az *in vivo* ubikvitinációs kísérleteket P. De Graf és mtsai (2003) által leírt módszer szerint végeztük. U2OS sejteket osztottunk 10 cm-es lemezbe, amikor 70-80%-ban konfluensek lettek, transzfektáltuk őket ExGene transzfekciós reagenssel (ExGen 500 *in vitro* Transfection Reagent – Fermentas) és a következő plazmidokkal: az mTAF3-at (pXJ41-mTAF3), 6-hisztidin-jelölt ubikvitint (6-His-Ub), humán p53-t (pCDNA3-p53), MDM2-t (pCoc-MDM2).

Mindegyik csészébe ugyanannyi, összesen 5 µg DNS-t mértünk. Két nappal a transzfekeciót követően inkubáltuk a sejteket DMSO-ban feloldott 20µM MG132 (Sigma, C2211) proteaszóma inhibítorral vagy a negatív kontroll esetében DMSO-val 4-5 órán keresztül. Mostuk a sejteket kétszer hideg PBS-sel, majd felkapartuk őket 1XPBS-ben. A sejtszuspenzió negyed részét félretettük, ezek voltak a kontroll lizátum minták.

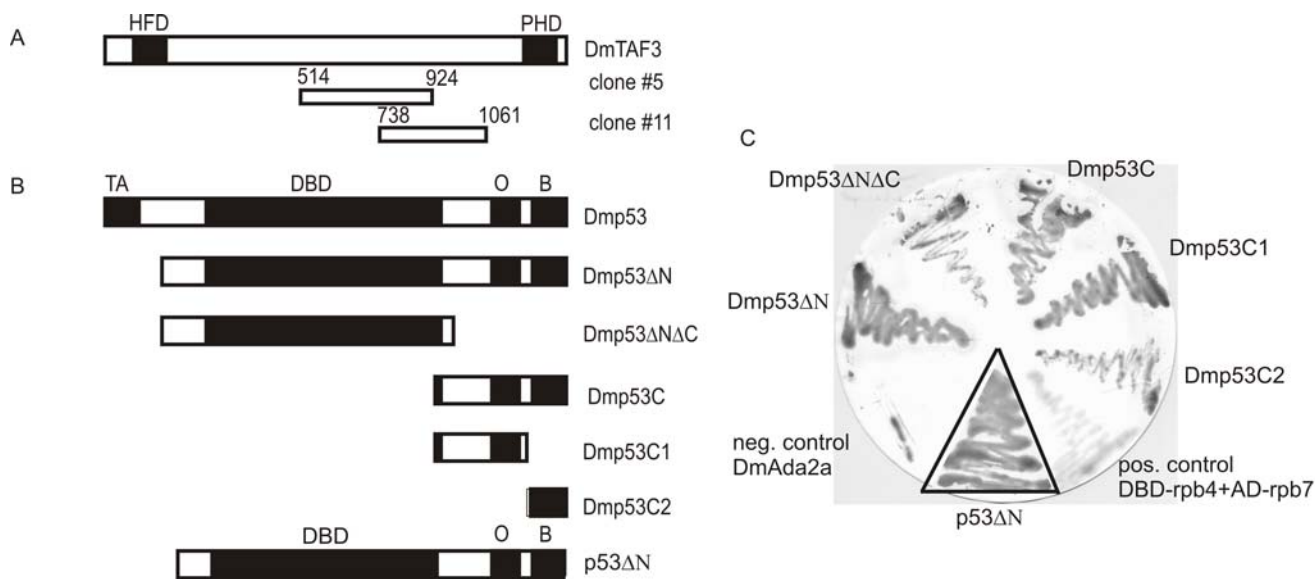
A megmaradt sejtekhez pedig hozzámértük a disszociáló oldatot (6M Guanidium HCl, 5 mM imidazole, 10 mM β-merkaptóethanol) és 6-His-jelölt Ni²⁺-NTA-agaróz gyöngyöket (Qiagen), melyeket előtte kétszer mostunk 6M Guanidium-HCl oldattal. Ezt a keveréket 4 óráig szobahőmérsékleten kevertetve inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk a mintákat 2000 rpm-mel 2 percig, eltávolítottuk a felülúszót és mostuk a gyöngyöket először az 1. oldattal (6M Guanidium-HCl, 10 mM β-merkaptóethanol, 0.2% Triton-X-100), ezután a 2. oldattal (8M urea pH 8.0, 10 mM β-merkaptóethanol, 0.2% Triton-X-100), majd a 3. oldattal (8M urea pH 6.3, 10 mM β-merkaptóethanol, 0.2% Triton-X-100) és végül a 4. oldattal (8M urea pH 6.3, 10 mM β-merkaptóethanol, 0.1% Triton-X-100). A mosások között centrifugáltunk és eltávolítottuk a felülúszót. A csapadékot (mely tartalmazza a 6-His-jelölt ubikvitin-kapcsolt termékeket) felfuszpendáltuk 2X SDS fehérje felvivő pufferben, 20 percig szobahőmérsékleten tartottuk, majd lecentrifugáltuk, a felülúszót új eppendorf csőbe tettük, 5 percig forraltuk és poliakrilamid gélen megfuttattuk a mintákat. A kontroll lizátumokat lecentrifugáltuk, a csapadékot 2X SDS fehérje felvivő pufferben felfuszpendáltuk és ezeket is poliakrilamid gélen megfuttattuk. A Western blot kísérletet a fent leírtaknak megfelelően anti-humán p53 DO-7 klón (Dako Cytomation) elsődleges ellenanyaggal és anti-egér -HRP (Dako Cytomation) konjugált másodlagos ellenanyaggal végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A DmTAF3 azonosítása a Dmp53 kölcsönható partnereként élesztő két-hibrid (Y2H) kísérletekkel

A Dmp53 kölcsönható partnereinek azonosítása céljából *Drosophila* embrionális cDNS könyvtár szűrését végeztük el élesztő két-hibrid (Y2H) módszerrel. E kísérletekben csaliként a lexA DNS-kötő domén (DBD)-hez fuzionált Dmp53-t használtuk. Mivel a Dmp53 az N-terminális részén egy transzkripciót aktiváló domént tartalmaz, a hamis pozitív aktiváció elkerülésére N-terminálisan csonkolt Dmp53 verziókat hoztunk létre és használtunk a kísérletben. Az azonosított pozitív klónok közül kettő részleges *Bric-a-Brac* kölcsönható fehérje gén (*bip2/CG2009*) cDNS-t tartalmazott. Az általunk izolált cDNS klónok közül a hosszabb, 1236 bp-nyi volt (clone #5) és a DmTAF3 514-924 aminosavait kódoló részt tartalmazta. A rövidebb, 972 bp-nyi cDNS darab (clone #11) a DmTAF3 738-1061 aminosavait kódolja (**14. ábra A**). A két klón összehasonlítása arra utal, hogy a Dmp53-mal való kölcsönhatásért a DmTAF3 738 és 924 aminosavak közötti régió lehet felelős. A kölcsönhatásért felelős Dmp53 régió azonosítására a Dmp53 különböző régióinak (**14. ábra B**) a kölcsönhatását teszteltük a hosszabb, 5-ös számú DmTAF3 klónnal élesztő két-hibrid kísérletben.

E kísérletekben azt találtuk, hogy a Dmp53 DNS-kötő doménje csak gyenge, míg C-terminális része erős kölcsönhatást mutatott a DmTAF3-mal élesztő két-hibrid kísérletben (**14. ábra C**). Ugyanezekben a kísérletekben a *Drosophila* Ada2a transzkripciók ko-aktivátor/adaptor és a DmTAF3 között nem volt megfigyelhető interakció. A Dmp53 C-terminális régiójával létrejövő kölcsönhatást tovább jellemezve megállapítottuk, hogy az oligomerizációs domén (Dmp53C1) egyedül is erős interakcióra volt képes a DmTAF3 5-ös számú klónjával. A szabályzó domén (Dmp53C2) azonban önmagában csak gyenge interakciót mutatott a DmTAF3-mal.



14. ábra: Dmp53 kölcsönhat a DmTAF3-mal.

(A) A teljes hosszúságú DmTAF3 és az élesztő két-hibrid kísérletben azonosított klónok (5-ös és 11-es számú klón) vázlatos szerkezete. A HFD a DmTAF3 histone fold domén; a PHD plant homeodomén részeit jelöli. (B) A Dmp53, annak élesztő két-hibrid kísérletekben használt darabjai és a humán p53 fehérje szerkezete. Az ábrán jelölt Dmp53 részeket lexA-DBD (DNA Binding Domain) DNS-kötő doménhez kapcsolva használtuk. A Dmp53 egyes részei: TA, transzaktivációs domén; DBD, DNS-kötő domén; O, oligomerizációs domén; B, regulátor domén. (C) A Gal4 aktivációs doménhez (AD) kapcsolt DmTAF3 514-924 aminosavaknak megfelelő régió és a lexA-DBD-hez kapcsolt feltüntetett részek kölcsönhatásának kimutatása élesztő sejtekben.

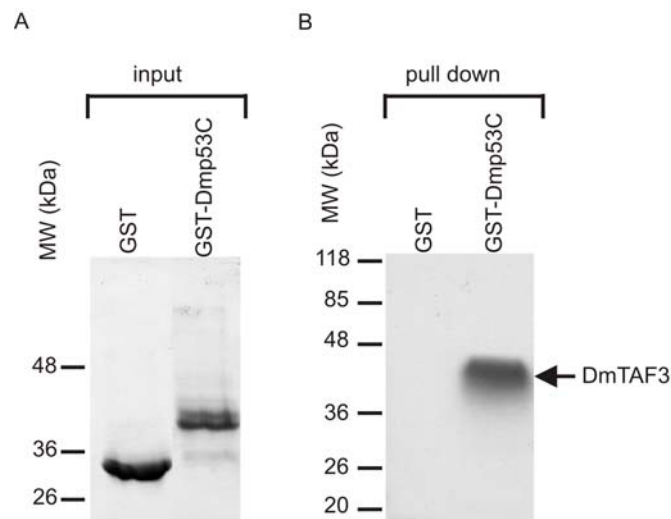
A két fehérje kölcsönhatása His-prototrófiát és β -galaktozidáz enzimaktivitást eredményez a használt élesztő sejtekben. A negatív kontrollként használt lexA-DBD-Ada2a fúziós fehérje nem mutat kölcsönhatást ugyanazzal a DmTAF3 klónnal. Pozitív kontrollként a lexA-DBD-rpb4 és Gal4-AD-rpb7 fúziós fehérjéket használtuk, melyek kölcsönhatását korábbi kísérletben már bizonyították. A p53 Δ N-DmTAF3 kölcsönhatás kimutatása egy külön filteren történt ugyanazokat a pozitív és negatív kontrollokat alkalmazva.

4.2. A TAF3 és a p53 közötti interakció evolúciósan konzervált

A Dmp53 és a humán p53 közötti kismértékű szekvencia hasonlóság ellenére érdekesnek tűnt megvizsgálni, hogy vajon a DmTAF3 képes-e kölcsönhatni a Dmp53 humán homológjával. Mivel a humán p53 is tartalmaz az N-terminális részén transzkripciót aktiváló domént, a hamis pozitív eredmények elkerülésére N-terminális aktiváló domént nem tartalmazó p53-t használtunk (14. ábra B). Kísérleteink erős interakciót jeleztek a DmTAF3 és a humán p53 fehérje között (14. ábra C).

4.2.1. A Dmp53 és a DmTAF3 kölcsönhatásának vizsgálata *in vitro*

Azért, hogy a DmTAF3 és a Dmp53 közötti interakciót az élesztő két-hibrid módszertől független más módszerrel is kimutassuk, *in vitro* kötési kísérletet alkalmaztunk. Ehhez a DmTAF3 514-924 aminosavig terjedő polipeptid részét nyúl retikulocita lizátumot használva, *in vitro* transzkripció-transzlációs rendszerben (TNT coupled reticulocyte lysate systems, Promega), radioaktívan jelzett formában állítottuk elő. A Dmp53 fehérje C terminális részét (Dmp53C) glutation-S-transzferázzal fúzionálva baktériumban expresszáltuk az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint. Az *in vitro* kötési kísérletben (pull down assay) a DmTAF3 része kötődött a GST-Dmp53C-hez, a GST-hez azonban nem, ami bizonyítja, hogy a két fehérje kölcsönhatása közvetlen és specifikus (**15. ábra**).



15. ábra: A DmTAF3 közvetlenül kötődik a Dmp53C-hez *in vitro*.

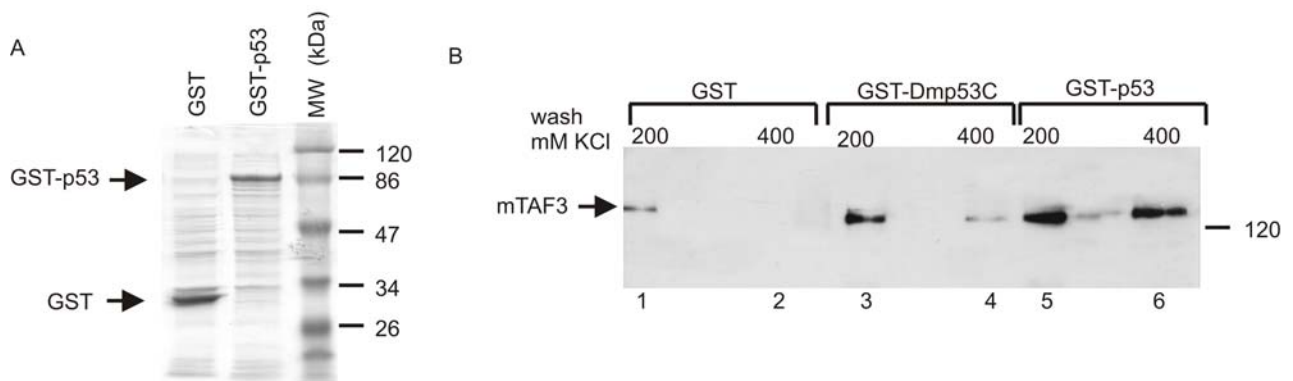
(A) A bakteriálisan expresszált GST és GST-Dmp53C fehérje Coomassie festett gél képe.

(B) Ezeket a fehérjéket glutation-szefaróz mátrixon megkötöttük, majd a mátrixot *in vitro*, ³H-jelölt formában előállított DmTAF3 (514-924 aminosavaknak megfelelő rész) fehérjét tartalmazó eleggyel inkubáltuk. A megfelelő mosásokat követően a glutation-szefaróz gyöngyhöz kötött fehérjéket eluáltuk, poliakrilamid gélen elektroforézissel elválasztottuk és a jelzett DmTAF3 fehérje jelenlétét autoradiográfiával mutattuk ki.

4.2.2. Az egér TAF3 és p53 kölcsönhatásának kimutatása *in vitro* kötési kísérletekkel

Annak meghatározására, hogy a DmTAF3 emlős homológja is képes-e *in vitro* a p53-hoz kötődni az előzőekben ismertetettekhez hasonló módszert alkalmaztunk. Ehhez a teljes hosszúságú egér TAF3 (mTAF3) fehérjét Sf9 ízeltlábú sejtekben állítottuk elő és vizsgáltuk a kapcsolódását baktériumban termelt GST, GST-Dmp53C ill. GST-p53 fehérjékhez.

Bár az mTAF3 a GST-vel önmagában is gyenge kölcsönhatást mutatott (**16. ábra B** része, 200 mM KCl-dal végzett mosás), KCl-ot magasabb koncentrációban (400 mM) tartalmazó mosást követően csak a GST-Dmp53C és a GST-p53 kötődés volt kimutatható.

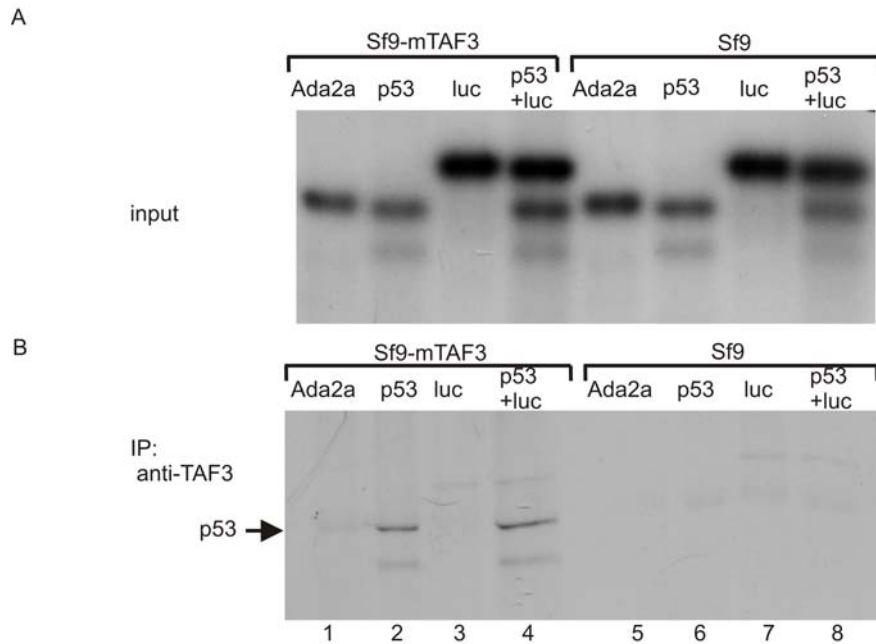


16. ábra: A Dmp53 és a p53 *in vitro* kötődik az mTAF3-hoz.

(A) GST és GST-p53 fehérjéket baktériumban termeltettünk és SDS-poliakrilamid gélen elektroforézissel elválasztva Coomassie festéssel mutattuk ki. (B) Az egér TAF3 és a p53, ill. Dmp53 kötődésének kimutatása. A teljes hosszúságú egér TAF3-at túltermelő Sf9 sejtekből nyert fehérje kivonatot glutation-szefaróz gyöngyökhöz kötött GST, GST-Dmp53C ill. GST-p53 fehérjékkel inkubáltunk, majd a gyöngyöket KCl-ot növekvő koncentrációban tartalmazó pufferrel mostuk. A mosással az oszlopról eluálható fehérjéket elektroforézissel elválasztottuk és az mTAF3 fehérjét Western blot technikával anti-TAF3 (39TA1C7, 1:1000) elsődleges ellenanyaggal mutattuk ki.

4.2.3. Az egér TAF3 és p53 kölcsönhatásának kimutatása további *in vitro* kötési kísérlettel.

Az interakció reverz kísérletben történő megerősítése céljából a teljes hosszúságú humán p53-t, a *Drosophila* Ada2a-t és kontrollként a szentjánosbogár luciferázt *in vitro* transzláltuk, majd összekevertük Sf9 sejtekből készített, egér TAF3-at tartalmazó fehérje kivonattal és anti-TAF3 ellenanyagot használva immunprecipitációt végeztünk. A p53 ko-precipitálódott az mTAF3-mal, míg az Ada2a és a luciferáz nem (**17. ábra B. 1, 2, 3-as minta**). Egy másik kontroll kísérletben a p53-t és a luciferázt együtt adtuk hozzá az mTAF3 fehérjét túltermelő kivonathoz és így végeztünk immunprecipitációt TAF3-ra specifikus ellenanyaggal. Ekkor is a TAF3 specifikus ellenanyaggal csak a p53 ko-precipitálódott, a luciferáz nem (**17. ábra B. 4. minta**). Amikor a p53-t olyan fehérje kivonathoz adtuk, amelyik nem tartalmazott mTAF3-at, akkor az anti-TAF3 ellenanyaggal a p53 nem volt kicsapható (**17. ábra B. 6, 8-as minta**). Ezek az adatok tehát egyértelműen bizonyítják a p53 és az mTAF3 közötti specifikus interakciót.

