

Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

**Buzás-Berezki Orsolya**



Témavezetők:  
Dr. Bálint Éva  
Dr. Boros Imre Miklós

Biológia Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged  
2009



## **Bevezetés**

A p53 tumor szuppresszor 1979-es felfedezése óta a rákkutatás egyik legintenzívebben kutatott molekulájává vált, hiszen a legtöbb humán tumor esetében bebizonyították, a p53 tumor szuppresszor gén vagy a p53-as útvonal hibás működését. A p53 gén csíravonalban bekövetkező mutációja családi felhalmozódást mutató, korai életkorban bekövetkező rákos elváltozásokat okoz, amelyet Li-Fraumeni szindrómaként ismerünk.

A p53 egy transzkripciós faktor, amelynek kulcs szerepe van a szövetek integritásának fenntartásában a sejtek DNS-tartalmát ért sérülés esetén. Mutációja a DNS hibák felhalmozódásához és a sérült sejtek kontrollálatlan osztódásához vezethet.

Stresszmentes sejtekben a p53 fehérje szintje nagyon alacsony, egy proteasóma-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 lebontásra jelöli a p53-at. A p53 is szabályozza a saját negatív szabályozójának, az MDM2-nek az expresszióját egy visszacsatolós folyamatban, mivel az MDM2 expressziója transzkripciósan aktiválódik a p53 által.

DNS károsodás hatására a Chk1 és Chk2 (checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2) kinázok a p53-t foszforilálják, ami szintjének gyors megemelkedéséhez és transzkripciós faktorként való aktiválódásához vezet. Az aktiválódott p53 többféle sejtvaszt indít el és a sejtmagba transzportálódva, mint transzkripciós faktor aktiválja célgénjeit, melyeken keresztül részt vesz a sejtciklus szabályzásában, a keletkezett hibák kijavításában, a DNS repair folyamatokban, az érépződés (angiogenezis) gátlásában, és végül az apoptózisban.

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 humán p63 és a p73 szerkezete hasonlít a p53-éhoz.

A család tagjai között fennálló hasonlóságnak köszönhetően a p63 és a p73 képesek transzaktiválni a p53 célgénjeit és ezáltal sejtciklus megállást és apoptózist indukálni.

A p53 fehérje e fontos folyamatokban sokféle fehérjével kapcsolatba lépve tölti be funkcióját és ezeknek a kölcsönhatásoknak a felderítése fontos alapkulcs célkitűzés, amelynek megvalósításán munkacsoportunk tagjai több éve dolgoznak. Kutatócsoportunk a *Drosophila melanogaster* (Dmp53) számos kölcsönható partnerét azonosította élesztő két-hibrid kísérletben. Az általunk azonosított partnerek közül egy TATA-box-kötő fehérje, a TAF3-mal való kölcsönhatásának jellemzése megmutatta, hogy a kettejük között létrejött kölcsönhatás evolúciósan konzervált. Az egér TAF3 (mTAF3) specifikusan és drasztikusan gátolja a p53 transzkripciót aktiváló képességét, mely kis mértékben a p53 fehérje szintjének csökkenéséhez vezet. A p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességét nem befolyásolja az mTAF3, viszont endogén p53 jelenlétében van hatása a fehérje szintjére.

E kölcsönhatások funkcionális következményeinek vizsgálata alapvetően hozzájárul a p53 finom működésének megértéséhez és ezáltal a humán daganatok kialakulásának megismeréséhez és terápiás eljárások kidolgozásához.

## **Célkitűzések**

1. A Dmp53 és a DmTAF3 kölcsönhatásának jellemzése. A humán p53 géncsalád tagjai, a p53, p73 $\alpha$  és p73 $\beta$  és a TAF3 egér homológja közötti kölcsönhatás kimutatása *in vivo* és *in vitro*.
2. A p53 és a p53 rokon fehérjék (p73 $\alpha$  és p73 $\beta$ ) és a TAF3 közötti interakció funkcionális jelentőségének vizsgálata.
3. A TAF3 C-terminális részén elhelyezkedő PHD domén funkciójának felderítése.

