

**A humán P53 fehérje transzkripció
elongációban betöltött, eddig nem azonosított
szerepének jellemzése**

Borsos Barbara Nikolett

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Témavezetők:

Prof. Dr. Boros Imre Miklós
tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Pankotai Tibor
tudományos munkatárs

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged
2017

Bevezetés

Eukarióta sejtekben az RNS polimeráz II (RNSPII) felelős a fehérjéket kódoló gének és számos kis sejtmagi RNS átírásáért. Az enzim legnagyobb alegységének, az RPB1-nek, a karboxi terminális doménje (CTD) az egész élővilágban jól konzervált, egy Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser heptapeptid ismétlődéseiből áll. A heptapeptid szerin és treonin aminosavainak foszforilációs állapota kináz és foszfatáz enzimek működésének eredményeként dinamikusan változik a transzkripció folyamán, és jelzésként szolgál a transzkripcióval járó változatos folyamatokhoz. Iniciációkor a TFIIH komplex CDK-7 alegysége az RPB1 CTD heptapeptidek 5. szerin (S5) aminosavait foszforilálja, az elongáció kezdeti fázisában pedig a P-TEFb komplex CDK-9 alegysége foszforilálja a 2. pozícióban levő szerineket (S2).

Az UV által indukált transzkripció blokkkal járó DNS károsodások javításában a NER (nucleotid excision repair) egyik útvonala, a TC-NER (transcription-coupled NER) vesz részt. Ezen túlmenően a transzkripció blokka az RPB1 poli-ubiquitiláció által közvetített degradációját is eredményezheti. Az RNSPII DNS-ről történő eltávolítása lehetővé teszi a TC-NER hibajavító faktorok hozzáférését a keletkezett DNS-léziókhöz.

DNS károsodást követően a P53 különböző szignalizációs útvonalakat aktivál, melyek arra szolgálnak, hogy működésükkel a sejt megszüntesse a károsodást, illetve annak hatását, vagy ha ennek lehetősége nem áll fenn, beindítsa a programozott sejthalált.

A közelmúltban tett néhány megfigyelés arra utal, hogy a P53 transzkripció elongációs faktorként is képes működni azáltal, hogy az RNSPII-höz kötődve érzékeli a transzkripció elakadását. *Saccharomyces cerevisiae*-ben kimutatták, hogy a P53 számos olyan génhez kötődik, melyek nem közvetlen célgénjei. Az élesztőben kifejeztetett humán P53 DNS-kötő doménjén keresztül kölcsönhat az élesztő RNSPII-vel. Ezen kívül laboratóriumunkból származó korábbi adatok arra utalnak, hogy *Drosophila*-ban a P53 a politén kromoszómák transzkripciósan aktív régióiban figyelhető meg, valamint az RNSPII CTD de-foszforilációja hatással van a DmP53 elhelyezkedésére.

Ezen megfigyelések alapján egy olyan modellt állítottunk fel, ami szerint a P53 együtt halad a transzkripciót végző RNSPII-vel és annak elakadása esetén szerepet játszhat az RNSPII ubiquitin-függő proteozómális lebontásában. Dolgozatomban ennek a modellnek az igazolására szolgáló kísérletek eredményeit mutatom be.

Célkitűzések

Humán sejtekben vizsgálni a P53 jelenlétét olyan génszakaszokon, melyek nem a P53 közvetlen célgénjei.

- A P53 és az RNSPII fehérje szintjének, illetve sejten belüli elhelyezkedésének tanulmányozása transzkripció elongációs blokk hatására
- A P53 fehérje jelenlétének vizsgálata transzkripciósan aktív génszakaszokon
- A P53 és az RNSPII kötődése változik-e AktD-vel indukált transzkripció elongációs blokk hatására a vizsgált génszakaszokhoz
- A humán P53 és az RNSPII közti kölcsönhatás vizsgálata normál körülmények között és AktD-vel indukált transzkripció elongációs blokkot követően