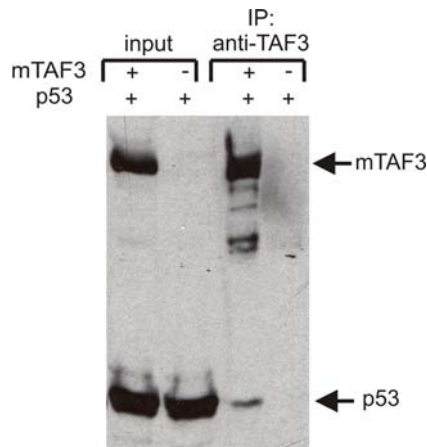


17. ábra: Az mTAF3 és a p53 specifikus kötődésének vizsgálata ko-immunprecipitációval.

A *Drosophila* Ada2a, p53 és szentjánosbogár luciferáz fehérjét *in vitro* transzláltuk ³⁵S-metionin jelenlétében. A fehérjéket ezután túltermelt mTAF3-at tartalmazó sejt kivonattal kevertük össze és anti-TAF3 ellenanyagot (39TA2F5, 1:1000) használva immunprecipitációt végeztünk. **(A)** Az immunprecipitáció előtt vett minták (input) elektroforézist követően készült autoradiográfias képe. **(B)** Az immunprecipitációval kapott minták elektroforézist követően készült autoradiográfias képe.

4.2.4. Az mTAF3 és a p53 kölcsönhatásának kimutatása humán sejtekben ko-immunprecipitációval

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy létrejön-e az egér TAF3 és a p53 kapcsolódása humán sejtekben is. Ehhez jól transzfektálható 293T sejteket ko-transzfektáltunk mTAF3-at és p53-t kifejező plazmiddal, majd az mTAF3-at tartalmazó komplexeket immunprecipitáltuk és Western blot-tal vizsgáltuk a p53 jelenlétét. A kísérlet eredménye azt mutatta, hogy a túltermelt p53 kis mennyisége ko-precipitálódott az mTAF3-mal. A kontroll kísérletben, ahol p53-t és üres vektort transzfektáltunk, nem volt a p53 immunprecipitálható anti-TAF3 ellenanyaggal **(18. ábra)**. Ezek az adatok együttesen azt mutatják tehát, hogy a p53 fehérje képes kölcsönhatásba lépni az mTAF3-mal és ez a kölcsönhatás *in vivo* a sejtekben is létrejön.

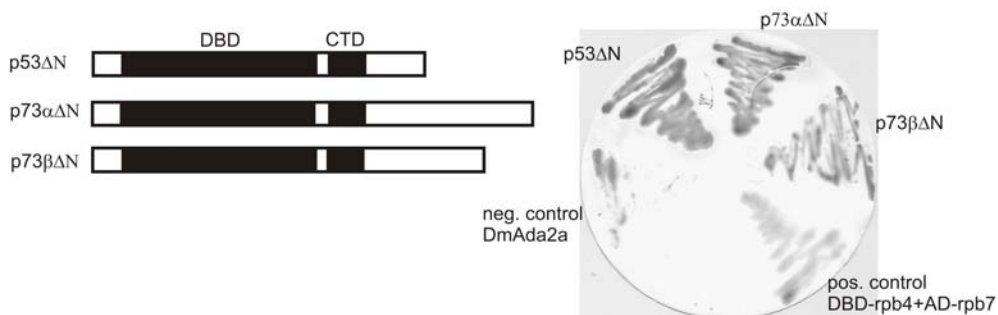


18. ábra: A p53 *in vivo* is kötődik az mTAF3-mal.

Humán p53 és mTAF3 (+) expresszióját biztosító és kontrollként üres vektor plazmidot ko-transzfektáltunk 293T sejtekbe, majd a sejtekből készült fehérje kivonatból anti-TAF3 ellenanyaggal immunprecipitációt végeztünk. Az immunprecipitált minták elektroforézisét követően a p53 fehérjét anti-p53 DO-1 (Santa Cruz, 1:1000), az mTAF3 fehérjét (39TA1C7, 1:1000) specifikus ellenanyagokat használva Western blot-tal mutattuk ki.

4.3. A DmTAF3 és a p53 rokon fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata élesztő két-hibrid módszerrel.

A p53 és a TAF3 *in vitro* és *in vivo* kölcsönhatásának kimutatása felvetette a kérdést, hogy vajon kölcsönhat-e a TAF3 a humán p53 géncsalád más tagjaival, a humán p73 α és p73 β fehérjékkel is. Első megközelítésként élesztő két-hibrid módszerrel vizsgáltuk, hogy kimutatható-e kölcsönhatás a humán p73 α és/vagy p73 β valamint a DmTAF3 között. A p73 esetén is a konstrukciók N-terminálisan csonkolt fehérjét tartalmaztak, amelyekből a transzaktivációs domén hiányzott.

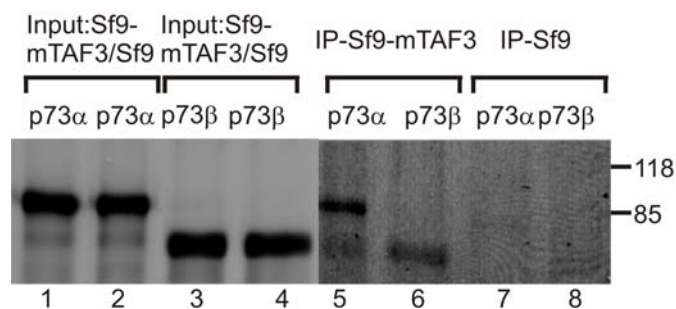


19. ábra: A humán p53 géncsalád másik két tagja a p73 α és p73 β is kölcsönhat a DmTAF3-mal. A humán p53 és a humán p73 α és p73 β fehérjéket lexA DNS-kötő doménhez fuzionálva, a DmTAF3 514-924 aminosavaknak megfelelő részét pedig a Gal4-aktivációs doménhez fuzionálva élesztő sejtekben együtt termeltettük. A fúziós fehérjék kölcsönhatását His-auxotrófia komplementációval és β -galaktozidáz enzimaktivitás indukció kimutatásával vizsgáltuk. Negatív és pozitív kontroll ugyanaz, mint a 14. ábrán.

Az élesztő két-hibrid kísérlet eredménye szerint a humán p53 géncsalád másik két vizsgált tagja is kölcsönhat a DmTAF3-mal. Ez arra utal tehát, hogy evolúciósan konzervált kölcsönhatás jön létre a TAF3 és a p53 rokon fehérjék között.

4.3.1. Az mTAF3 és p53 rokon fehérjék kölcsönhatásának *in vitro* vizsgálata

Az interakció más módszerrel történő megerősítéséhez *in vitro* transzláltuk a teljes hosszúságú humán p73 α és p73 β -t, a *Drosophila* Ada2a-t és kontrollként a szentjánosbogár luciferáz fehérjét, majd összekevertük ezeket túltermelt egér TAF3-at tartalmazó fehérje kivonattal és anti-TAF3 ellenanyag segítségével immunprecipitáltuk az mTAF3-tartalmú komplexeket. A p73 α és p73 β ko-precipitálódott az mTAF3-mal (**20. ábra 5, 6-os minta**), míg az Ada2a és a luciferáz nem (**17. ábra** mely kísérlet egyidőben készült ezzel az IP kísérlettel). Ha a p73 α -t és p73 β -t olyan fehérje kivonathoz adtuk, amely nem tartalmazott mTAF3-at, akkor a p73 α és p73 β nem volt kicsapható anti-TAF3 ellenanyaggal (**20. ábra 7, 8-as minta**). Ezek az adatok is megerősítik tehát a p73 α ill. p73 β és az mTAF3 közötti interakció specifikusságát.



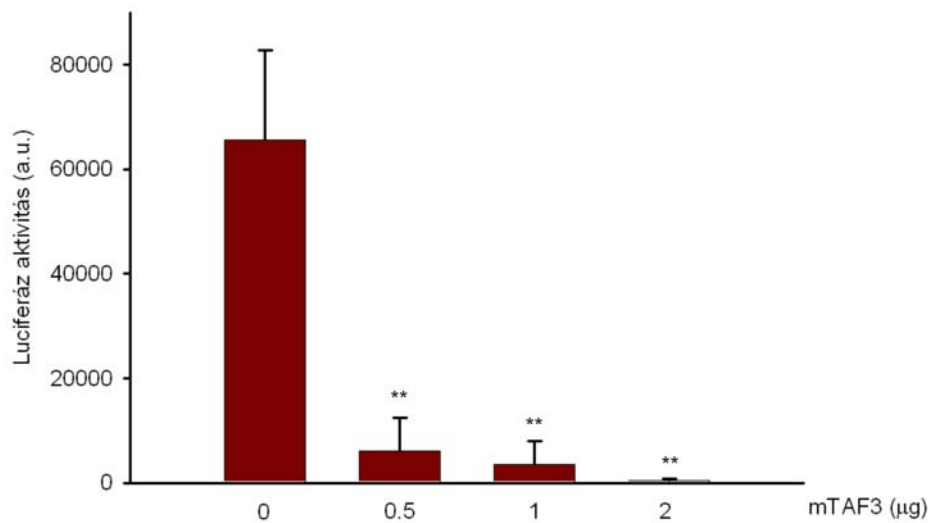
20. ábra: Az mTAF3 és a p73 α és p73 β kölcsönhatásának kimutatása ko-immunprecipitációval.

³⁵S-metionin jelenlétében *in vitro* transzlált *Drosophila* Ada2a-t, humán p73 α -t és p73 β -t ill. a szentjánosbogár luciferázt és mTAF3-at tartalmazó fehérje kivonattól végzett immunprecipitáció anti-TAF3 ellenanyaggal (39TA2F5, 1:1000) (lásd 17. ábra, mely kísérlet egyidőben készült ezzel az IP kísérlettel). Az immunprecipitációhoz használt input (1-4.) és a precipitációt követően kapott minták (5-8.) elektroforézise után készült autoradiogram.

4.4. Az mTAF3 hatása a p53 transzkripciót aktiváló képességére.

A TAF3 és a p53 közötti kapcsolat p53 funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálatára meghatároztuk az mTAF3 túltermelésének hatását a p53 transzaktiváló képességére. Ehhez U2OS sejteket ko-transzfektáltunk vad típusú mTAF3 termelését biztosító és p53 aktivációra érzékeny rekombináns plazmidokkal.

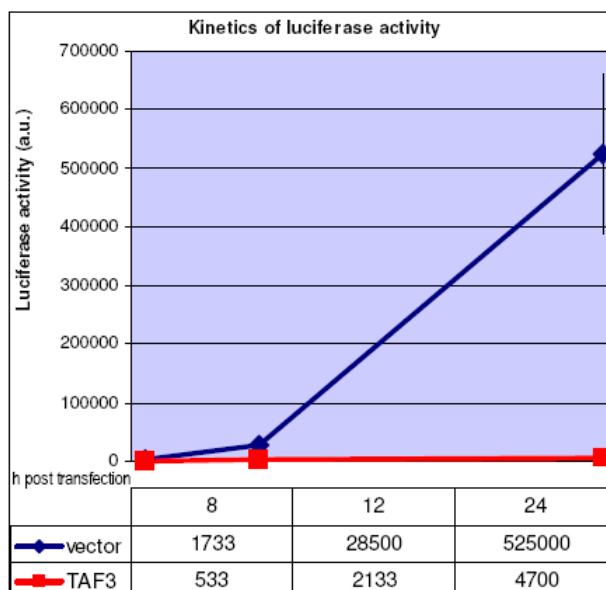
A használt riporter plazmidban a luciferáz gént az egér *mdm2* génből származó, p53 aktivációt közvetítő elemeket tartalmazó promóter szabályozza. E transzfekció p53 jelenlétében magas luciferáz enzimaktivitást eredményez (**21. ábra első oszlop**). Az mTAF3 termelését biztosító plazmid ko-transzfektálása a luciferáz enzimaktivitás drámai, mintegy 100-zad részére történő csökkenését eredményezte. A hatás az mTAF3 expressziót biztosító plazmid mennyiségével arányosan változott és azt növelve az aktivitás csökkenés egyre erősebb volt (**21. ábra 2-4. oszlop**). Az mTAF3 tehát gátolja a p53 transzkripciót aktiváló hatását.



21. ábra: Az mTAF3 túltermelése erősen gátolja az endogén p53 transzkripciót aktiváló hatását.

U2OS sejteket transzfektáltunk p53 aktivációra érzékeny luciferáz riporter plazmiddal (0,5 µg) és az ábrán jelölt, növekvő mennyiségű (0, 0,5, 1, 2 µg) mTAF3-at termelő plazmiddal. Üres vektort használva a transzformált DNS mennyiségét minden mintában azonosra állítottuk be (3 µg össz-DNS). A luciferáz enzimaktivitást 24 órával a transzfekciót követően 3 párhuzamos mintában mértük. A feltüntetett szórások a standard deviációt jelölik, az adatokat t-próbával elemeztük: **P < 0,01.

Az mTAF3 túltermelés okozta p53 transzkripció aktivitás kinetikáját tovább vizsgálva, megnéztük, hogy milyen összefüggésben áll a p53 fehérje félélet idejével. Három párhuzamos kísérletben U2OS sejteket transzfektáltunk p53-érzékeny riporter plazmiddal, üres vektorral vagy mTAF3-at túltermelő konstrukcióval.

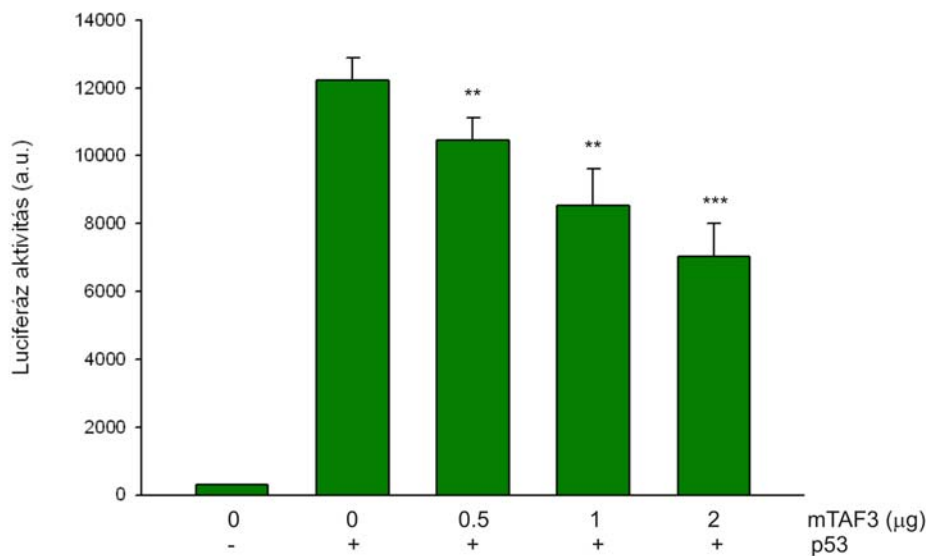


22. ábra: Az mTAF3 túltermelése blokkolja a p53 transzkripciót aktiváló képességét.

U2OS sejteket transzfektáltunk p53-érzékeny luciferáz riporter plazmival, 2 µg üres vektorral vagy mTAF3-at túltermelő plazmival. A sejteket 8, 12, 24 óráig növesztettük a transzfekciót követően. A grafikon alatti adatok a három kísérlet átlagát mutatják.

A kapott eredményekből arra következtettünk, hogy az mTAF3 képes blokkolni időben a luciferáz aktivitás felhalmozódását. Továbbá, hogy a kapott nagymértékű csökkenést nem a p53 féléletideje határozza meg.

Azért, hogy kizárjuk annak lehetőségét, hogy ez egy sejtípustól függő hatás, HeLa sejteket használva is elvégeztük a ko-transzfekciót. A HeLa sejtek csak kis mennyiségben tartalmaznak endogén p53-t, ezért p53-t túltermelő plazmival is transzfektáltuk ezeket a sejteket (23. ábra).



23. ábra: Az mTAF3 hatása az exogén p53 szintjére.

HeLa sejteket ko-transzfektáltunk 0,5 μg p53-t túltermelő plazmival, luciferáz riporter plazmival, valamint az mTAF3 expresszióját biztosító plazmival. A használt mTAF3 plazmid mennyiségét az ábrán feltüntettük. Üres vektort használva az össz DNS mennyiséget minden mintában 3 μg-ra egészítettük ki. A luciferáz enzimaktivitást 24 órával a transzfektációt követően 3 párhuzamos mintában mértük le, a feltüntetett szórások a standard deviációt jelölik, az adatokat t-próbával elemeztük: **P < 0,01, ***P < 0,005.

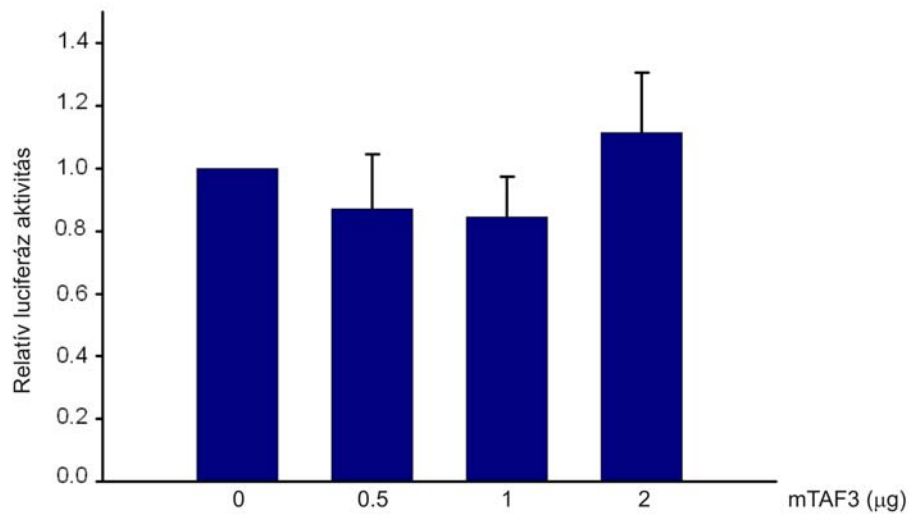
Az egér TAF3 HeLa sejtekben is gátolta a túltermelt p53 transzaktivációs képességét. Ebben a sejtvonalonban azonban a túltermelt p53 transzaktiváló képességére kifejtett gátló hatás nem volt olyan drámai, mint azt az endogén p53 esetében tapasztaltuk, mivel csak mintegy 45 %-os csökkenés volt megfigyelhető a riporter aktivitásában.

4.4.1. Az mTAF3 hatás specifikusságának vizsgálata a p53 transzkripciót aktiváló képességére.

A következő kísérletekben azt kívántuk meghatározni, hogy specifikus-e az mTAF3 gátló hatása a p53 transzkripció aktivációra vagy egy általános transzkripció gátlásról van szó.

Ennek megválaszolására HeLa sejteket ko-transzfektáltunk citomegalovírus (CMV) promóterrel rendelkező luciferáz riporter plazmival (0,5 μg) és növekvő mennyiségű mTAF3-at kifejező plazmival (24. ábra). Ebben az esetben azt találtuk, hogy az mTAF3-nak nem volt hatása az alkalmazott promóter aktivitására.

Tehát megállapíthatjuk, hogy az mTAF3 túltermelése erősen és specifikusan gátolja az endogén p53 transzkripció aktivitását.