Alkalmazott módszerek

- Tripán kék festéssel vizsgáltuk az AktD U2OS sejtekre gyakorolt toxicitását
- U2OS sejtekben a transzkripció elongációs szakaszának blokkolása AktD kezeléssel
- U2OS sejtek kezelése MG132 proteaszóma inhibitorral
- U2OS sejtek kezelése Calpain V inhibitorral
- Immuncitokémia segítségével vizsgáltuk a P53 és az RPB1 különböző formáinak sejten belüli elhelyezkedését, valamint a P53 és a γ H2AX; az S2P RPB1 és a γ H2AX; az S5P RPB1 és a γ H2AX ko-lokalizációját
- Western blot technikával vizsgáltuk a P53 és az RPB1 fehérje szintjében AktD kezelés hatására bekövetkező változásokat
- Analízist végeztünk korábban már publikált, U2OS sejteken végzett ChIP-seq adatok alapján, hogy kiderítsük, a P53 és az RPB1 ugyanazokon a génszakaszokhoz kötődnek-e
- Kromatin immunprecipitációs kísérlettel tanulmányoztuk, hogy a P53 kötődik-e olyan gének transzkripciósan aktív szakaszaihoz, melyek nem közvetlen célgénjei
- Ko-immunprecipitációval vizsgáltuk, hogy a P53 és az RPB1 kölcsönhat-e egymással

- A P53-at csendesítő siRNS-sel vizsgáltuk, hogy a P53-nak szerepe van-e az S2P RPB1 ubiquitilációjában transzkripció elongációs blokkot követően
- Poli-ubiquitilált fehérje immuoprecipitációt végeztünk, hogy igazoljuk az RPB1 ubiquitilációjára hatással van-e az AktD-vel indukált transzkripció elongációs blokkra
- Propídium-jodid festést alkalmaztunk a FACS analízishez, melynek során vizsgáltuk, hogy az AktD hogyan befolyásolja az U2OS sejtek sejtciklusát

Eredmények

1. Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy az AktD alacsony (5 nM), illetve magas koncentrációban (200 nM) okozza-e a sejtciklus fázisainak eltolódását. Azt tapasztaltuk, hogy AktD kezelés hatására a G1 fázisban levő sejtek száma csökkent, míg a G2 fázisban lévő sejtek száma emelkedett. A G2 fázisban kimutatott emelkedett sejtszám a sejtciklus G2 fázisban történő leállítására utalhat, aminek következtében kevesebb G1 fázisú sejtet figyeltünk meg. Végül az S fázisú sejtek számában csak alacsony dózisu AktD esetében és 24 órával a kezelés után tapasztaltunk csökkenést.

2. Tanulmányoztuk, hogy az AktD-nek milyen hatása van a P53 és az RPB1 fehérje szintjére. Kimutattuk, hogy AktD kezelés hatására az RPB1 szintje csökkent, míg a P53 fehérje szintje emelkedett, és a magas koncentrációjú AktD kezelés a fehérje aktiválódását eredményezte. Az RPB1 fehérje szintjében főként 24 órával magas koncentrációjú AktD kezelés hatására figyelhető meg jelentősebb csökkenés, amely az iniciációra jellemző S5P RPB1 és az elongációra jellemző S2P RPB1 esetében is megfigyelhető.

3. Vizsgáltuk, hogy megfigyelhető-e a P53 együttes elhelyezkedése az RPB1, illetve annak iniciációra jellemző S5P, illetve elongációra jellemző S2P formáival. Ezentúl

tanulmányoztuk, hogy az általunk használt kísérleti elrendezésben az AktD indukál-e kettős szálú DNS törést, illetve, hogy a P53 megfigyelhető-e ezeken a helyeken. Eredményeink azt mutatják, hogy a P53 és az RPB1 AktD kezelés hatására ko-lokalizálnak egymással. Az S2P RPB1 és az S5P RPB1 24 órával 200 nM AktD kezelést követően jól definiálható nukleáris fókuszokban jelentek meg, mely egybeesik a P53 sejten belüli elhelyezkedésével. Ez arra utal, hogy 24 órával magas koncentrációjú AktD kezelést követően a két fehérje ko-lokalizációja jól definiálható sejtmagi fókuszokra korlátozódik. Ezen kívül kimutattuk, hogy a P53 AktD kezelést követően ko-lokalizálódik a γ H2AX-szel, az S2P és az S5P RPB1 viszont nem mutatott ko-lokalizációt a γ H2AX-szel. Ebből arra következtethetünk, hogy az AktD hatására bekövetkező transzkripciós blokk következtében keletkező kettős-szálú DNS törések helyén nincs aktív transzkripció, mely elősegíti a hibajavító faktorok könnyebb hozzáférését a károsodott DNS-hez. A P53 fehérjének feltehetőleg szerepe van az elongáló RNSPII DNS-ről történő eltávolításában transzkripciós blokkot követően. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a P53 kölcsönhat az RPB1 S2P és S5P formáival mind normál körülmények között, mind pedig AktD kezelést követően.

4. Annak eldöntésére, hogy a P53 és az RPB1 ugyanazon a génszakaszokon helyezkedik el, korábban publikált, kezeletlen U2OS sejteken végzett ChIP-seq adatok analízisével vizsgáltuk a P53 és az RPB1 eloszlását az átíródo transzkripciós egységeken. Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy a P53 a transzkripciósan aktív génszakaszokhoz is kötődik és a transzkripció elongációs blokk további P53 fehérjék kötődését eredményezi. ChIP-seq kísérletből származó adatok analízisével három egyedi géncsoportot különítettünk el. Az 1. géncsoportba olyan géneket soroltunk, melyeknél a P53 kötődése a TSH körül figyelhető meg, a 2. géncsoportra jellemző, hogy a P53 kötődése a gének átíródo régióira korlátozódik, míg a 3-as géncsoportba azok a gének sorolhatók, melyeken nem találtunk P53 fehérjét. A ChIP-seq adatok alapján elmondható, hogy a kötött P53 fehérje mennyisége és a gének expressziójának mértéke összefüggésben van egymással, mivel a P53 főként a magasan expresszálódo géneken figyelhető meg. Ebből kiindulva, ChIP kísérlettel vizsgáltuk a P53 és az RPB1 kötődését normál körülmények között és transzkripció elongációs blokkot követően az *ActB*, a *Cdk12*, a *Brat1* (1. géncsoport) és az *Sdcbp* (2. géncsoport) gének promóter, géntest és 3'UTR régiójában. Az RPB1 eloszlása főként a promóter és a kódoló régióban figyelhető meg, mely 6 órával AktD kezelést követően jelentős mértékben lecsökken,

24 órával a kezelés után pedig kezd visszaállni. Ezzel ellentétben normál körülmények között a P53 fehérje kötődése jelentősen lecsökken a vizsgált génszakaszok többségénél, majd AktD kezelés hatására a P53 fehérje szintje emelkedik a vizsgált génszakaszokon. Ez alól kivétel az *ActB* gén, ugyanis itt a P53 és az RPB1 hasonló eloszlást mutat.

5. Ahhoz, hogy kiderítsük, hogy az RPB1 fehérje szintjében bekövetkező csökkenés a fehérje ubiquitilációjának következménye-e, valamint, hogy a P53-nak van-e szerepe benne, poli-ubiquitilált fehérje immunprecipitációs kísérletet végeztünk olyan sejteken is, ahol a P53-at siRNS-sel csendesítettük. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az S2P RPB1 transzkripció elongációs blokk következtében ubiquitilálódik, ami P53-függő folyamat. A legtöbb ubiquitilált S2P RPB1 fehérje főként 6 órával AktD kezelés után figyelhető meg, míg 24 órával AktD kezelést követően kevesebb volt az ubiquitilált fehérje mennyisége. A P53 fehérje hiányában azonban a transzkripció blokkot követően megfigyelt ubiquitilált S2P-RPB1 fehérje mennyiségében nagy mértékű csökkenést tapasztaltunk. Ez összefüggésben van az S2P RPB1 fehérje szintjében tapasztalt változással is: P53 hiányában több S2P RPB1 fehérjét figyelhetünk meg, mint P53 jelenlétében 24 órával AktD kezelést követően. Ez alátámasztja, hogy transzkripció elongációs blokkot követően a P53 fehérjének

szerepe van az S2P RPB1 ubiquitilációjában. Ez összefüggésbe hozható a kromatin immunprecipitáció során kapott eredménnyel, mely együttesen azt mutatja, hogy transzkripció elongációs blokk indukálása után 6 órával a P53 szerepet játszik a sérülés helyén leállt RPB1 ubiquitilációjában, aminek következtében a károsodott DNS hozzáférhetővé válik a hibajavító faktorok számára.