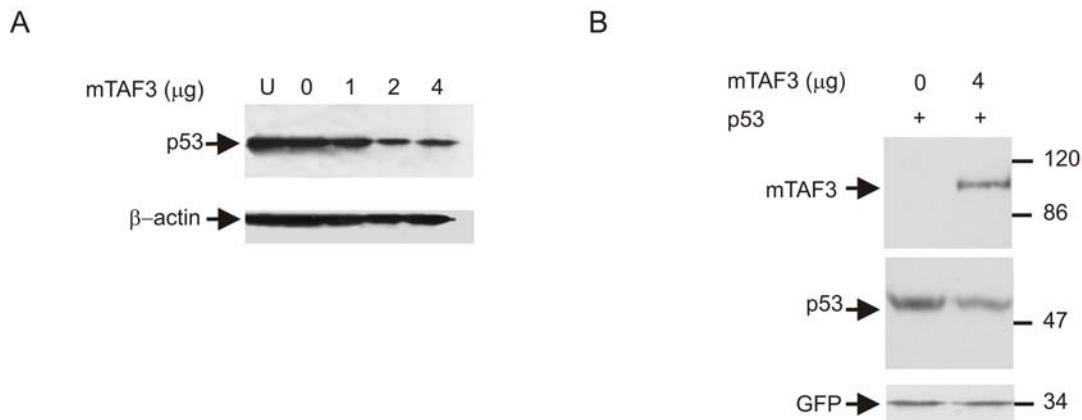
24. ábra: Az mTAF3 nem gátolja a CMV promóter aktivitását.

HeLa sejteket ko-transzfektáltunk pCDNA-luciferáz riporter plazmiddal (0,5 μg) ill. az ábrán jelölt mennyiségű mTAF3-at túltermelő plazmiddal (0, 0,5, 1, 2 μg). Minden mintát üres vektorral egészítettünk ki 3 μg össz-DNS mennyiségre. A luciferáz enzimaktivitást 24 órával a transzfekeciót követően mértük és a mért aktivitásokat a csak vektorral transzfektált kontrollhoz viszonyítottuk.

4.5. A p53 fehérje szintjének változása az mTAF3 hatására.

A p53 transzkripció aktivitására kifejtett gátló hatás okának kiderítésére megvizsgáltuk, hogy az mTAF3 hatással van-e a p53 fehérje szintjére. Ehhez növekvő mennyiségű, mTAF3 expressziót biztosító plazmidot transzfektáltunk U2OS sejtekbe. Az mTAF3 az endogén p53 szint csökkenését eredményezte, de nem volt hatással az endogén β-aktin szintre (**25. ábra A**). Azért, hogy kizárjuk a jelenség sejtípus-specifitását, HeLa sejteket ko-transzfektáltunk p53-t és zöld fluoreszcens proteint (GFP) kifejező plazmiddal mTAF3 jelenlétében vagy anélkül. Itt is a p53 csökkenését tudtuk kimutatni, míg a GFP mennyisége nem változott az mTAF3 túltermelése mellett (**25. ábra B**), ami azt mutatja, hogy az mTAF3 képes csökkenteni a p53 fehérje szintjét.

HeLa sejtekben a p53 szint csökkenésének mértéke összehasonlítható volt a p53 transzkripciós aktivitásának gátlásával. U2OS sejtekben a p53 fehérje szintjének változása nem volt olyan drámai, mint a p53 transzkripció aktiváló hatásában bekövetkezett csökkenés.

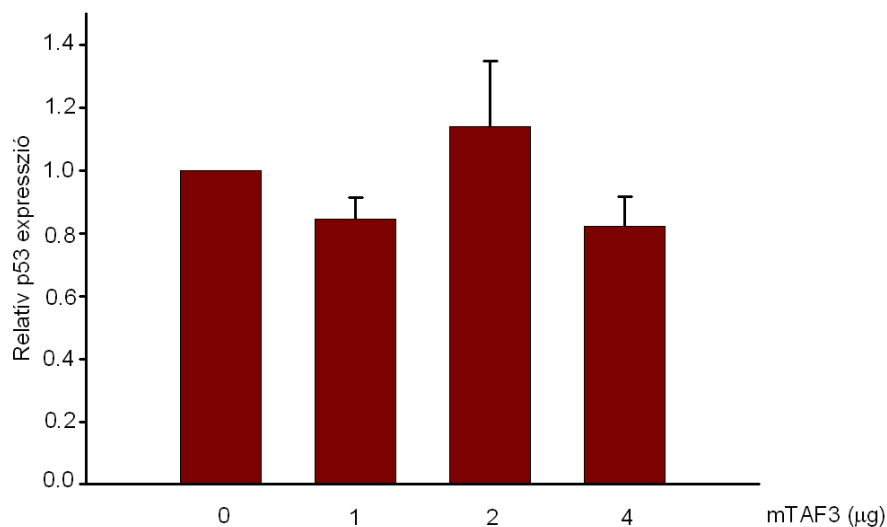


25. ábra: Az mTAF3 túltermelése csökkenti a p53 fehérje szintjét.

(A) U2OS sejteket különböző mennyiségű (0, 1, 2, 4 µg) mTAF3-at expresszáló plazmiddal transzfektáltunk. Az össz DNS mennyiségét üres vektorral minden esetben 4 µg-ra egészítettük ki. A p53 fehérje szintjét nem transzfektált (U) és transzfektált sejtekben Western blot módszerrel vizsgáltuk. Ugyanazon a filteren az aktin mennyiségét is meghatároztuk, melyet belső kontrollként használtunk. **(B)** HeLa sejteket ko-transzfektáltunk p53-t kifejező plazmiddal, belső kontrollként GFP-t kifejező plazmiddal és üres vektorral (0) ill. 4 µg mTAF3-at kifejező plazmiddal (4). A sejtizátumokat 24 órával a transzfekciót követően preparáltuk és Western blot módszerrel anti-TAF3 (39TA1C7, 1:1000), anti-p53 DO-7 (Dako Cytomation, 1:1000) ill. anti-GFP (Invitrogen, 1:10000) ellenanyagokkal vizsgáltuk.

4.6. A p53 mRNS szintjének változása az mTAF3 hatására.

Meg szeretnénk volna határozni, hogy vajon a p53 fehérje szintjének csökkenése a p53 gén expressziójában (mRNS szintjében) bekövetkező változás következménye-e. Ehhez olyan U2OS sejtekben mértük az endogén p53 mRNS szintjét kvantitatív reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakció módszerrel, melyeket üres vektorral ill. növekvő mennyiségű mTAF3-at kifejező plazmiddal transzfektáltunk **(26. ábra)**.



26. ábra: Az mTAF3 túltermelése nincs hatással a p53 mRNS-ének szintjére.

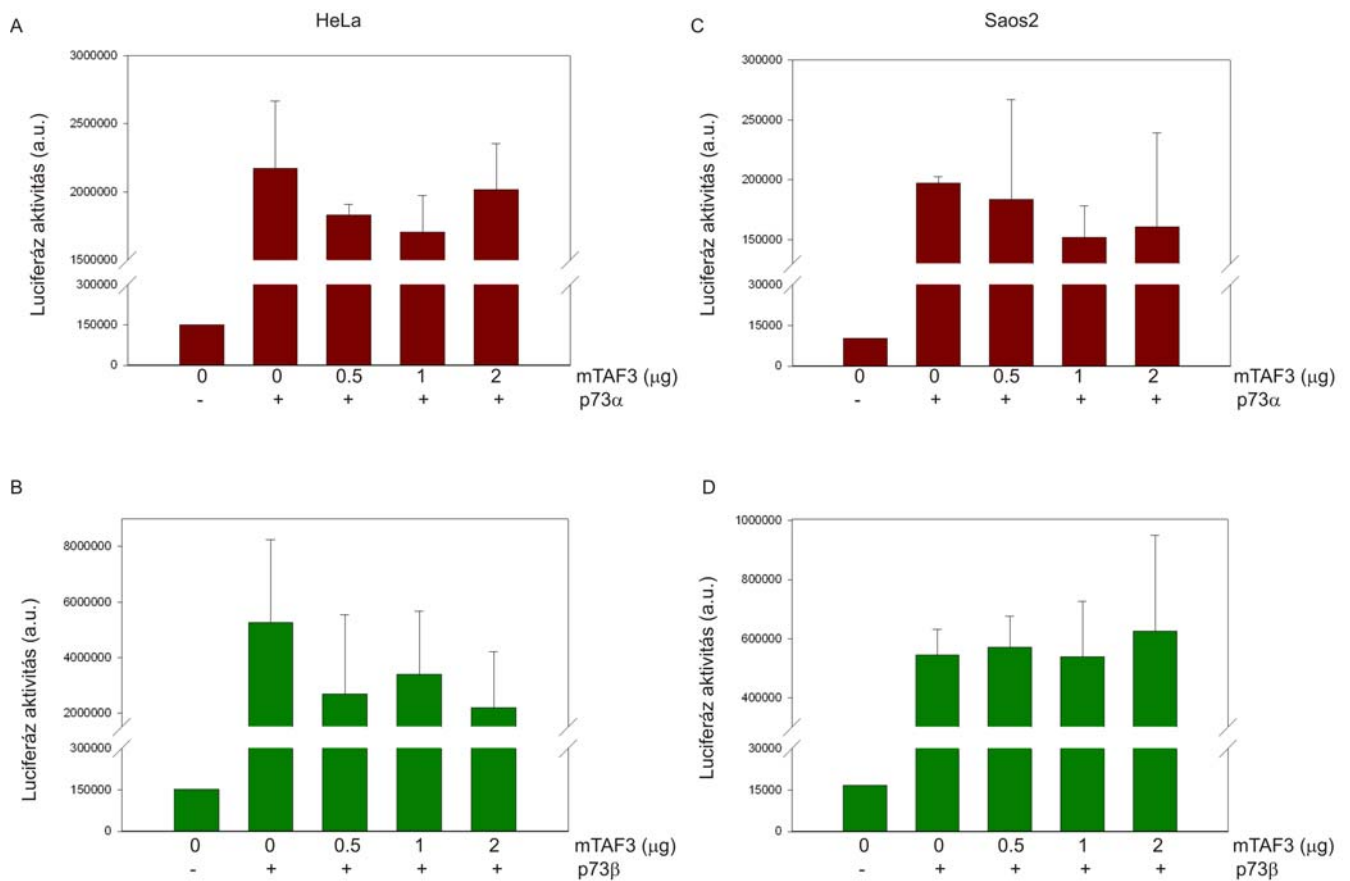
U2OS sejteket ko-transzfektáltunk különböző mennyiségű mTAF3-at (0, 1, 2, 4 µg) kifejező plazmival. A p53 és a belső kontrollként használt GAPDH mRNS szintjét QPCR módszerrel határoztuk meg. A p53 mRNS szintjét a GAPDH mRNS szintjével normalizáltuk minden minta esetében és a vektorral transzfektált kontrollhoz viszonyítottuk.

Nem találtunk jelentős változást a p53 mRNS szintjében az mTAF3 túltermelés hatására. Ez azt mutatja, hogy az egér TAF3 nem befolyásolja a p53 mRNS képződését és stabilitását.

4.7. Az mTAF3 hatása a p53 rokon fehérjék transzkripció aktiváló képességére.

Mivel a TAF3 kölcsönhatását a humán p53 géncsalád más tagjaival (p73α és p73β) is ki tudtuk mutatni, így érdekesnek tartottuk megvizsgálni, vajon a TAF3 módosítja-e a transzkripciót aktiváló képességüket a p53-hoz hasonlóan.

Ennek vizsgálatára olyan sejt vonalakat választottunk, melyek vagy csak kis mennyiségben (HeLa) vagy egyáltalán nem (Saos2) tartalmaznak endogén p53-t (**27. ábra**). Hiszen az endogén p53 zavarná az mTAF3 hatásának vizsgálatát a p73α és p73β transzkripciót aktiváló képességére, mivel a p53 nagyobb affinitással kötődne be az alkalmazott riporter konstrukció (mdm2-luc, mint az előző kísérletekben is) p53 kötőhelyére, mint a p53 családtagok.



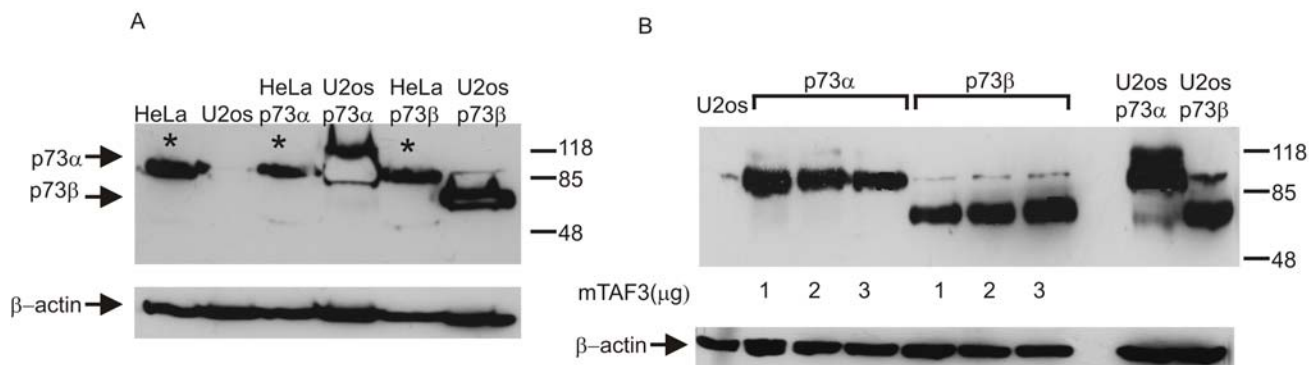
27. ábra: Az mTAF3-nak nincs jelentős hatása a p73 α és p73 β transzkripció aktiváló képességére HeLa és Saos2 sejtekben.

(A és B) HeLa sejteket és Saos2 sejteket (C és D) ko-transzfektáltunk luciferáz riporter (0,5 μ g), p73 α és p73 β -át kifejező (0,5 μ g), valamint növekvő mennyiségű (0, 0,5, 1, 2 μ g) mTAF3-at kifejező plazmival. A transzfektált DNS mennyiséget minden mintában üres vektor DNS-sel 3 μ g össz-DNS mennyiségre kiegészítettük. A luciferáz enzimaktivitást 24 órával a transzfektációt követően határoztuk meg, a feltüntetett szórások a standard deviációt jelölik.

A kísérlet eredményéből látszik, hogy az mTAF3 jelenléte nem volt jelentős hatással a p53 rokon fehérjék (p73 α és p73 β) transzkripciót aktiváló képességére, ha csak kis mennyiségben vagy egyáltalán nem volt endogén p53 jelen a rendszerben.

4.8. A p53 rokon fehérjék szintjének változása az mTAF3 hatására U2OS sejtekben.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen hatással lehet az egér TAF3 túltermelése a p73 α és p73 β fehérje szintjére (28. ábra).



28. ábra: Az mTAF3 túltermelés hatása a p73 α és p73 β fehérje szintjére.

(A) Nem transzfektált U2OS és HeLa sejtek ill. HA (=hemagglutinin) taggal jelölt p73 α és p73 β -t expresszáló plazmiddal transzfektált sejtek vizsgálata Western blot módszerrel anti-HA ellenanyag (Santa Cruz, 1:2000) használatával. Ugyanazt a filtert anti-aktin (Sigma, 1:2000) ellenanyaggal is előhívtuk, melyet belső kontrollként használtunk (* nem specifikus jel HeLa sejtekben). (B) U2OS sejteket ko-transzfektáltunk p73 α ill. p73 β -t kifejező plazmiddal és az ábrán jelölt módon növekvő mennyiségű (1, 2, 3 μ g) mTAF3-at kifejező plazmiddal. A sejtlyátumokat 24 órával a transzfekciót követően preparáltuk, majd Western blot módszerrel anti-HA ellenanyaggal (Santa Cruz, 1:2000) vizsgáltuk a p73 α és p73 β fehérje szintjének változását az mTAF3 túltermelés hatására.

Mivel a p73 α és p73 β fehérjéket csak U2OS sejtekben tudtuk kimutatni és HeLa sejtekben nem, ezért az mTAF3 lehetséges szerepét a p73 α és p73 β fehérjék szintjére csak endogén p53-t tartalmazó U2OS sejtekben tudtuk megvizsgálni (28. ábra). Azt találtuk, hogy a növekvő mennyiségű mTAF3 enyhén csökkentette a p73 α fehérje szintjét, ezzel szemben a p73 β fehérje szintje fokozatosan emelkedett.

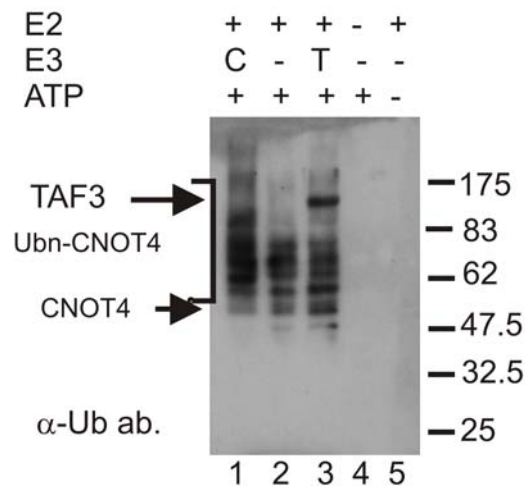
4.9. Az mTAF3 PHD domén szerepének vizsgálata.

4.9.1. Működhet-e E3 ubikvitin ligázként az mTAF3?

In vitro ubikvitinációs kísérlet

Mivel az irodalomban számos cikk beszámol a PHD doménnel rendelkező fehérjék E3 ubikvitin ligáz aktivitásáról, érdekesnek tartottuk megvizsgálni, vajon az mTAF3 szerepet játszhat-e a p53 fehérje lebontásában. E feltételezésünkre a p53 fehérje szintjében tapasztalt enyhe csökkenés és a p53 transzkripciót aktiváló képességének drámai csökkenése szolgáltatta az alapot. Ezért ubikvitinációs kísérletekben megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy az mTAF3 ubikvitin ligázként működhet-e a p53 számára.

Az E3 ubikvitin ligázok képesek önmagukat ubikvitinálni, ezért először az mTAF3 auto-ubikvitinációs aktivitását vizsgáltuk meg. A kísérlet alapjául **Alberts és mtsai** (2002) közleménye szolgált, melyben kimutatták a RING finger-típusú (C₄C₄), CNOT4 fehérjéről, mely a CCR4-NOT4 komplex komponense, hogy E3 ubikvitin-fehérje ligáz funkcióval rendelkezik. A CNOT4 számos E2 ubikvitin-konjugáló enzim esetében képes kifejteni E3 ubikvitin-ligáz aktivitását, így pl. az UbcH5B esetében is. A kísérleteinkben ezeket a fehérjéket használtuk pozitív kontrollként (**29. ábra**).



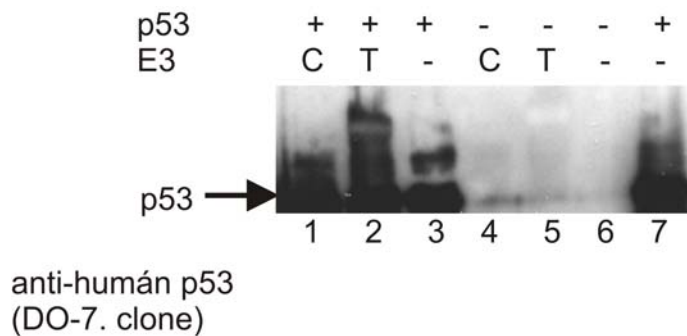
29. ábra: *In vitro* auto-ubikvitináció kimutatása

Minden minta esetében azonos E1 enzimet és E2 enzimet (GST-UbcH5B tisztított fehérjét) használtunk. Az 1-es minta szolgált pozitív kontrollként (C=CNOT4), a 2-es negatív kontrollként, ahol E3 helyett üres Sf9 fehérje kivonatot adtunk. A 3-as mintában E3 ligázként a vizsgálandó mTAF3-at (T=mTAF3) tartalmazó tisztított fehérje kivonatot használtunk ATP és reakció puffer, valamint ubikvitin hozzáadásával. Az utolsó két minta negatív kontroll, a 4-es E2-öt, az 5-ös pedig ATP-t nem tartalmazott. A mintákat poliakrilamid gélen megfuttatva anti-ubikvitin (Santa Cruz, 1:1000) ellenanyaggal Western blot kísérletben autoradiográfiásan értékeltük.

A kísérlet eredménye nem utal arra egyértelműen, hogy az mTAF3-nak lenne autoubikvitinációs képessége.

Ezután egy újabb *in vitro* ubikvitinációs kísérletben megvizsgáltuk az mTAF3 p53-ra gyakorolt hatását. Az *in vitro* ubikvitinációs kísérletet tisztított GST-p53-t használva a fent leírt módon ismét elvégeztük. A mintákat Western blot kísérletben vizsgáltuk anti-humán p53 ellenanyag használatával. Amikor a tisztított CNOT4 fehérjét használtuk E3 ligázként (**30. ábra 1-es minta**), az E3-t nem tartalmazó mintához (**30. ábra 3. minta**) képest nem láttunk különbséget a p53 fehérje mobilitásában, bár mindkét minta esetén megjelent a GST-p53 fölött egy sáv.

Azonban amikor E3 ligázként mTAF3-at adtunk a p53-hoz (**30. ábra 2. minta**), több magasabb mobilitású sáv jelent meg a GST-p53 fölött, ami lehet ubikvitinált p53.



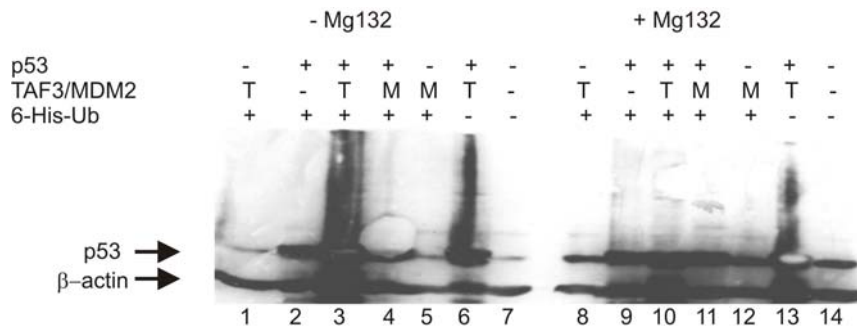
30. ábra: A p53 *in vitro* ubikvitinációjának kimutatása.

Az *in vitro* ubikvitinációs kísérletet ugyanazokkal az E1 és E2 enzimekkel végeztük, mint a **29. ábrán**. C: CNOT4 tisztított fehérjét használtunk E3 ligázként, T: feltételezett E3 ligázként tisztított mTAF3-at adtunk. Negatív kontrollként mTAF3-at nem tartalmazó Sf9 fehérje kivonatot használtunk. A 4-6. minták megegyeztek az előző három mintával, de nem tartalmaztak tisztított GST-p53 fehérjét. Az utolsó minta E3-at nem, csak p53-t tartalmazó kontroll volt. A mintákat poliakrilamid gélen Western blot kísérletben vizsgáltuk anti-humán p53 (Dako Cytomation, 1:1000) elsődleges ill. anti-egér HRP-konjugált másodlagos ellenanyag használatával.

4.9.2. *In vivo* ubikvitinációs kísérlet

Mivel az *in vitro* kísérletek nem bizonyították egyértelműen az mTAF3 E3 ubikvitin ligáz aktivitását, ezért megvizsgáltuk *in vivo* is az egér TAF3 lehetséges E3 ligáz aktivitását, De Graaf és mtsai (2003) által leírt módszert használva.

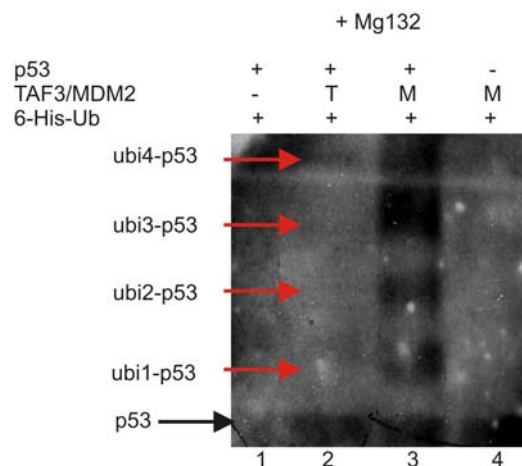
Endogén p53-t tartalmazó U2OS sejteket ko-transzfectáltunk MDM2-t vagy mTAF3-at és 6-His-ubikvitint kifejező plazmiddal. Két nappal a transzfectiót követően a minták felét MG132 proteaszóma inhibitorral, míg a másik felét kontrollként DMSO-val 4 órát kezeltük. Teljes sejt lizátumokat Western blot módszerrel anti-humán p53 ellenanyaggal reagáltattunk. Sem az mTAF3-at (**31. ábra 3. és 10. minta**), sem a pozitív kontrollként MDM2-t túltermelő sejtekben (**4. és 11. minta**) nem láttuk az ubikvitinált p53-formák megjelenését sem a kezeletlen (**1-7.**) sem a proteaszóma inhibitorral kezelt (**8-14.**) mintákban. A p53-as ellenanyag nagy háttérrel adott az mTAF3-at túltermelő sejtek esetében (**31. ábra 3. és 10. minta**). Ez a kísérlet nem támasztotta alá az mTAF3 közvetlen E3 ligáz aktivitását.



31. ábra: Az mTAF3 E3 ubikvitin ligáz aktivitásának *in vivo* vizsgálata.

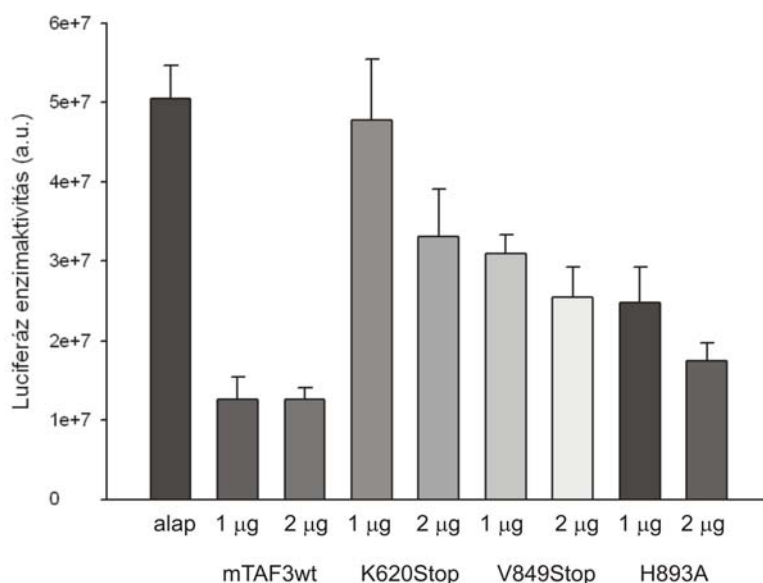
U2OS sejteket transzfektáltunk az ábrán jelölt módon MDM2-t (M) vagy mTAF3-at (T) és 6-His-ubikvitint kifejező plazmiddal. Összességében mindegyik minta azonos mennyiségű, 5 µg DNS-t tartalmazott. A 7. és 14. minta a nem transzfektált U2OS sejteket mutatja. Két nappal a transzekciót követően a minták felét DMSO-ban feloldott MG132 proteaszóma inhibitorral, míg a másik felét DMSO-val inkubáltuk 4 órát. A teljes sejt kivonatot poliakrilamid gélen megfuttattuk és Western blot módszerrel anti-humán p53 (Dako Cytomation, 1:1000) elsődleges és anti-egér HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal mutattuk ki a p53 fehérje különböző formáit. Belső kontrollként anti-aktin (Sigma, 1:2000) ellenanyagot használtunk anti-nyúl HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal.

A 6-His-ubikvitinnel módosított p53 jobb detektálása érdekében az előzőekben leírt lizátumokat Ni-NTA-agaróz gyöngyökhöz kevertük, ami megköti a 6-His jelölt fehérjéket. A gyöngyöket mostuk, majd az eluált fehérjéket ismét p53-specifikus ellenanyagot használva Western blottal vizsgáltuk. Az *in vivo* ubikvitinációs kísérletből kapott 6-His-jelölt ubikvitin termékek a **32. ábrán** láthatók.



32. ábra: Az mTAF3 feltételezett ubikvitin ligáz aktivitásának *in vivo* vizsgálata 6-His ubikvitin affinitás kicsapással.

A 31. ábrán mutatott transzfektált U2OS sejt-lizátumokból a 6-His-jelölt ubikvitin termékeket Ni-NTA agaróz segítségével csaptuk ki, a csapadékokat felvittük poliakrilamid géltre és Western blot módszerrel anti-humán p53 (Dako Cytomation, 1:1000) elsődleges és anti-egér HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal vizsgáltuk. A nyilak a p53 ubikvitinált, módosított formáit mutatják.



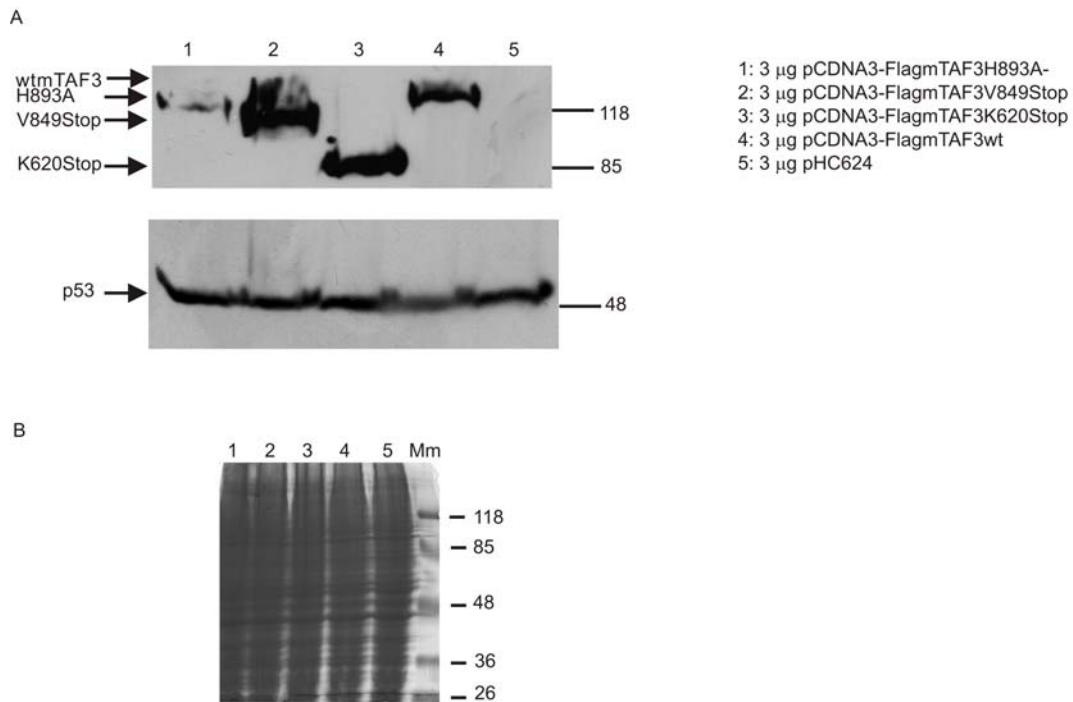
34. ábra: A PHD doménben mutáns egér TAF3 fehérjék hatása az endogén p53 transzkripciót aktiváló képességére.

U2OS sejteket transzfektáltunk azonos mennyiségű p53-érzékeny riporter plazmival (0,5 µg) és az ábrán jelölt megfelelő mTAF3-at túltermelő plazmival növekvő mennyiségben. Az össz DNS mennyiségét mindegyik mintában üres vektorral (pHC624) 3 µg-ra egészítettük ki. Az első oszlopban az endogén p53 alapaktivitását jelöltem. A luciferáz enzimaktivitást 24 órával a transzfekciót követően határoztuk meg, a feltüntetett szórások a standard deviációt jelölik.

A kísérletből látszik, hogy a vad típusú mTAF3 növekvő mennyiségben transzfektálva, drasztikusan csökkentette az endogén p53 transzkripciót aktiváló képességét. A PHD doménben pontmutáns (H893A) és deléciós mutánsok (V849Stop, K620Stop) esetében, minél nagyobb rész hiányzott a PHD doménből ill. az mTAF3 fehérjéből, annál kevésbé fejtették ki gátló hatásukat a p53 transzkripciót aktiváló képességére.

4.10.1. A PHD doménben mutáns mTAF3 hatása a p53 fehérje szintjére.

Az mTAF3 p53-ra gyakorolt hatása részben annak köszönhető, hogy mTAF3 jelenlétében lecsökken a p53 fehérje szintje. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a PHD domén eltávolításával elveszti-e az mTAF3 ezt a tulajdonságát. Ehhez az előző kísérletben is használt PHD doménben deléciós (K620Stop, V849Stop) ill. pontmutáns (H893A) mTAF3-at túltermelő konstrukciókat U2OS sejtekbe juttattuk, majd vizsgáltuk a p53 fehérje szintjének változását (35. ábra).



35. ábra: A PHD doménben mutáns egér TAF3-ak hatása az endogén humán p53 fehérje szintjére.

(A) U2OS sejteket transzfektáltunk az ábrán jelzett módon, majd Western blot módszerrel megvizsgáltuk a túltermelt mTAF3-ak jelenlétét anti-Flag (Sigma, 1:10000) elsődleges ellenanyaggal ill. az endogén p53 fehérje szintjét anti-p53 (Dako Cytomation, 1:1000) elsődleges ellenanyaggal. (B) A minták fehérje mennyiségét Coomassie gélen ellenőriztük és ezzel igazoltuk, hogy ugyanannyi fehérjét vittünk fel mindegyik esetben.

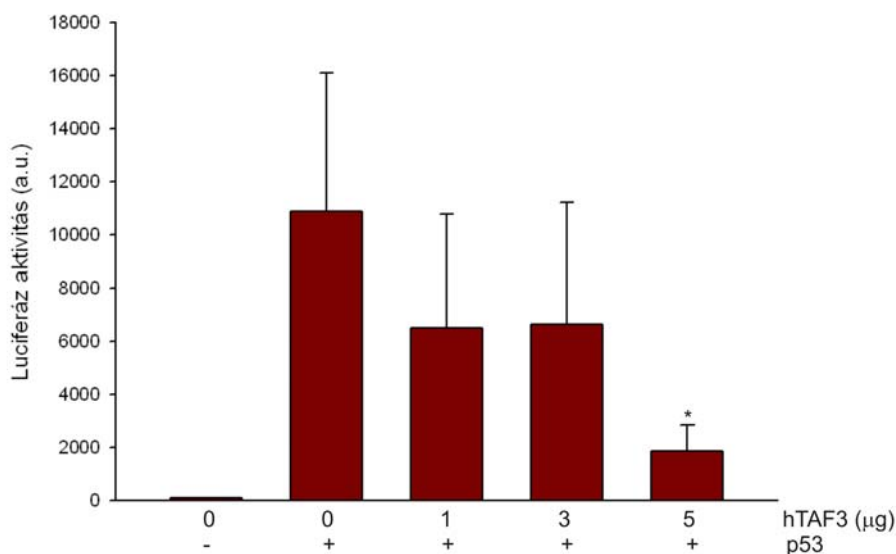
A kísérlet eredményeként azt kaptuk, hogy a PHD doménben mutáns egér TAF3-ak túltermelése nem volt hatással az endogén p53 fehérje szintjére (35. ábra 1, 2, 3 minta), míg a vad típusú mTAF3 (4. minta) esetében egy enyhe csökkenést ismét sikerült kimutatnunk a negatív kontrollhoz képest (5. minta).

4.11. A PHD doménnel nem rendelkező hTAF3 hatása a p53 és rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességére.

Az adatbázisban fellelhető adatok szerint a prediktált hTAF3 (XM_291729.5) tartalmaz PHD domént a C-terminális részén, hasonlóan a *Drosophila* és egér homológ TAF3-hoz. Azonban ezt a prediktált, teljes hosszúságú formát eddig senkinek nem sikerült kísérletesen kimutatni (Gangloff és mtsai, 2001) HeLa sejtvonalban.

Nekünk is csak az adatbázis AJ292190 számú hTAF3 szekvencia alapján egy részleges (400-680. aminosav) és egy teljes hosszúságú (1-680. aminosav) hTAF3 formát kódoló szakaszt sikerült amplifikálnunk HeLa cDNS könyvtárból, tehát úgy tűnik, hogy ezek a formák expresszálódnak HeLa sejtekben.

Az egér TAF3-mal történt vizsgálatok elvégzése után viszont érdekesnek tartottuk megnézni, hogy vajon a PHD doménnel nem rendelkező humán TAF3 mennyiben gyakorol eltérő hatást a p53 ill. a p73 α és p73 β transzkripciót aktiváló képességére, mint a PHD domént tartalmazó mTAF3. Ezért az mTAF3-mal elvégzett transzaktivációs képességet tesztelő kísérleteket hTAF3 fehérjével is megismételtük (**36. ábra**).



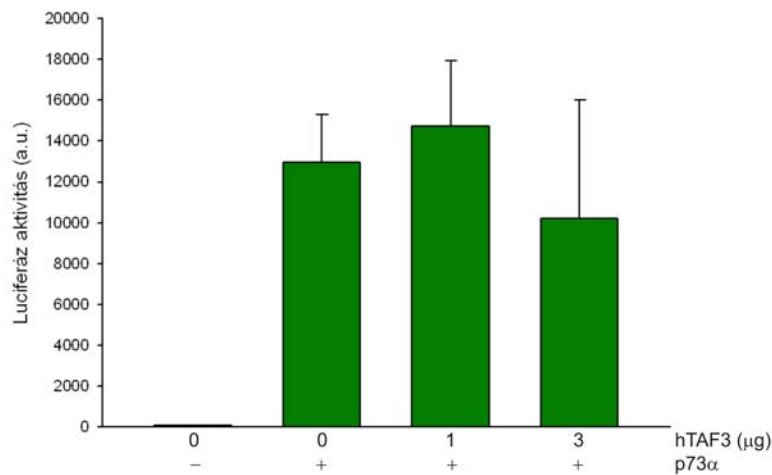
36 ábra: A hTAF3 hatása a p53 transzkripciót aktiváló képességére.

HeLa sejteket ko-transzfektáltunk p53-t (0,5 μg), hTAF3-at (0, 1, 3, 5 μg) kifejező plazmával és p53-érzékeny luciferáz riporter plazmával (0,5 μg), mindegyik mintát üres vektorral összesen 6 μg DNS mennyiségre egészítettük ki. A luciferáz enzimaktivitást 24 órával a transzekciót követően határoztuk meg, a feltüntetett szórások a standard deviációt jelölik, az adatokat t-próbával elemeztük: * P < 0,05.

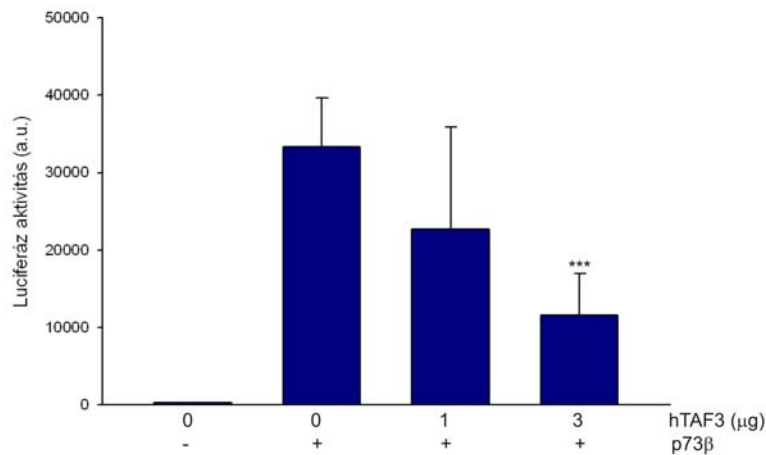
A hTAF3 annak ellenére, hogy hiányzik a C-terminális PHD finger doménje, kifejtette gátló hatását a p53 aktivitására (**36. ábra**).