6. További kísérleteket végeztünk annak kiderítésére, hogy a transzkripció elongáció blokkolásakor bekövetkező RPB1 ubiquitilációt követően a fehérje proteozómális degradációja is megfigyelhető-e. MG132 proteozóma inhibitorral kezeltük a sejteket és vizsgáltuk, hogyan változik az RPB1 fehérje szintje AktD kezelés hatására. Az RPB1, valamint annak transzkripciósan aktív formáinak fehérje szintje közel megegyező volt a kezeletlen kontrollban tapasztalt RPB1 szinttel, ami egyértelműen jelzi, hogy a transzkripció elongációs blokk következtében leállt RPB1-et a 26S proteozóma lebontja. Ezen kívül a P53, valamint annak S15P formájának fehérje szintjében csökkenést figyeltünk meg 24 órával AktD kezelést követően a proteozóma funkciójának gátlásakor. Ebből arra következtettünk, hogy a P53 lebontása egy korábban már leírt, Calpain-útvonalon keresztül valósul meg, ezért Calpain V inhibitor kezelést követően vizsgáltuk a P53 fehérje szintjében bekövetkező változásokat. Azonban

kísérleteink azt mutatják, hogy a P53 fehérje szintjében bekövetkező csökkenés 24 órával AktD kezelést követően a proteozóma gátlásakor nem Calpain-függő útvonalon keresztül megy végbe.

Eredményeim arra utalnak, hogy a P53 olyan transzkripciósan aktív géneken is megfigyelhető, melyek nem közvetlen célgénjei. Kötődése feltehetőleg az elongáló RNSPII-vel alkotott kölcsönhatásán keresztül valósul meg. Kísérleteink rámutatnak arra, hogy a P53 szerepet játszik transzkripciós blokk esetén. Kimutattuk, hogy a transzkripció elongáció blokkolásakor a P53-nak szerepe van az RPB1 ubiquitin-függő proteozómális degradációjában. A transzkripció elakadásakor a P53 feltehetőleg szerepet játszik a leállt RPB1 kromatinról történő eltávolításában, ezzel teret engedve a hibajavító faktorok DNS-hez való hozzáféréséhez. Eredményeim összességében egy újfajta rálátást biztosítanak arra, hogyan tudják a sejtek a különböző stresszhatásokra bekövetkező transzkripció elongációs blokkot feloldani.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10049721

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény:

Human p53 interacts with the elongating RNAPII complex and is required for the release of actinomycin D induced transcription blockage, **Barbara N. Borsos**, Ildikó Huliák, Hajnalka Majoros, Zsuzsanna Ujfaludi, Ákos Gyenis, Peter Pukler, Imre M. Boros, Tibor Pankotai, *Sci. Rep.* **7**, 40960; doi: 10.1038/srep40960 (2017)

SCIENTIFIC REPORTS 7: p. 40960. (2017)

IF: 5,228

Egyéb közlemények:

Acetylations of Ftz-F1 and histone H4K5 are required for the fine-tuning of ecdysone biosynthesis during *Drosophila* metamorphosis, **Barbara N. Borsos**, Tibor Pankotai, Dávid Kovács, Christina Popescu, Zoltán Páhi, Imre M. Boros, *Dev Biol.* 2015 May 8. pii: S0012-1606(15)00239-0. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.04.020.

DEVELOPMENTAL BIOLOGY 404:(1) pp. 80-87. (2015)

IF: 3,155

Gut region-specific accumulation of reactive oxygen species leads to regionally distinct activation of antioxidant and apoptotic marker molecules in rats with STZ-induced diabetes, Zsanett Jancsó, Nikolett Bódi, **Barbara Borsos**, Éva Fekete, Edit Hermes, *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Mar 18. pii: S1357-2725(15)00074-6. doi: 10.1016/j.biocel.2015.03.005

***INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY* 62:** pp. 125-131. (2015)

IF: 3,905

dTAF10- and dTAF10b-Containing Complexes Are Required for Ecdysone-Driven Larval-Pupal Morphogenesis in *Drosophila melanogaster*, Zoltán Páhi, Zsuzsanna Kiss, Orbán Komonyi, **Barbara N. Borsos**, László Tora, Imre M. Boros, Tibor Pankotai, PLoS One. 2015 Nov 10;10(11): e0142226. doi: 10.1371/journal.pone.0142226. eCollection 2015.

***PLOS ONE* 10:**(11) Paper e0142226. (2015)

IF: 3,057

Összesített impakt faktor: 15,345

Ismeretterjesztő közlemények:

DNS-hibák és ami mögöttük van. Borsos B, Majoros H, Újfaludi Zs, Páhi Z, Pankotai T, *ÉLET ÉS TUDOMÁNY* LXXI:(6) pp. 180-182. (2016)

***ÉLET ÉS TUDOMÁNY* LXXI:**(6) pp. 180-182. (2016)