Kíváncsiak voltunk a hTAF3 hatására a humán p53 géncsalád másik két tagjának, a p73 α és p73 β esetében is (**37. ábra**).

A



B



37. ábra: A hTAF3 hatása a p73α és p73β transzkripciót aktiváló képességére.

HeLa sejteket ko-transzfektáltunk p73α-át (A) és p73β-át (B) kódoló (pCDNA3-HA-p73α, pCDNA3-HA-p73β), p53-érzékes luciferáz riporter (0,5 μg) ill. növekvő mennyiségű (0, 1, 3, 5 μg) hTAF3-at kódoló plazmival. A luciferáz enzimaktivitást 24 órával a transzfektációt követően határoztuk meg, a feltüntetett szórások a standard deviációt jelölik, az adatokat t-próbával elemeztük: ***P < 0,005.

A p73α transzkripciót aktiváló képességét nem befolyásolta szignifikánsan a hTAF3 jelenléte, ami megegyezik a mTAF3-nál tapasztalt eredményekkel. Azonban a p73β esetében érdekes módon jelentős gátló hatást tudtunk kimutatni.

5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Munkám során a p53 tumor szuppresszor fehérje lehetséges kölcsönható partnereit térképeztem fel. Az én feladatomban a kölcsönható partnerek közül egy TBP (TATA box-kötő fehérje)-asszociált fehérjével, a TAF3-mal való interakciójának igazolása és funkcionális vizsgálata volt.

5.1. A p53 fehérje új kölcsönható partnere: a TAF3 fehérje.

A Dmp53 kölcsönható partnereinek azonosítása céljából *Drosophila* embrionális cDNS könyvtár szűrését végeztük el élesztő két-hibrid módszerrel. Az azonosított pozitív klónok közül kettő részleges *Bric-a-Brac* kölcsönható fehérje gén (*bip2/CG2009*) cDNS-t tartalmazott. A Bip2 fehérjét más kísérletekben, mint egy TBP (TATA box-kötő fehérje)-asszociált fehérjét azonosították és TAF_{II}155 ill. DmTAF3-nak nevezték el (Tora, 2002). A Bip2 esetében már más csoport is kimutatta, hogy képes olyan transzkripciós faktorhoz kötődni, mely BTB-POZ domént tartalmaz (Pointud és mtsai, 2001). Ezért sem meglepő, hogy mi egy másik transzkripciós faktoral, a p53-mal tudtuk kimutatni a kölcsönhatását.

Az izolált klónok összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a Dmp53-mal való kölcsönhatásért a DmTAF3 738 és 924 aminosavak közötti régió felelős. Érdekes módon mások is a DmTAF3 középső régióját találták kölcsönhatásban más transzkripciós faktorokkal, pl. a GAGA faktor (612-1073 aminosavak között) (Chopra és mtsai, 2008), az Antennapedia (853-1088 aminosavak között) (Prince és mtsai, 2008) és a BAB1/2 (859-1091 aminosavak között) (Pointud és mtsai, 2001) fehérjék esetében. Bár a DmTAF3 ezen középső régiója alacsony fokú hasonlóságot mutat az emlős TAF3 megfelelő régiójával (egér TAF3 497-608 aminosav) (Gangloff és mtsai, 2001), mégis elképzelhetőnek tartjuk, hogy ez a régió transzkripciós-faktor kötő doménként felelős lehet más, eddig még nem azonosított transzkripciós faktorokkal történő interakció kialakításáért is. A Dmp53 DNS-kötő doménje csak gyenge, míg C-terminális része erős kölcsönhatást mutatott a DmTAF3-mal élesztő két-hibrid kísérletben. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a DmTAF3 többszörös kötőhelyeken keresztül képes kölcsönhatni a Dmp53-mal. Az irodalomban már bizonyított TAF és p53 kölcsönhatások közül találhatunk példát a p53 N-terminálisán keresztül megvalósuló szokványos transzkripciót aktiváló kölcsönhatásra a TAF6 (Thut és mtsai, 1995) és TAF9 (Lu és Levine, 1995) esetében, melyek transzkripciós koaktivátor szereppel bírnak.

Azonban hasonlóan a TAF3-hoz a C-terminális szabályzó doménen, azaz nem szokványos útvonalon keresztül megvalósuló kölcsönhatásra is van példa a TAF1 (Li és mtsai, 2004) esetében, mely ily módon részt vesz a p53 C-terminális módosításában. A TAF1 ugyanis képes fehérje kináz aktivitása révén foszforilálni a p53-t a Thr55-ös helyen és így segíti elő a p53 MDM2-általi degradációját. Mivel a TAF3 is a p53 C-terminálisához képes legnagyobb affinitással kötödni, így elképzelhető, hogy részt vesz a p53 C-terminális módosításában.

5.2. A TAF3 és a p53 közötti interakció evolúciósan konzervált.

Az irodalomban számos bizonyíték szolgál arra, hogy a humán p53 kölcsönhat *Drosophila* fehérjékkel például a *Drosophila* TBP-vel (Farmer és mtsai, 1996), illetve olyan fehérjékkel, melyeket Dmp53-mal kölcsönható fehérjeként azonosítottak (Bodai és mtsai, 2007). Az általunk kimutatott DmTAF3-mal való kölcsönhatásért felelős régió a Dmp53 C-terminális részére lokalizálható, mely régió a humán p53 C-terminális részével csak kismértékű, mintegy 13%-os hasonlóságot jelez aminosav szinten. Ennek ellenére kísérleteink erős interakciót mutattak a DmTAF3 és a humán p53 fehérje között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DmTAF3-mal való kölcsönhatásért felelős részek konzerváltak és a p53-ban valamint a Dmp53-ban egyaránt megvannak. A két fehérje C-terminális részének szekvenciális összehasonlítása során csak néhány ismétlődő aminosavat [p (prolin), r (arginin), t (treonin), d (aszparaginsav), q (glutamin), a (alanin), k (lizin) és a l (leucin)] találtunk, mely megegyezik mindkét fehérjében és így szerepe lehet a DmTAF3-mal való interakció kialakításában.

5.2.1. A DmTAF3 és a Dmp53 kölcsönhatásának megerősítése más *in vitro* módszerrel.

A DmTAF3 és a Dmp53 közötti interakciót az élesztő két-hibrid módszertől független *in vitro* kötési módszert (pull down assay) alkalmazva is kimutattuk. Mivel a DmTAF3 csak a GST-Dmp53C-hez kötődött, a GST-hez önmagában nem, így megállapítottuk, hogy a két fehérje közötti kölcsönhatás közvetlen és specifikus.

5.2.2. Az egér homológ TAF3 és p53 *in vitro* kölcsönhat egymással.

Az evolúciósan konzervált kölcsönhatásból kiindulva, miszerint a DmTAF3 a p53-mal is kölcsönhat, megvizsgáltuk az emlős homológok (egér TAF3 és humán p53) közötti interakció lehetőségét is két *in vitro* kötési kísérletben.

Magas sókoncentrációs mosást követően csak a GST-Dmp53C és a GST-p53 kötődése maradt meg. Ez az eredmény tehát egyértelműen mutatja az mTAF3 és a p53 közötti specifikus kölcsönhatást, sőt mivel a Dmp53-mal is kimutatható volt a kölcsönhatás, így ismét megbizonyosodtunk arról, hogy a TAF3-p53 közötti interakció valóban evolúciósan konzervált.

Az emlős TAF3 és p53 közötti interakció meglétét reverz kísérletben is sikerült bizonyítanunk. Ehhez a teljes hosszúságú humán p53-t, a *Drosophila* Ada2a-t és kontrollként a szentjánosbogár luciferázt *in vitro* transzláltuk, majd összekevertük egér TAF3-at tartalmazó fehérje kivonattal és anti-TAF3 ellenanyagot használva immunprecipitációt végeztünk. A kísérletből azt láttuk, hogy a p53 ko-precipitálódott az mTAF3-mal, míg az Ada2a és a luciferáz nem. Ezek az adatok egyértelműen alátámasztották a p53 és az mTAF3 között meglévő *in vitro* specifikus interakciót.

5.2.3. Az egér TAF3 és a p53 kölcsönhatás humán sejtekben is *in vivo*.

Kíváncsiak voltunk, hogy a TAF3 és a p53 közötti *in vitro* specifikus kölcsönhatás létrejön-e humán sejtekben is *in vivo*. Mivel mindkét fehérjének az endogén szintje nagyon alacsony humán sejtekben, így a sejteket ko-transzfectáltuk mTAF3-at és p53-t kifejező plazmiddal. Az mTAF3-at tartalmazó komplexeket immunprecipitáltuk és vizsgáltuk a p53 jelenlétét. A kísérlet eredménye egyértelműen igazolta *in vivo* is a két fehérje közötti interakció meglétét.

Tehát az mTAF3 és a p53 közötti specifikus kölcsönhatást egyértelműen sikerült bizonyítanunk *in vitro* és *in vivo*.

5.3. A TAF3 és a p53 rokon fehérjék kölcsönhatnak *in vitro*.

Mivel a p53 és a TAF3 között *in vitro* és *in vivo* is ki tudtuk mutatni az interakciót, így érdekesnek tartottuk megvizsgálni a humán p53 géncsalád más tagjainak, a humán p73 α és p73 β fehérjéknek lehetséges kölcsönhatását a TAF3 fehérjével. A humán p53 család tagjai a p63 és p73, strukturálisan hasonlítanak a p53-hoz és bár nem közvetlenül vesznek részt a tumor szuppresszióban, szerepüket az apoptózisban számos cikk bizonyította (Yang, 1998). A család tagjai között fennálló hasonlóságnak köszönhetően a p63 és p73 képes transzaktiválni a p53 célgénjeit (Di Como és mtsai, 1999; Gaiddon és mtsai, 2001), ezáltal képes sejtciklus megállást és apoptózist indukálni.

Először élesztő két-hibrid módszert alkalmazva sikerült igazolnunk feltételezésünket, vagyis, hogy kölcsönhat a humán p73 α és p73 β is a DmTAF3-mal. Egy másik *in vitro* kísérletben is, ahol a p73 α és p73 β -t a luciferáz fehérjékkel együtt *in vitro* transzláltuk és túltermelt mTAF3 fehérjét tartalmazó kivonathoz adtuk, azt tapasztaltuk, hogy az anti-TAF3 ellenanyaggal csak a p73 α és p73 β ko-precipitálódott, a luciferáz nem.

Ezek az adatok megerősítik az élesztő két-hibrid kísérletben kapott eredményt, miszerint a p73 α ill. p73 β és az mTAF3 közötti interakció specifikus. A p53 rokon fehérjék és a TAF3 közötti kölcsönhatás gyengébbnek mutatkozott mindkét kísérleti rendszerben, mint a p53 esetében. Elképzelhető, hogy az aminosav sorrendben levő különbségekből és a domén felépítési eltérésekből adódhat az, hogy gyengébb a kölcsönhatás a p73 α , p73 β fehérjék és a TAF3 között. Hiszen a p73 fehérjék C-terminális része még további két domént is tartalmaz, mely hiányzik a p53 C-terminális részéről, ezek a PR (prolinban gazdag) és a SAM (steril alfa motívum) domének.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy nemcsak a TAF3 és a p53 között, de a p53 rokon fehérjék és a TAF3 között is evolúciósan konzervált kölcsönhatás van.

5.4. A TAF3 és a p53 közötti interakció funkcionális következménye.

5.4.1. Az mTAF3 specifikusan gátolja a p53 transzkripciót aktiváló képességét.

A TFIID komponenseként a DmTAF3 (más néven Bip2/dTAF_{II}155) (Gangloff és mtsai, 2001) közvetlen kapcsolatot teremt az alap transzkripció gépezet és a BTB/POZ doménnel rendelkező transzkripció faktorok között, melyekről számos csoport bebizonyította, hogy transzkripció represszorként működhetnek. Sőt elképzelhetőnek tartják, hogy a DmTAF3 és az emlős homológ TAF_{II}140 fehérjék a PHD doménon keresztül irányíthatják a BTB/POZ fehérjék közötti interakciókat és represszor aktivitásokat (Deweindt és mtsai, 1995).

A TAF3 és a p53 közötti kölcsönhatás funkcionális következményének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az mTAF3 erősen gátolja az endogén p53 transzkripciót aktiváló képességét U2OS sejtekben.

HeLa sejtekben is megvizsgáltuk az egér TAF3 hatását a p53 transzaktivációs képességére, mivel ki akartuk zárni, hogy az mTAF3-nak a gátló hatása sejttípus-függő. Ebben a sejtvonalban azonban a p53 transzaktiváló képességére kifejtett gátló hatás nem volt olyan drámai, mint az endogén p53 esetében.

Sőt már a p53 alapaktivitása sem olyan magas HeLa sejtekben, mint az endogén p53-mal rendelkező U2OS sejtekben. Elképzelhető, hogy HeLa sejtekben a transzfekció hatékonyságának köszönhető az alacsonyabb aktivitás, szemben a U2OS sejtekkel, ahol egy állandó, alap endogén p53 szint jellemző. Tehát megállapíthatjuk, hogy az mTAF3 gátló hatásának mértéke függ a vizsgált sejtípustól.

Ezután megvizsgáltuk, hogy specifikus-e az mTAF3 hatása a p53 transzkripció aktivációra vagy egy általános transzkripció gátlásról van szó. Ennek tesztelésére nem p53-érzékeny CMV promóterrel rendelkező luciferáz riporter plazmidot alkalmaztunk HeLa sejtekben. Az mTAF3-nak semmi hatása nem volt az alkalmazott promóter aktivitására. Tehát az mTAF3 által kiváltott erős gátló hatás a p53 transzkripció aktivitására abszolút specifikus a p53-ra és nem egy általános transzkripció blokk eredménye.

Más csoportok arról számoltak be, hogy a TAF3 inkább aktivátorként, és nem represszorként működik számos más transzkripció faktor esetében, hiszen pl. az ATF7 esetében nincs gátló hatása (Hamard és mtsai, 2005) és koaktivátorként hat a WDR5-függő gének esetében (Vermeulen és mtsai, 2007).

Elképzelhető, hogy a TAF3-nak a p53 C-terminálisához kötődése olyan módosításokat indít be, melynek hatására a p53 transzkripciót aktiváló képessége gátlódik.

Az irodalomban találunk példát hasonló kölcsönhatásra, mely a TAF1 és p53 között jön létre, melynek eredménye, hogy a p53 a C-terminális részén (Thr55) foszforilálódik, így járul hozzá a p53 MDM2-általi degradációjához.

5.4.2. A p53 fehérje szintje enyhén csökkent, viszont a mRNS szintje nem változott az mTAF3 hatására.

A p53 transzkripció aktivitására kifejtett gátló hatás okának kiderítésére megvizsgáltuk, hogy az mTAF3 hatással van-e a p53 fehérje szintjére. U2OS sejtekben a p53 fehérje szintjének csökkenése nem volt olyan drámai, mint a p53 transzkripciót aktiváló képességben tapasztalt csökkenés. Míg HeLa sejtekben összehasonlítható volt a p53 fehérje szintjében tapasztalt csökkenés mértéke a p53 transzkripciót aktiváló képességének csökkenésével.

Az irodalomban is beszámoltak már ehhez hasonló jelenségről, amikor is a p53 sumoilálódása fokozza a p53 transzkripciót aktiváló képességét, azonban a p53 fehérje szintjében ez nem okoz drámai növekedést (Rodriguez és mtsai, 1999).

Sőt a p53 rokon fehérje, a p73 α esetében kimutatták, hogy képes az MDM2-vel kölcsönhatni, viszont ez az interakció nem okozza a p73 α degradációját, szemben a p53-mal. Azonban megfigyelhető az MDM2 hatására a p73 α transzkripciót aktiváló képességének csökkenése, hasonlóan a p53-éhoz (Balint és mtsai, 1999). Tehát számos esetben bizonyították már, hogy a transzkripciót aktiváló képességre kifejtett hatás nem minden esetben mutatkozik meg fehérje szinten is.

Nem találtunk változást a p53 mRNS szintjében az mTAF3 hatására. Ez azt mutatja, hogy az mTAF3 nem befolyásolja a p53 mRNS képződését és stabilitását. Összességében tehát a kapott eredményekből arra következtettünk, hogy az mTAF3 képes gátolni a p53 transzkripciót aktiváló funkcióját, ezt kisebb mértékben a p53 fehérje szintjének csökkenésével éri el, anélkül, hogy a p53 mRNS szintjét megváltoztatná.

A p53 transzkripciót aktiváló képességre és fehérje szintre kifejtett gátló mTAF3 hatás miatt elképzelhető, hogy az mTAF3 az MDM2-höz hasonló szerepet tölt be az izomdifferenciáció során. Ugyanis a fejlődő szövetekben az MDM2 gátolja a p53 sejtsztódást gátló hatását (Honda és Yasuda, 2000; Midgley és mtsai, 2000). Mivel a differenciálódó sejttípusok nem tudnak könnyen elrákosodni, így nincs szükség bennük p53-ra, tehát elképzelhető, hogy a TAF3 is részt vesz a p53 alacsony szinten tartásában. Ugyanis kimutatták, hogy az izmok myoblasztokból-izomrostokká történő differenciációja során a TAF3 a TRF3 fehérjével együtt állandó magas szinten maradt, mely együttjárt a TBP és a TFIID drámai elvesztésével.

Úgy tűnik tehát, hogy a TBP és más általános TFIID alegység hiányában a TAF3 a TRF3-mal együtt funkcionálisan helyettesítheti az esszenciális promóter felismerő aktivitást differenciált izomrostokban, mely irányítja az izom-specifikus gének transzkripcióját (Deato és Tjian, 2007).

5.5. Az egér TAF3 nem volt hatással a p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességére.

Tekintettel arra, hogy a TAF3 kölcsönhatását a p53-on kívül a p73 fehérjékkel is kimutattuk, kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a humán p53 géncsalád másik két tagjának (p73 α és p73 β) aktivitását is módosítja-e az mTAF3. Ennek vizsgálatára HeLa sejteket és Saos2 sejteket használtunk, mivel ezek csak kis mennyiségben (HeLa) vagy egyáltalán nem (Saos2) tartalmaznak endogén p53-t tartalmazznak.

Mindkét sejtvonalonban azt kaptuk, hogy az mTAF3 nincs jelentős hatással a p73 α és p73 β általi transzkripció aktivációra. Már korábban is láthattuk, hogy a p73 szabályozása nagymértékben különbözik a p53-étól, például, ha a stabilitásukat, lebontásukat nézzük. A korábban végzett élesztő két-hibrid és *in vitro* kötési kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy a p53 rokon fehérjék (p73 α , p73 β) gyengébb kölcsönhatás kialakítására képesek a *Drosophila* és egér TAF3-mal, mint a p53. Ezzel a kevésbé hatékony kölcsönhatással magyarázható az, hogy az mTAF3 nem tudja jelentősen befolyásolni a p73 α és p73 β transzkripciót aktiváló képességét.

5.5.1. Az egér TAF3 csökkentette a p73 α ill. fokozta a p73 β fehérje szintjét, endogén p53 jelenlétében.

Mivel HeLa sejtekben a rendelkezésünkre álló ellenanyag segítségével nem tudtuk kimutatni a p73 α és p73 β fehérjéket, így csak az endogén p53-t is tartalmazó U2OS sejtekben tudtuk megvizsgálni az mTAF3 hatását a p53 rokon fehérjék szintjére. Azt találtuk, hogy a növekvő mennyiségű mTAF3 enyhén csökkentette a p73 α fehérje szintjét, ezzel szemben a p73 β fehérje szintje fokozatosan emelkedett. Nyilván ezek az adatok nem csengnek egybe a transzkripciót aktiváló képességre kifejtett hatással, ahol semmi változást nem tudunk megfigyelni, de az alapvető különbség a két kísérlet körülményeiben befolyásolhatta a kapott eredményt. Hiszen az mTAF3-nak a p73 α és p73 β transzkripció aktivációra kifejtett hatását p53-t nem tartalmazó rendszerben vizsgáltuk, míg a fehérje szintre kifejtett hatását p53-t tartalmazó sejtekben néztük.

Számos közlemény számol be arról, hogy a p53 és vele rokon fehérjék között funkcionális interakció van és képesek egymásra hatni. Ilyen esetet figyeltek meg például a DNS károsodásra indukálódó apoptózis során. Azokban a sejtekben, ahol a p73 vagy a p63 hiányzott, de p53 jelen volt, csak részleges apoptózist tudtak megfigyelni, viszont, ha mindkét rokon fehérje hiányzott, akkor a p53 nem volt képes apoptózist indukálni DNS károsodást követően. Ezek az eredmények is megerősítik, hogy az apoptózis kiváltásában a p53 a vele rokon fehérjékkel együttműködve fejt ki hatását (Flores és mtsai, 2002). Egy másik esetben pedig Saos2 sejtekben figyeltek meg egy érdekes jelenséget. Ha a p53-t, p73 α -val és MDM2-vel együtt ko-transzfektálták, kevésbé csökkent a p53 fehérje szintje, szemben ha csak p53-t és MDM2-t ko-transzfektáltak. Ezekből az eredményekből arra következtettek, hogy a p73 α az MDM2-vel való kölcsönhatása révén képes megvédeni a p53-t az MDM2-általi lebontástól.

Ez is alátámasztja, hogy bár sok vonatkozásban a p73 fehérjék másképp szabályzódnak, mint a p53, mégis sok esetben egymással szorosan együttműködve fejtik ki hatásukat (Balint és mtsai, 1999).

5.6. A TAF3 PHD doménjének funkciója.

A TAF3 általános felépítésére jellemző, hogy az N-terminális részen tartalmaz egy HFD domént, a C-terminális részen pedig egy PHD domént. Érdekes, hogy a TAF3 homológok között nem egységes ezen domének előfordulása, hiszen az egér és *Drosophila* homológokkal szemben, ahol rendre kimutatható mindkét domén jelenléte, a humán homológ esetében a PHD domén megléte kísérletesen nem bizonyított az általunk használt HeLa sejtvonalban. Sőt több csoport is beszámolt a humán TAF3 esetében a teljes hosszúságú forma amplifikálásának sikertelenségéről (Gangloff és mtsai, 2001; Bereczki és mtsai, 2008) HeLa sejtekben. A PHD domén szerepét a DNS kötésben, a fehérje-fehérje interakciókban (Linder és mtsai, 2000) valamint a kromatinnal való interakció szabályzásában több csoport is kimutatta (Vermeulen és mtsai, 2007; Aravind és mtsai, 2003; Scheel és Hofmann, 2003).

A TAF3 PHD doménjével kapcsolatban egy lehetséges funkciót vázolt fel Vermeulen és mtsai közleménye, melyben azt találták, hogy a TFIID és a metilált H3K4-es hiszton közötti kölcsönhatás létrehozásában van szerepe. Ugyanis a TAF3, mint transzkripciós aktivátor kötőhelyet biztosít a TFIID komplex számára a metilált hiszton H3K4-en és így elvezet az RNS polimeráz II pre-iniciációs komplex fokozott összeszerelődéséhez és stabilitásához (Vermeulen és mtsai, 2007).

Mivel a p53 és a TAF3 között létrejövő kölcsönhatást a p53 részéről a C-terminális régió valósítja meg, így megvizsgáltuk, hogy a kölcsönhatás eredményeként tapasztalt csökkenő hatás, magyarázható-e a TAF3 általi p53 C-terminális módosításával. Az irodalomban már talákoztunk hasonló jelenséggel, melynek következtében a TAF1 foszforilálja a p53 C-terminális részét (Thr55), így járul hozzá a p53 MDM2-általi lebontásához.

A p53 lehetséges módosításai közül az ubikvitináció lehetőségét vizsgáltuk meg, mely választásunkat az mTAF3 fehérje domén felépítése is jogosan indokolta, mivel az irodalomban számos megjelent publikáció bizonyítja a PHD doménnel rendelkező fehérjék E3 ubikvitin ligáz aktivitásának meglétét.

Ennek kiderítésére ***in vitro* ubikvitinációs kísérletet** végeztünk. Először megvizsgáltuk az mTAF3 auto-ubikvitinációs képességét ill. egy másik rendszerben az általunk feltételezett p53 fehérje szubsztrát esetében az mTAF3 lehetséges E3 ubikvitin ligáz funkcióját. Ezek a kísérletek azonban nem bizonyították egyértelműen az mTAF3 ubikvitin ligáz funkcióját. Ezért ***in vivo* ubikvitinációs kísérletben** is megvizsgáltuk a feltételezésünket. A 6-His-jelölt ubikvitin termékeket tartalmazó csapadékok közül az MDM2-t és p53-t is tartalmazó mintában szépen látszott a p53 fehérje ubikvitinációja. Az MDM2 helyett mTAF3-at tartalmazó mintában, csak gyengén, a többi minta esetében még gyengén sem detektáltunk ubikvitinált p53 formákat.

Összességében tehát a kapott *in vivo* és *in vitro* eredmények nem támasztották alá egyértelműen feltételezésünket, miszerint az mTAF3 és a p53 C-terminálisa között létrejött kölcsönhatás eredményeként a p53 ubikvitinálna.

További érdekes célkitűzés, megvizsgálni, hogy vajon milyen módosítást szenvedhet a p53 a TAF3-mal való kölcsönhatás eredményeként. Érdekes lenne megvizsgálni a foszforiláció lehetőségét, mely módosítás jellemző a p53 C-terminális részére és általában negatív, csökkentő hatással jár együtt. A TAF1 esetében az eukarióta fehérje kináz családdal való szekvenciális összehasonlítás szignifikáns, de gyenge homológiát mutatott aminosav szinten. A legnagyobb egyezést a *Drosophila* és humán homológ N-terminális részén találtak. Érdekes módon a TAF1 fehérje C-terminális része is mutatott kináz aktivitást, viszont ez a régió semmilyen homológiát nem mutatott egyetlen ismert fehérje kinázzal sem, beleértve a TAF1 fehérje N-terminális kináz aktivitással rendelkező részét (Dikstein és mtsai, 1996). Az egér TAF3 PIM-1 fehérje kinázzal való szekvenciális összehasonlítása megmutatta, hogy hasonlóan a TAF1-hez a TAF3 is tartalmaz olyan aminosavakat, melyek a PIM-1 fehérje kináz doménjeiben megfigyelhetők.

Ezért érdemes lenne kísérletesen is megvizsgálni annak lehetőségét, vajon rendelkezik-e kináz aktivitással a TAF3 és így módon részt vehet-e a p53 C-terminális foszforilációjában.

5.6.1. A PHD domén kiütése nem képes csökkenteni a p53 transzkripciót aktiváló képességét és fehérje szintjét.

Megvizsgáltuk, hogy vajon az egér TAF3 PHD doménjének jelenléte befolyásolhatja-e a vad típusú mTAF3 esetében látott csökkentő hatást, amit az endogén p53 transzkripciót aktiváló képességére gyakorolt. Ennek megválaszolására PHD doménben deléciós (K620Stop, V849Stop) ill. pontmutáns (H893A) mTAF3-at kifejező konstrukciókat alkalmaztunk.

A vad típusú mTAF3 esetében az elvárásainknak megfelelően ismét kimutattuk a drasztikus csökkenést a p53 transzkripciót aktiváló képességében. A H893A pontmutáns esetében, ahol a mutáció a Cys4-His-Cys3 Zn²⁺-finger típusú PHD domén központi szereppel bíró hisztidinjét érinti, közel azonos hatást tapasztaltunk a p53 transzkripciót aktiváló képességére, mint a V849Stop deléciós mutáns esetében, ahol a teljes egér PHD domén hiányzik.

Ennek a típusú PHD doménnek a gerincét a 4 cisztein a közöttük levő hisztidin és az azt követő 3 cisztein adja, melyek jelenléte esszenciális a 2 ZN²⁺ ion megkötésében. Így képes a fehérje a megfelelő térszerkezeti formáját és ezáltal más fehérjékkel való kölcsönhatását kialakítani. Tehát a PHD domén nem megfelelő felépítése miatt valószínűleg nem képes a fehérje a Zn²⁺ ionok megkötésére és így nem képes azokkal a fehérjékkel kölcsönhatásba lépni, amikkel egyébként kölcsönhatna.

A K620Stop esetében, ahol a PHD domén teljes hiánya mellett még további 240 aminosav hiányzik, a gátló hatást annál kevésbé volt képes kifejteni az mTAF3, minél nagyobb rész hiányzott belőle. Elképzelhető, hogy nem feltétlenül a PHD domén jelenléte, hanem a p53-mal való kölcsönhatásért felelős régió elvesztése is hozzájárul ahhoz, hogy a deléciós mTAF3 származékok nem tudják kiváltani a transzkripciót aktiváló képesség drámai csökkenését.

A p53 fehérje szintjén is megvizsgáltuk a PHD doménben mutáns egér TAF3-ak hatását. A kísérlet a várakozásunknak megfelelő eredményt hozta, hiszen a vad típusú mTAF3 ismét csökkentette, ha kismértékben is a p53 fehérje szintjét, viszont a PHD doménben mutáns mTAF3-ak nem okoztak változást a p53 fehérje szintjében.

Összességében elmondható, hogy az általunk tapasztalt mTAF3 által kiváltott gátló hatást a p53 transzkripciót aktiváló képességben és fehérje szintben befolyásolja a PHD domén jelenléte és természetesen a két fehérje kölcsönhatását megvalósító régió elvesztése is.

5.6.2. A PHD doménnel nem rendelkező hTAF3 gátolja a p53 és a p73 β transzkripciót aktiváló képességét.

A PHD domén funkciójának kiderítésére irányuló kísérletek elvégzése után, érdekesnek tartottuk megvizsgálni a PHD doménnel nem rendelkező humán TAF3 esetében, hogyan befolyásolja a p53 ill. a p73 α és p73 β transzkripciót aktiváló képességét.

Ezekhez a kísérletekhez az általunk részleges hosszúságúnak (400-680 aminosav) nevezett hTAF3 formát használtuk, amely nem tartalmazza a PHD domént, viszont tartalmazza azt a régiót (egér TAF3 497-608 aminosav) (Gangloff és mtsai, 2001), mely alacsony fokú hasonlóságot mutat a DmTAF3 középső régiójával, és felelős a Dmp53-mal való interakció kialakításáért. A humán TAF3 homológ ezen része erős konzerváltságot mutat (76,5%-os egyezés) az egér homológ megfelelő részével. Így elképzelhető, hogy az alkalmazott humán homológ tartalmazza a p53-mal való kölcsönhatás kialakításáért felelős régiót, mely transzkripció-faktor kötő doménként felelős lehet más, eddig még nem azonosított transzkripció faktorokkal történő interakció kialakításáért is. Ezért sem meglepő, hogy a hTAF3 C-terminális PHD finger doménjének hiánya ellenére is kimutatható a p53 transzkripciót aktiváló képességre kifejtett gátló hatás. Mivel ebben az esetben a TAF3 és a p53 közötti kölcsönhatásért felelős régió megléte dönti el, hogy érvényesül-e a TAF3 gátló hatása a p53 transzkripciót aktiváló képességén.

A p53 rokon fehérjék közül a p73 α esetében az mTAF3-nál tapasztalt eredménnyel megegyező hatást kaptunk, vagyis, hogy nincs hatása a transzkripciót aktiváló képességre. Ezzel szemben a p73 β esetében jelentős gátlást figyeltünk meg, szemben az egér TAF3-mal, ahol semmi hatást nem tapasztaltunk.

Elképzelhető, hogy a humán homológgal erősebb interakcióra képes a p73 β , mint az egér TAF3-mal, ezzel magyarázható, hogy csak erre a fehérjére van hatása. Ezt a lehetőséget mi nem vizsgáltuk, mivel nem állt rendelkezésünkre a teljes hosszúságú humán TAF3 homológ, szemben az egér TAF3-mal.

6. ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK

A Dmp53 kölcsönható partnereinek feltérképezése során számos kölcsönható partnert azonosítottunk, így pl. egy TBP-asszociált faktoral, a TAF3-mal való kölcsönhatását. Az izolált klónok összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a Dmp53-mal való kölcsönhatásért a DmTAF3 középső régiója felelős. Érdekes módon mások is ugyanezt a középső régiót találták kölcsönhatásban más transzkripciós faktorokkal, pl. a GAGA faktor, az Antennapedia és a BAB1/2 fehérjék esetében. Megállapítottuk, hogy a Dmp53 DNS-kötő doménje csak gyenge, míg C-terminális része erős kölcsönhatást képes kialakítani a DmTAF3-mal élesztő két-hibrid kísérletben. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a DmTAF3 többszörös kötőhelyeken keresztül képes kölcsönhatni a Dmp53-mal.

A kölcsönhatást tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy a TAF3 és a p53 közötti interakció evolúciósan konzervált, ugyanis erős interakciót találtunk a DmTAF3 és a humán p53 fehérje között is. Sőt a p53 rokon fehérjék (p73 α és p73 β) és a DmTAF3 között is megfigyeltünk interakciót, melyet *in vitro* más kísérletben is bizonyítottunk.

Továbbá kimutattuk, hogy a Dmp53 humán homológja és a humán p53 géncsalád másik két tagja, a p73 α és p73 β fehérjék is képesek kölcsönhatásba lépni a TAF3 fehérje *Drosophila* és egér homológjaival *in vitro* és *in vivo* is.

Sikerült tehát azonosítanunk a p53 fehérjének egy új kölcsönható partnerét, sőt megállapítottuk, hogy a létrejött kölcsönhatás evolúciósan konzervált.

A p53 és TAF3 közötti kölcsönhatás funkcionális következményének vizsgálata megmutatta, hogy az egér TAF3 specifikusan és drasztikusan gátolja a p53 transzkripciót aktiváló képességét, mely kis mértékben a p53 fehérje szintjének csökkenéséhez vezet, anélkül, hogy a p53 mRNS szintje megváltozna.

Az egér TAF3 nem volt hatással a p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességére, viszont endogén p53 jelenlétében a fehérje szintben okozott változást.

Mivel az általunk használt egér TAF3 homológ PHD doménjének funkciója még nem ismert, ezért megvizsgáltuk, vajon befolyásolja-e a PHD domén jelenléte a p53 transzkripciót aktiváló képességében és fehérje szintjében tapasztalt csökkenést. A PHD doménben pontmutáns ill. deléciós mutáns mTAF3-mal végzett kísérletek azt mutatták, hogy minél nagyobb rész hiányzott a PHD doménből, annál kevésbé volt képes kifejteni gátló hatását.

Azonban a PHD doménnel nem rendelkező humán TAF3 homológ képes volt gátolni a p53 transzkripciót aktiváló képességét, így elképzelhető, hogy sokkal inkább az interakcióért felelős régió megléte dönti el, hogy érvényesül-e a gátló hatás, nem feltétlenül a PHD domén megléte.

Összefoglalva, tehát elképzelhetőnek tartjuk, hogy a p53 és TAF3 fehérjék közötti kölcsönhatás a p53 módosítását eredményezi, melynek következtében a p53 transzkripciót aktiváló képessége és fehérje szintje lecsökken. A módosítások közül, mi az ubikvitináció lehetőségét vizsgáltuk meg, mely választásunkat a TAF3 C-terminális részén elhelyezkedő PHD domén is indokolta, hiszen e domén jelenlétét az irodalomban számos E3 ubikvitin ligáz aktivitással rendelkező fehérje esetében bizonyították. Egyértelműen azonban az *in vitro* és *in vivo* kísérletek sem támasztották alá, hogy a TAF3 rendelkezne E3 ubikvitin ligáz aktivitással a p53 fehérje esetében.

Ezért további célkitűzésnek tartjuk más módosítások lehetőségének vizsgálatát.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A daganatos megbetegedések a vezető halálokok közé tartoznak a fejlett társadalmakban. A legtöbb humán tumor esetében bebizonyították, a p53 tumor szuppresszor gén vagy a p53-as útvonal hibás működését.

A p53 egy transzkripciós faktor, amelynek kulcsszerepe van a szövetek integritásának fenntartásában a sejtek DNS-tartalmát ért sérülés esetén. A p53 tumor szuppresszor aktivitása annak köszönhető, hogy a DNS károsodás mértékétől függően beindítja a hiba kijavítását vagy súlyosabb esetben leállítja a sejtciklust és apoptózist indukál.

A p53 fehérje e fontos folyamatokban sokféle fehérjével kapcsolatba lépve tölti be funkcióját és ezeknek a kölcsönhatásoknak a felfedezése fontos alapkutatói célkitűzés, amelynek megvalósításán munkacsoportunk tagjai több éve dolgoznak. Érdekesnek tartottuk feltérképezni a p53 fehérje még nem azonosított kölcsönható partnereit, melyek valószínűleg valamilyen módon részt vesznek a p53-as útvonal egyes részeiben. E kölcsönhatások funkcionális következményeinek vizsgálata alapvetően hozzájárul a p53 finom működésének megértéséhez és ezáltal a humán daganatok kialakulásának megismeréséhez és terápiás eljárások kidolgozásához.

Kutatócsoportunk a Dmp53 kölcsönható partnereinek azonosítása céljából *Drosophila* embrionális cDNS könyvtár szűrését végezte el élesztő két-hibrid (Y2H) módszerrel. Ezekben az élesztő két-hibrid kísérletekben sikerült azonosítani a Dmp53 több lehetséges kölcsönható partnerét, melyek közül az én feladatom a DmTAF3-mal (más néven TAFII155/*bip2*: *Bric-a-Brac* kölcsönható fehérje), mely egy TBP (TATA box-kötő fehérje)-asszociált faktor kialakított kölcsönhatásának további funkcionális jellemzése volt. Munkám során célul tűztük ki a kölcsönható domének pontos meghatározását, illetve a kölcsönhatás evolúciós konzerváltságának tanulmányozását. Továbbá szeretnénk volna megvizsgálni az azonosított kölcsönható partner emlős homológjait. Végül az általunk kimutatott kölcsönhatás funkcionális következményének felderítése céljából meg akartuk vizsgálni a TAF3-nak a p53 és a p53 család tagjainak (p73 α és p73 β) transzkripciós aktivitására és fehérje szintjére gyakorolt hatását.

A kísérleteink eredményeit az alábbiakban foglalnám össze.

1. A p53 fehérje új kölcsönható partnere: a TAF3 fehérje

Az általunk izolált cDNS klónok közül az egyik (5-ös számú klón) a DmTAF3 514-924 aminosavait kódoló részt tartalmazta, míg a másik (11-es számú klón) a DmTAF3 738-1061 aminosavait kódolja. A két klón összehasonlítása arra utal, hogy a Dmp53-mal való kölcsönhatásért a DmTAF3 738 és 924 aminosavak közötti régió lehet felelős. A kölcsönhatásért felelős Dmp53 régió azonosítására a Dmp53 különböző régióinak a kölcsönhatását teszteltük az 5-ös számú DmTAF3 klónnal élesztő két-hibrid kísérletben. E kísérletekben azt találtuk, hogy a Dmp53 DNS-kötő doménje csak gyenge, míg C-terminális része erős kölcsönhatást mutatott a DmTAF3-mal. A Dmp53 C-terminális régiójával létrejövő kölcsönhatást tovább jellemezve megállapítottuk, hogy az oligomerizációs domén egyedül is erős interakciót váltott ki a DmTAF3 5-ös számú klónjával, azonban a szabályzó domén önmagában csak gyenge interakciót mutatott a DmTAF3-mal. Együttesen ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy a DmTAF3 többszörös kötőhelyeken keresztül képes kölcsönhatni a Dmp53-mal. A DmTAF3 és a Dmp53 közötti interakciót további *in vitro* rendszerben (pull down assay) is megerősítettük.

2. A TAF3 és a p53 géncsalád tagjai közötti interakció evolúciósan konzervált.

Érdekesnek tartottuk megvizsgálni, hogy a DmTAF3 képes-e kölcsönhatni a humán p53-mal is. Kísérleteink erős interakciót jeleztek a DmTAF3 és a humán p53 fehérje között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DmTAF3-mal való kölcsönhatásért felelős részek konzerváltak és a humán p53-ban valamint a Dmp53-ban egyaránt megvannak. A TAF3 egér homológja (mTAF3) és a p53 közötti kölcsönhatást *in vitro* és *in vivo* humán sejtekben is igazoltuk. Sőt még a humán p53 rokon fehérjék (p73 α és p73 β) mTAF3-mal való kölcsönhatását is sikerült bizonyítanunk élesztő két-hibrid kísérletben és *in vitro* kötési kísérletben is. Így kijelenthetjük, hogy a TAF3 és a p53, valamint a p53 rokon fehérjék közötti interakció evolúciósan konzervált.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy ezeknek a kölcsönhatásoknak mi lehet a funkcionális következménye, ezért megvizsgáltuk az mTAF3 hatását a p53, és a p73 α , p73 β fehérjék transzkripciót aktiváló képességére és fehérje szintjére.

3. Az mTAF3 csökkenti a p53 transzkripciót aktiváló képességét és fehérje szintjét.

Érdekes módon azt találtuk, hogy az mTAF3 drámaian lecsökkentette az endogén p53 transzkripciót aktiváló képességét U2OS sejtekben, viszont az exogén p53-ét csak fele akkora mértékben csökkentette.

Az egér TAF3-nak a p53 transzkripciót aktiváló képességére kifejtett hatásával megegyező eredményeket kaptunk a p53 fehérje szintjének vizsgálata során is. Hiszen az mTAF3 ha kisebb mértékben is, de csökkentette a p53 fehérje szintjét. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a fehérje szintjének csökkenése nem lehet önmagában magyarázat a p53 transzkripciót aktiváló hatásának csökkenésére. Nem találtunk változást a p53 mRNS szintjében az mTAF3 hatására. Ez azt mutatja, hogy az mTAF3 nem befolyásolja a p53 mRNS képződését és stabilitását. HeLa sejtekben az exogén p53 szint csökkenésének mértéke összehasonlítható volt a p53 transzkripció aktivitásának gátlásával.

Összességében tehát a kapott eredményekből arra következtettünk, hogy az mTAF3 képes gátolni a p53 transzkripciót aktiváló funkcióját, ezt kisebb mértékben a p53 fehérje szintjének csökkenésével éri el, anélkül, hogy a p53 mRNS szintjét megváltoztatná.

4. Az egér TAF3 nem befolyásolja a p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességét, viszont a fehérje szintjét igen.

A p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességére nem volt hatással az mTAF3 HeLa sejtekben, melyek csak nagyon kis mennyiségben ill. Saos2 sejtekben sem, melyek egyáltalán nem tartalmaznak endogén p53-t. Míg endogén p53 jelenlétében, U2OS sejtekben a p73 α fehérje szintje kismértékben csökkent, addig a p73 β fehérje szintje emelkedett az egér TAF3 hatására. Tehát más eredményt láttunk p53 jelenlétében és hiányában a p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességének és fehérje szintjének vonatkozásában.

5. A TAF3 PHD domén szerepének vizsgálata.

Működhet-e E3 ubikvitin ligázként az mTAF3?

A *Drosophila* és egér TAF3 fehérje felépítésére jellemző, hogy az N-terminális részén egy HFD, míg a C-terminális részen egy PHD domént tartalmaz. Érdekes, hogy a TAF3 homológok között nem egységes ezen domének előfordulása, hiszen az egér és *Drosophila* homológokkal szemben, ahol rendre kimutatható mindkét domén jelenléte, a humán TAF3 homológ esetében a PHD domén megléte kísérletesen nem bizonyított az általunk használt HeLa sejtvonalban.

Mivel a p53 és TAF3 között létrejövő kölcsönhatást a p53 részéről a C-terminális régió valósítja meg, így megvizsgáltuk, hogy a kölcsönhatás eredményeként tapasztalt csökkenő hatás, magyarázható-e a TAF3 általi p53 C-terminális módosításával. A p53 lehetséges módosításai közül az ubikvitináció lehetőségét vizsgáltuk meg, mely választásunkat az mTAF3 fehérje domén felépítése is jogosan indokolta, mivel az irodalomban számos megjelent publikáció bizonyítja a PHD doménnel rendelkező fehérjék E3 ubikvitin ligáz aktivitásának meglétét.

Így érdekesnek tartottuk megvizsgálni, vajon az mTAF3 PHD doménjének jelenléte szerepet játszhat-e a p53 fehérje lebontásában. Ezt a kérdést *in vitro* és *in vivo* ubikvitinációs kísérletben is megvizsgáltuk. Azonban ezek a kísérletek nem adtak egyértelmű választ, nem bizonyították az mTAF3 E3 ubikvitin ligáz funkcióját.

6. A PHD doménben mutáns mTAF3 nem képes gátolni a p53 transzkripciót aktiváló képességét.

A PHD domén szerepének további vizsgálatára PHD doménben pontmutáns (H893A) ill. deléciós mutáns (K620Stop, V849Stop) egér TAF3-ak hatását vizsgáltuk meg a p53 transzkripciót aktiváló képességére. A H893A pontmutáns esetében, ahol a mutáció a Cys4-His-Cys3 Zn²⁺-finger típusú PHD domén központi szereppel bíró hisztidinjét érinti, közel azonos hatást tapasztaltunk a p53 transzkripciót aktiváló képességére, mint a V849Stop deléciós mutáns esetében, ahol a teljes egér PHD domén hiányzik. A vad típusú egér TAF3-mal ellentétben, mely drámai csökkenést váltott ki a p53 transzkripciót aktiváló képességében, addig a mutánsok esetében, minél nagyobb része hiányzott az mTAF3 fehérjének ill. a PHD doménnek, annál kevésbé volt képes kiváltani gátló hatását.

Elképzelhető, hogy nem feltétlenül a PHD domén jelenléte, hanem a p53-mal való kölcsönhatásért felelős régió elvesztése is hozzájárul ahhoz, hogy a deléciós mTAF3 származékok nem tudják kiváltani a transzkripciót aktiváló képesség drámai csökkenését.

7. A PHD doménben mutáns mTAF3 nem csökkenti a p53 fehérje szintjét.

Megvizsgáltuk a PHD doménben mutáns egér TAF3-ak hatását a p53 fehérje szintjére is. A kísérlet a várakozásunknak megfelelő eredményt adta, hiszen a vad típusú mTAF3 ismét csökkentette, ha kismértékben is a p53 fehérje szintjét, viszont a PHD doménben mutáns egér TAF3-ak semmilyen hatással nem voltak a p53 fehérje szintjére.

8. A PHD doménnel nem rendelkező hTAF3 is gátolja a p53 és rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességét.

A TAF3 humán homológja esetében, mint korábban említettem, eddig nem sikerült kísérletesen bizonyítani a PHD domén jelenlétét a fehérje C-terminális részén az általunk alkalmazott HeLa sejtvonalban. Ezért megvizsgáltuk, hogy vajon a PHD domén hiánya változtat-e valamit az eddig kapott eredményekben a p53 ill. p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességén. A p53 rokon fehérjék közül a p73 α esetében az mTAF3-nál tapasztalt eredménnyel megegyező hatást kaptunk, vagyis, hogy nincs hatása a transzkripciót aktiváló képességre. Ezzel szemben a p73 β esetében csak a hTAF3 esetében tapasztaltunk gátló hatást a transzkripciót aktiváló képességben, az mTAF3-nak nem volt hatása. A p53 esetében megmaradt a PHD doméntől függetlenül is a transzkripciót aktiváló képesség csökkenése.

Elképzelhetőnek tartjuk, hogy sokkal inkább az mTAF3 és a p53 közötti kölcsönhatásért felelős régió megléte dönti el, hogy érvényesül-e az mTAF3 gátló hatása a p53 transzkripciót aktiváló képességén.

8. SUMMARY

The cancerous disorders rank among leader death reason in the developed society. In most human tumours the p53 tumour suppressor gene is mutated or the p53 pathway is deficient. The p53 is a transcription factor which has versatile roles in genome protection after DNA damage. The p53 plays its tumour suppressor role by promoting cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis depending on the degree of abberation. The p53 protein execites its functions in these processes in interaction with numerous other proteins and the exploration of these interactions is an important task, on which members of our group began to work several years ago. The investigation of functional consequence of interactions contribute to detailed analysis of the functions of p53 and identification of its target genes may lead to a better understanding of tumor formation and development of cancer therapies.

Recently we identified DmTAF3 (TAFII155/bip2: Bric-a-Brac interacting protein 2) in yeast two hybrid experiments (Y2H) as a *Drosophila melanogaster* p53 (Dmp53) interacting partner. TAF3 is a TBP (TATA box-binding protein)-associated factor (TAF). My project was the further characterization p53 and TAF3 interaction.

My goals were to determine the exact interacting domains of both partners, and to examine whether the interaction between p53 and its partner is evolutionary conserved. Furthermore, I intended to investigate the mammalian homologues of the identified interacting partner. Finally, in order to find out the functional consequences of the detected interaction I wanted to determine the effect of TAF3 on the transcriptional activity and on the protein level of p53 as well as of the p53 family members (p73 α and p73 β).

The results of our expreiments are summarized here.

1. The TAF3 protein is a new interacting partner of p53 protein.

Between our identified cDNA clones one was (5# clone) contained the coding region for the 514-924 amino acids of DmTAF3. Another one (11# clone) encoded amino acids 738-1061 of DmTAF3. By comparing of two clones we concluded that the region which is responsible for Dmp53 interaction must lie between amino acids 738-924 of DmTAF3. To identify the region responsible for interaction we tested the different parts of Dmp53 with the 5# identified DmTAF3 clone in Y2H experiment.

We found that the DNA-binding domain of Dmp53 showed only a weak, but the C-terminal part showed a very strong interaction with DmTAF3. Further examination of the interaction with C-terminal region of Dmp53 showed that the oligomerization domain alone was able to interact strongly with DmTAF3 5# clone. However, the regulatory domain alone showed only a weak interaction with DmTAF3. These results indicate that DmTAF3 is able to interact with Dmp53 through multiple binding sites. We confirmed the interaction between DmTAF3 and Dmp53 also *in vitro* system (pull down assay).

2. The interaction between TAF3 and p53 family members is evolutionarily conserved.

Next we examined, if the DmTAF3 interacts with human p53 as well. Our experiments showed a very strong interaction between DmTAF3 and p53 proteins. So the regions responsible for interaction with DmTAF3 are conserved and present in both human and Dmp53. Furthermore, we detected and verified the interaction between mouse TAF3 (mTAF3) and p53 by *in vitro* assays and *in vivo* in human cells as well. Similarly, we could confirm interaction between p73 α and p73 β and mTAF3 both by Y2H and *in vitro* binding assay. Based on these data we concluded that the interaction between TAF3 and p53 is evolutionarily conserved.

Next, we asked that, what is the functional consequence of this interaction. In order to answer this question we studied the effect of mTAF3 on the transcriptional activity of p53, p73 α and p73 β proteins.

3. mTAF3 decreases the transcriptional activity and protein level of p53.

Using transient reporter gene assay we found that mTAF3 decreased dramatically the transcriptional activity of endogen p53 in U2OS cells. The activity of an exogen p53, synthesised from a transfected template was affected by TAF3 to a much lesser extent.

Overexpression of mTAF3 resulted in a small decrease in the p53 protein level. The results suggest that the decrease of protein level cannot be responsible for the observed reduction of p53 transcriptional activity. Further we could not find any change in the p53 mRNA level after mTAF3 overexpression. Therefore we conclude that mTAF3 does not to influence the synthesis or the stability of p53 mRNA. In HeLa cells the degree of decrease in exogen p53 protein level was comparable to the inhibition of p53 transcriptional activity.

In summary, based on these results we concluded that the mTAF3 is able to inhibit the transcriptional activity of p53, and, in a lesser extent reduces the p53 protein level, without any change in p53 mRNA level.

4. mTAF3 does not influence the transcriptional activity of p53 related proteins but alters their protein level.

The mTAF3 could not influence the transcriptional activity of p53 related proteins either in HeLa cells which contain only a low level of endogenous p53 or in Saos2 cells which do not contain any endogenous p53. But in the presence of endogenous p53 in U2OS cells we found that the protein level of p73 α decreased and that of p73 β increased owing to mouse TAF3. Consequently we got different results in the presence or absence of p53 on the transcriptional activity and protein level of p53 related proteins.

5. The role of mTAF3 PHD domain.

Could the mTAF3 function as an E3 ubiquitin ligase?

Both the *Drosophila* and mouse TAF3 proteins contain a HFD domain in the N-terminal part and a PHD domain in the C-terminal region. Interestingly, these domains are not uniformly conserved between TAF3 homologues, because in contrast of the mouse and *Drosophila* homologues, in the human homologue the presence of PHD domain has been not verified experimentally. Furthermore, more research groups reported on the failure of amplification of full form human TAF3 in HeLa cells.

Because of the C-terminal region of p53 protein is responsible for the interaction between p53 and TAF3, therefore we investigated if the inhibitory effect is explained with the C-terminal modification of p53 by TAF3. We examined the ubiquitination from between possible modifications of p53, because of domain structure of mTAF3 protein and several papers reported on the E3 ubiquitin ligase activity of PHD domain containing proteins.

Therefore we wanted to know, if the PHD domain of mTAF3 could play a role in the degradation of p53. We examined this question by *in vitro* and *in vivo* ubiquitination assays. These experiments, however, could not verify unambiguously the E3 ubiquitin ligase activity of TAF3.

6. The PHD domain-mutant mTAF3 does not inhibit the transcriptional activity of p53.

To examine further the possible role of PHD domain, we investigated the effect of PHD domain-pointmutant (H893A) and PHD deletion-mutants (K620Stop, V849Stop) mTAF3 on the transcriptional activity of p53. In the case of H893A pointmutant, where the mutation is the central histidine of the Cys4-His-Cys3 Zn²⁺-finger type PHD domain, the effect is the same than in the case of V849Stop deletion-mutant, which lacks the full PHD domain.

We found that in contrast to the wild type mTAF3, which dramatically decreased the transcriptional activity of p53, the mutants were not able to induce the inhibitory effect. This loss of the inhibitory effect correlated with the size of the missing sequence of the mTAF3 protein and PHD domain.

So it is conceivable, that not the presence of the PHD domain, rather the loss of the p53 interacting region of TAF3 cause the disappearance of the inhibitory effect on transcriptional activity.

7. The PHD domain-mutant mTAF3 does not affect the protein level of p53.

We examined the effect of the PHD domain-mutants mTAF3 on the protein level of p53. As expected, we found that the wild type mTAF3 decreased slightly the p53 protein level, but the PHD domain-mutant mTAF3 had no effect on the p53 content.

8. The hTAF3 which does not contain PHD domain inhibits the transcriptional activity of p53 and of p53 related proteins.

The presence of the PHD domain in the C-terminal part of the hTAF3 protein was not confirmed so far in HeLa cells. This offered the possibility to test whether in the absence of PHD domain TAF3 is able to cause any change on the transcriptional activity of p53 and of p53 related proteins. We found that the p73 α was affected by hTAF3 similarly as with mTAF3, such as no effect on the transcriptional activity was detected. However, p73 β was decreased only by the human homologue but not by mouse TAF3. In the case of p53 the decreased transcriptional activity was maintained independently of the PHD domain. It is possible, that the presence or absence of the TAF3-p53 interaction region will determine whether the inhibitory effect of TAF3 on p53 transcriptional activity is manifested or not.

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek Dr. Boros Imrének és Dr. Bálint Évának, hogy bizalmukkal, szakmai és baráti tanácsaikkal segítették munkámat és lehetővé tették, hogy a Biokémia és Molekuláris Biológia tanszéken kezdhessem meg PhD tanulmányaimat.

Külön köszönöm Nagy Enikőnek az önzetlen segítségét, melyre bármikor számíthattam, valamint a szakmai és baráti beszélgetéseket.

Köszönöm kooperációs partnereink, különösen Dr. Tora László áldozatkész együttműködését és biztató szakmai tanácsait. Köszönettel tartozom Dr. Nagy Zitának az in vivo ko-immunprecipitációs kísérletben nyújtott segítségéért.

Az asszisztensek közül külön köszönöm Ökrös Gyuláné „Kis” Katinak a rengeteg szakmai és baráti segítségét, melyre bármikor számíthattam. Köszönöm Dr. Tubak Vilmosnak az együtt végzett munkában nyújtott segítségét és szakmai biztatását.

Köszönöm a tanszék összes dolgozójának, hogy olyan légkört teremtettek számomra, melyben jól éreztem magam és jól végezhettem munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban legnagyobb köszönettel családomnak és férjemnek, Bálintnak tartozom, akik mindvégig támogattak elképzeléseimben és segítették azok megvalósulását.

10. HÍVATKOZÁSOK

Aasland, R., Gibson, T. J., and Stewart, A. F. (1995). The PHD finger: Implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 20, 56–59.

Albert TK, Hanzawa H, Legtenberg YI, de Ruwe MJ, van den Heuvel FA, Collart MA, Boelens R, Timmers HT. (2002). Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *EMBO J.* 21(3), 355-364.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell.* (6) How the cells read the genome: from DNA to protein. Taylor, GS. and Group, F. 4th edition.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389-3402.

Aoyagi, N., and D. A. Wassarman. (2000). Genes encoding *Drosophila melanogaster* RNA polymerase II general transcription factors: diversity in TFIIA and TFIID components contributes to gene-specific transcriptional regulation. *J. Cell Biol.* 150, F45–F50.

Aravind, L; Iyer, LM; Koonin, EV. (2003). Scores of RINGS but no PHDs in ubiquitin signaling. *Cell Cycle.* 2, 123–126.

Argentini M, Barboule N, Wasyluk B. (2001). The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability. *Oncogene.* 20, 1267-1275.

Asher, G., and Shaul, Y. (2005). p53 proteasomal degradation: poly-ubiquitination is not the whole story. *Cell Cycle.* 4, 1015-1018.

Balint, E., S. Bates., and K. H. Vousden. (1999). Mdm2 binds p73 α without targeting degradation. *Oncogene.* 18, 3923-3929.

Barak, Y., T. Juven, R. Haffner, and M. Oren. (1993). Mdm-2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12, 461-468.

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

Bereczki O, Ujfaludi Z, Pardi N, Nagy Z, Tora L, Boros IM, Balint E. *BMC Mol Biol.* (2008). TATA binding protein associated factor 3 (TAF3) interacts with p53 and inhibits its function. 9:57.

Biggin, M.D., Tjian, R. (1988). Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell.* 53, 699–711.

- Bodai, L; Pardi, N; Ujfaludi, Z; **Bereczki, O**; Komonyi, O; Balint, E; Boros, IM. (2007). Daxx-like protein of *Drosophila* interacts with Dmp53 and affects longevity and Ark mRNA level. *J Biol Chem.* 282, 36386–36393.
- Borden, K.L., and Freemont, P.S. (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 395–401.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–254.
- Breeden L, Nasmyth K. (1985). Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 50, 643-650.
- Brodsky, M. H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M. & Abrams, J. M. *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. (2000) *Cell* 101, 103–113.
- Brooks, C.L., Gu, W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 164–171.
- Brooks, C.L., Gu, W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell.* 21(3), 307–315. Review.
- Brown, M. A., R. J. Sims III, P. D. Gottlieb, and P. W. Tucker. (2006). Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol. Cancer.* 5:26.
- Burger AM, Seth AK. (2004). The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer.* 40(15), 2217-2229. Review.
- Buratowski S, Hahn S, Guarente L, Sharp PA. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell.* 56, 549–561.
- Burke, T. W., and J. T. Kadonaga. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11, 3020–3031.
- Buschmann, T; Lin, Y; Aithmitti, N; Fuchs, SY; Lu, H; Resnick-Silverman, L; Manfredi, JJ; Ronai, Z; Wu, X. (2001). Stabilization and activation of p53 by the coactivator protein TAFII31. *J Biol Chem.* 276, 13852–13857.
- Chalkley, G. E., and C. P. Verrijzer. (1999). DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAFII250-TAFII150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* 18, 4835–4845.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T. D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 14, 278-288.

- Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S., and Halazonetis, T. D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13777-13782.
- Chen P, Nordstrom W, Gish B and Abrams JM. (1996). Grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10, 1773-1782.
- Chen, Z., and J. L. Manley. (2000). Robust mRNA transcription in chicken DT40 cells depleted of TAFII31 suggests both functional degeneracy and evolutionary divergence. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5064–5076.
- Chen, Z., and J. L. Manley. (2003). In vivo functional analysis of the histone 3-like TAF9 and a TAF9-related factor, TAF9L. *J. Biol. Chem.* 278, 35172– 35183.
- Chen, X., G. Farmer, H. Zhu, R. Prywes, and C. Prives. (1993). Cooperative DNA binding of p53 with TFIID (TBP): a possible mechanism for transcriptional activation. *Genes Dev.* 7, 1837–1849.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 265, 346–355.
- Chopra, VS; Srinivasan, A; Kumar, RP; Mishra, K; Basquin, D; Docquier, M; Seum, C; Pauli, D; Mishra, RK. *Dev Biol.* (2008). Transcriptional activation by GAGA factor is through its direct interaction with dmTAF3. *Dev. Biol.* 317(2), 660-670.
- Chuikov, S., Kurash, J.K., Wilson, J.R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G.S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gamblin, S.J., et al. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*. 432, 353–360.
- Chumakov PM. (2007). Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry*. 72(13), 1399-1421. Review.
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasoma pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17, 7151-7160.
- Cuddihy AR, Li SY, Tam NWN, Wong AHT, Taya Y, Abraham N, Bell JC, and Koromilas AE (1999a). The double-stranded RNA activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2475-2484.
- Cuddihy AR, Wong AHT, Tam NWN, Li SY, and Koromilas AE (1999b). The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene*. 18, 2690-2702.
- Deato, MD; Tjian, R. (2007). Switching of the core transcription machinery during myogenesis. *Genes Dev.* 21, 2137–2149.
- De Graaf P, Little NA, Ramos YF, Meulmeester E, Letteboer SJ, Jochemsen AG., Hdmx protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of Mdm2. (2003). *J Biol Chem.* 278(40), 38315-38324.

- De Rozières, S., R. Maya, M. Oren, and G. Lozano. (2000). The loss of mdm2 induces p53 mediated apoptosis. *Oncogene* 19, 1691-1697.
- Deweindt, C., Albagli, O., Bernardin, F., Dhordain, P., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J. P., and Leprince, D. (1995). The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: A novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain. *Cell Growth Differ.* 6, 1495– 1503.
- DiBello, P., Withers, D., Bayer, C., Fristrom, J., and Guild, G. (1991). The Drosophila Broad-complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics.* 129, 385–397.
- Di Como, C. J., Gaiddon, C. & Prives, C. (1999). p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1438–1449.
- Dikstein, R., Ruppert, S., and Tjian, R. (1996). TAFII250 is a protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74. *Cell.* 84, 781–790.
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koepfen, H., and Dixit, V.M. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature.* 429, 86–92.
- Dulic, V; Kaufmann, WK; Wilson, SJ; Tlsty, TD; Lees, E; Harper, JW; Elledge, SJ; Reed, SI. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell.* 76, 1013–1023.
- Durell, S. R., Sarma, R. H., Sarma, M.H. (2001). P53 function: a sidebar. *Cancer Watch.* 10(12).
- Farmer, G; Colgan, J; Nakatani, Y; Manley, JL; Prives, C. (1996). Functional interaction between p53, the TATA-binding protein (TBP), and TBP-associated factors in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4295–4304.
- Flores, ER; Tsai, KY; Crowley, D; Sengupta, S; Yang, A; McKeon, F; Jacks, T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature.* 416, 560–564.
- Frontini M, Soutoglou E, Argentini M, Bole-Feysot C, Jost B, Scheer E, Tora L. (2005). TAF9b (formerly TAF9L) is a bona fide TAF that has unique and overlapping roles with TAF9. *Mol. Cell Biol.* 25(11), 4638-4649.
- Fuchs, SY; Adler, V; Buschmann, T; Wu, XW; Ronai, Z. (1998). Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene.* 17, 2543–2547.
- Fu LN, Minden MD, and Benchimol S. (1996). Translational regulation of human p53 gene expression. *EMBO J.* 15, 4392-4401.
- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T. & Prives, C. (2001). A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1874–1887.

- Gangloff, Y.G., Pointud, J.C., Thuault, S., Carre, L., Romier, C., Muratoglu, S., Brand, M., Tora, L., Couderc, J.L., Davidson, I. (2001). The TFIID components human TAF(II)140 and *Drosophila* BIP2 (TAF(II)155) are novel metazoan homologues of yeast TAF(II)47 containing a histone fold and a PHD finger. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5109–5121.
- Georgieva, S., D. B. Kirschner, T. Jagla, E. Nabirochkina, S. Hanke, H. Schenkel, C. de Lorenzo, P. Sinha, K. Jagla, B. Mechler, and L. Tora. (2000). Two novel *Drosophila* TAFIIs have homology with human TAFII30 and are differentially regulated during development. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1639–1648.
- Green, M. R. (2000). TBP-associated factors (TAFIIs): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem. Sci.* 25, 59–63.
- Gu W, and Roeder RG. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell.* 90, 595-606.
- Hamard PJ, Dalbies-Tran R, Hauss C, Davidson I, Kedinger C, Chatton B. (2005). A functional interaction between ATF7 and TAF12 that is modulated by TAF4. *Oncogene.* 24(21), 3472-3483.
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., and Nakayama, K.I. (2001). U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.* 276, 33111–33120.
- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet.* 39(3), 311-318.
- Hernandez-Hernandez, A., and A. Ferrus. (2001). Prodos is a conserved transcriptional regulator that interacts with dTAF(II)16 in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 614–623.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 761-807.
- Hiller, M. A., T. Y. Lin, C. Wood, and M. T. Fuller. (2001). Developmental regulation of transcription by a tissue-specific TAF homolog. *Genes Dev.* 15, 1021–1030.
- Huang, J., L. Perez-Burgos, B. J. Placek, R. Sengupta, M. Richter, J. A. Dorsey, S. Kubicek, S. Opravil, T. Jenuwein, and S. L. Berger. (2006). Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature.* 444, 629-632.
- Honda R, Yasuda H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene.* 19, 1473-1476.
- Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J.W., Gu, W., Cohen, R.E., and Shi, Y. (2002). Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell.* 111, 1041–1054.

- Izpisua-Belmonte, J. C., Tickle, C., Dollé, P., Wolpert, L. and Duboule, D. (1991). Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development. *Nature*. 350, 585-589.
- Jeffrey, P. D., Gorina, S. & Pavletich, N. P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267, 1498–1502.
- Jessenberger V, Jentsch S. (2002). Deadly encounter ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol. Cell. Biol.* 3(2), 112-121.
- Jin, S; Martinek, S; Joo, WS; Wortman, JR; Mirkovic, N; Sali, A; Yandell, MD; Pavletich, NP; Young, MW; Levine, AJ. (2000). Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 7301–7306.
- Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*. 71, 587–597.
- Kim J, Daniel J, Espejo A, Lake A, Krishna M, Xia L, Zhang Y, Bedford MT. (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep.* 7(4), 397-403.
- Ko, LJ; Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10, 1054–1072.
- Kramer, A., R. Haars, R. Kabisch, H. Will, F. A. Bautz, and E. K. Bautz. (1980). Monoclonal antibody directed against RNA polymerase II of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 180, 193–199.
- Kussie, P. H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A. J. & Pavletich, N. P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 274, 948–953.
- Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R., and Benchimol, S. (2003). Pirh2, a p53- induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell*. 112, 779–791.
- Levine, A. J., Perry, M. E., Chang, A., Silver, A., Dittmer, D., Wu, M. & Welsh, D. (1994). The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br. J. Cancer.* 69, 409–416.
- Leurent, C.; Sanders, S.L.; Demeny, M.A.; Garbett, K.A.; Ruhlmann, C.; Weil, P.A.; Tora, L.; Schultz, P. (2004). Mapping key functional sites within yeast TFIID. *EMBO J.* 23, 719–727.
- Leurent, C., Sanders, S., Ruhlmann, C., Mallouh, V., Weil, P.A., Kirschner, D.B., Tora, L., Schultz, P. (2002). Mapping histone fold TAFs within yeast TFIID. *EMBOJ.* 13, 3424-33.
- Léveillard T, Wasylyk B. (1997). The Mdm2 C-terminal region binds TAFII250 and is required for Mdm2 regulation of the cyclin A promoter. *J Biol Chem.* 272, 30651-30661.

- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 276, 565-570.
- Li, HH; Li, AG; Sheppard, HM; Liu, X. (2004). Phosphorylation on Thr-55 by TAF1 mediates degradation of p53: a role for TAF1 in cell G1 progression. *Mol Cell*. 13, 867-878.
- Linder, B., Newman, R., Jones, L. K., Debernardi, S., Young, B. D., Freemont, P., Verrijzer, C. P., and Saha, V. (2000). Biochemical analyses of the AF10 protein: The extended LAP/PHD-finger mediates oligomerisation. *J. Mol. Biol.* 299, 369-378.
- Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, and Berger SL (1999). P53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1202-1209.
- Ljungman, M. (1999). Repair of radiation-induced DNA strand breaks does not occur preferentially in transcriptionally active DNA. *Radiat Res.* 152, 444-449.
- Ljungman, M. (2000). Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia*. 2, 208-225. Review
- Ljungman, M; Zhang, FF; Chen, F; Rainbow, AJ; McKay, BC. (1999). Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene*. 18, 583-592.
- Lu, H., and A. J. Levine. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 5154-5158.
- Lu, X; Lane, DP. (1993). Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation defects in chromosome instability syndromes? *Cell*. 75, 765-778.
- Luke MM, O'Meara ES, Rowland CM, Shiffman D, Bare LA, Arellano AR, Longstreth WT Jr, Lumley T, Rice K, Tracy RP, Devlin JJ, Psaty BM. (2009). Gene variants associated with ischemic stroke: the cardiovascular health study. *Stroke*. 40(2), 363-368.
- Luo, J., M. Li, Y. Tang, M. Laszkowska, R. G. Roeder, and W. Gu. (2004). Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 2259-2264.
- Martinez, E. (2002). Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol. Biol.* 50, 925-947.
- Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*. 282, 1893-1897.
- McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A. and Gehring, W. J. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-408.
- Melino, G., De Laurenzi, V. and Vousden, K.H. (2002). P73: friend or foe in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2, 605-615.

Metzger, D., E. Scheer, A. Soldatov, and L. Tora. (1999). Mammalian TAFII30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes. *EMBO J.* 18, 4823–4834.

Midgley CA, Desterro JM, Saville MK, Howard S, Sparks A, Hay RT, Lane DP. (2000). An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene.* 19, 2312-2323.

Midgley, CA; Lane, DP. (1997). p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene.* 15, 1179–1189.

Mizzen, C., Yang, X.-J., Kokubo, T., Brownell, J., Bannister, A., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S., Kouzarides, T. et al. (1996). The TAFII250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell.* 87, 1261–1270.

Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol.* 17(6), 631-636.

Momand, J., G. P. Zambetti, D. L., George, and A. J. Levine. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 69, 1237-1245.

Muratoglu, S., S. Georgieva, G. Papai, E. Scheer, I. Enunlu, O. Komonyi, I. Cserpan, L. Lebedeva, E. Nabirochkina, A. Udvardy, L. Tora, and I. Boros. (2003). Two different *Drosophila* ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Mol. Cell. Biol.* 23, 306–321.

Murray-Zmijewski, DP Lane and J-C Bourdon. (2006). P53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death and Differentiation.* 13, 962-972. Review.

Pascual, J., M. Martinez-Yamout, H. J. Dyson, and P. E. Wright. (2000). Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren syndrome transcription factor. *J. Mol. Biol.* 304, 723–729.

Pham, A., and Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* 289, 2357–2360.

Picksley SM, Vojtesek B, Sparks A and Lane DP. (1994). Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene.* 9, 2523-2539.

Pise-Masison, C; Radonovich, M; Sakaguchi, K; Appella, E; Brady, J. (1998). Phosphorylation of p53: a novel pathway for p53 inactivation in human T-cell lymphotropic virus type 1-transformed cells. *J Virol.* 72, 6348–6355.

Pointud, J.C., Larsson, J., Dastugue, B., Couderc, J.L. (2001). The BTB/POZ domain of the regulatory proteins Bric a brac 1 (BAB1) and Bric a brac 2 (BAB2) interacts with the novel *Drosophila* TAF(II) factor BIP2/dTAF(II) 155. *Dev. Biol.* 237, 368–380.

- Pownall, M.E., Gustafsson, M.K., and Emerson Jr., C.P. (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 747–783.
- Prince, F; Katsuyama, T; Oshima, Y; Plaza, S; Resendez-Perez, D; Berry, M; Kurata, S; Gehring, WJ. (2008). The YPWM motif links *Antennapedia* to the basal transcriptional machinery. *Development.* 135, 1669–1679.
- Rechsteiner, M. & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267–271.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., and Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J.* 18, 6455-6461.
- Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T. & Levine, A. J. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.* 17, 554–564.
- Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell.* 25(1), 15-30.
- Saha, V., Chaplin, T., Gregorini, A., Ayton, P., and Young, B. D. (1995). The leukemia-associated-protein (LAP) domain, a cystein-rich motif, is present in a wide range of proteins, including MLL, AF10, and MLLT6 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 9737–9741.
- Saito, S., H. Yamaguchi, Y. Higashimoto, C. Chao, Y. Xu, A. J. Fornace, Jr., E. Appella, and C. W. Anderson. (2003). Phosphorylation site interdependence of human p53 posttranslational modifications in response to stress. *J Biol Chem.* 278(39), 37536-37544.
- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, and Appella E (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.* 12, 2831-2841.
- Sakaguchi, K., H. Sakamoto, D. Xie, J. W. Erickson, M. S. Lewis, C. W. Anderson, and E. Appella. (1997). Effect of phosphorylation on tetramerization of the tumor suppressor protein p53. *J. Protein Chem.* 16, 553-556.
- Sanders SL, Garbett KA, Weil PA. (2002). Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* TFIID. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6000–6013.
- Sanders, S.L. and Weil, P.A. (2000). Identification of two novel TAF subunits of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* TFIID complex. *J. Biol. Chem.* 275, 13895–13900.
- Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.* 59, 4375-4382.

- Scheel, H; Hofmann, K. (2003). No evidence for PHD fingers as ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 13, 285–287; author reply 287-288.
- Schindler, U. et al. (1993). HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *Plant J.* 4, 137–150.
- Sekiguchi, T., Nohiro, Y., Nakamura, Y., Hisamoto, N., and Nishi-Critchfield, (1991). The human CCG1 gene, essential for progression of the G1 phase, encodes a 210-kilodalton nuclear DNA-binding. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3317–3325.
- Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (2004). Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J. Clin. Invest.* 113, 160–168.
- Shirangi, T.R., Zaika, A., and Moll, U.M. (2002). Nuclear degradation of p53 occurs during down-regulation of the p53 response after DNA damage. *FASEB J.* 16, 420–422.
- Sionov, R; Haupt, Y. (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene.* 18, 6145–6157.
- Soutoglou, E; Demeny, MA; Scheer, E; Fienga, G; Sassone-Corsi, P; Tora, L.(2005). The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain-containing interaction partners. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4092–4104.
- Stommel, J. M., N. D. Marchenko, G. S. Jimenez, U. M. Moll, T. J. Hope, and G. M. Wahl. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 18(6), 1660-1672.
- Thut, C., J. L. Chen, R. Klemm, and R. Tjian. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science.* 267, 100– 104.
- Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., Sarkaria, J. N., Cliby, W. A., Shieh, S. Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R. T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 13, 152-157.
- Tora L. (2002). A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 16, 673–675.
- Trynka G, Zhernakova A, Romanos J, Franke L, Hunt KA, Turner G, Bruinenberg M, Heap GA, Platteel M, Ryan AW, de Kovel C, Holmes GK, Howdle PD, Walters JR, Sanders DS, Mulder CJ, Mearin ML, Verbeek WH, Trimble V, Stevens FM, Kelleher D, Barisani D, Bardella MT, McManus R, van Heel DA, Wijmenga C. (2009). Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut.* 58(8), 1078-1083.
- Tsukiyama, T., Becker, P.B., Wu, C. (1994). ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature.* 367, 525–532.
- Ujfaludi Z, Boros IM, Bálint E. (2007). Different sets of genes are activated by p53 upon UV or ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. *Acta Biol Hung.* 58 Suppl:65-79.

- Vaquero, A., Espinas, M.L., Azorin, F., Bernues, J. (2000). Functional mapping of the GAGA factor assigns its transcriptional activity to the C-terminal glutamine-rich domain. *J. Biol. Chem.* 275, 19461–19468.
- Vermeulen, M; Mulder, KW; Denissov, S; Pijnappel, WW; van Schaik, FM; Varier, RA; Baltissen, MP; Stunnenberg, HG; Mann, M; Timmers, HT. (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell.* 131, 58–69.
- Verrijzer, C. P., K. Yokomori, J. L. Chen, and R. Tjian. (1994). *Drosophila* TAFII150: similarity to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science.* 264, 933–941.
- Vousden, K. H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer.* 2(8), 594-604. Review.
- Walker, A. K., J. H. Rothman, Y. Shi, and T. K. Blackwell. (2001). Distinct requirements for *C. elegans* TAF(II)s in early embryonic transcription. *EMBO J.* 20, 5269–5279.
- Walker, A. K., and T. K. Blackwell. (2003). A broad but restricted requirement for TAF-5 (human TAFII100) for embryonic transcription in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 278, 6181–6186.
- Xirodimas, D. P., Saville, M. K., Bourdon, J. C., Hay, R. T., and Lane, D. P. (2004). Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell.* 118, 83-97.
- Yamaguchi, M., Hirose, F., Inoue, Y. H., Shiraki, M., Hayashi, Y., Nishi, Y. & Matsukage, A. (1999). Ectopic expression of human p53 inhibits entry into S phase and induces apoptosis in the *Drosophila* eye imaginal disc. *Oncogene* 18, 6767–6775.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D and McKeon F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell.* 2, 305–316.
- Zollman, S., Godt, D., Prive', G., Couderc, J. L., and Laski, F. (1994). The BTB domain, primarily found in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 10717–10721.