### Alkalmazott módszerek

- Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása élesztő két hibrid módszerrel
- GST-jelölt fehérjék termeltetése és tisztítása baktérium sejtekben
- GST pull down kísérlet
- *In vitro* transláció
- Rekombináns DNS technikák: polimeráz láncreakció (PCR), restriktációs emésztés, ligálás, DNS tisztítás
- Emlős sejtek tenyésztése, tranziens transzfekciója
- Transzkripciót aktiváló képesség tesztelése, riporter fehérje aktivitás mérés
- Ko-immunprecipitáció
- Western blot technika
- Kvantitatív polimeráz láncreakció
- *In vitro* ubikvitináció vizsgálata
- *In vivo* ubikvitináció vizsgálata

### Eredmények

#### **A p53 fehérje új kölcsönható partnere: a TAF3 fehérje**

A Dmp53 kölcsönható partnereinek azonosítása céljából *Drosophila* embriónális cDNS könyvtár szűrését végeztük el élesztő két-hibrid (Y2H) módszerrel. Az általunk izolált cDNS klónok közül az egyik (5-ös számú klón) a DmTAF3 514-924 aminosavait kódoló részt tartalmazta, míg egy 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 felelős. A kölcsönhatásért felelős Dmp53 régió azonosítására a Dmp53 különböző régióinak a kapcsolódását teszteltük az 5-ös számú klónban kódoltnak megfelelő DmTAF3 fehérje részlettel 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 alakított ki a DmTAF3-mal, azonban a szabályzó domén önmagában csak gyenge interakciót mutatott. 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.

#### **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 $\alpha$  és p73 $\beta$ ) 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 $\alpha$ , p73 $\beta$  fehérjék transzkripciót aktiváló képességére és fehérje szintjére.

#### **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 HeLa sejtekben az exogén p53-ét csak fele akkora mértékben gátolta. Az egér TAF3-nak a p53 transzkripciót aktiváló képességére kifejtett hatásával megegyező eredményeket kaptunk a p53 fehérje szintjének vizsgálatára során is.

Hiszen az mTAF3 ha kisebb mértékben is, de csökkentette a p53 fehérje szintjét is. 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 transzkripciós 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.

#### **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 se HeLa sejtekben, melyek csak nagyon kis mennyiségben tartalmaznak endogén p53-t, ill. Saos2 sejtekben sem, melyek egyáltalán nem tartalmaznak endogén p53-at. Azonban endogén p53 jelenlétében, U2OS sejtekben azt találtuk, hogy a p73 $\alpha$  fehérje szintje kismértékben csökkent, addig a p73 $\beta$  fehérje szintje emelkedett az egér TAF3 hatására. Tehát eltérő eredményt kaptunk p53 jelenlétében és hiányában a p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességének és fehérje szintjének vonatkozásában.

#### **A TAF3 PHD domén szerepének vizsgálata**

##### **Működhet-e E3 ubikvitin ligázként az mTAF3?**

A *Drosophila* és az egér TAF3 fehérje felépítésére is jellemző, hogy az N-terminális részén egy HFD, míg a C-terminális részen egy PHD domént tartalmaznak. Érdekes, hogy a TAF3 homológok között nem egységes ezen domének előfordulása, hiszen az egér és *Drosophila* homológokkal szemben, a humán TAF3 homológ esetében a PHD domén megléte kísérletesen nem bizonyított.

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. 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. E kísérletek azonban nem adtak egyértelmű választ, nem bizonyították a TAF3 E3 ubikvitin ligáz funkcióját.

#### **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 fehérjék hatását vizsgáltuk a p53 transzkripciót aktiváló képességére. A H893A pontmutáns esetében, ahol a mutáció a Cys4-His-Cys3 Zn<sup>2+</sup>-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, a mutánsok esetében, minél nagyobb része hiányzott az mTAF3 fehérjének ill. a PHD doménnek, annál kevésbé volt képes a fehérje kifejezni gátló hatását. E kísérletek eredménye alapján feltételezzük, hogy nem feltétlenül a PHD domén jelenléte, hanem a p53-mal való kölcsönhatásért felelős régió elvesztése okozza a transzkripciót aktiváló képességet csökkentő hatás megszűnését.

#### **A PHD doménben mutáns mTAF3 nem csökkenti a p53 fehérje szintjét**

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

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

A humán TAF3 esetében, mint korábban említettem, eddig nem sikerült kísérletesen bizonyítani a PHD domén jelenlétét a fehérje C-terminális részén az általunk alkalmazott sejtvonalban. Ezért megvizsgáltuk, hogy vajon a PHD domén hiányában milyen hatással van a hTAF3 a p53 ill. p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességére. A p53 rokon fehérjék közül a p73 $\alpha$  transzkripciót aktiváló képességét az mTAF3-hoz hasonlóan, nem befolyásolta a hTAF3. Ezzel szemben a p73 $\beta$  transzkripciót aktiváló képességét az mTAF3-mal ellentétben gátolta a hTAF3. A p53 esetében megmaradt a PHD doméntől függetlenül is a transzkripciót aktiváló képesség csökkenése. Ezért feltételezzük, hogy az mTAF3 és a p53 közötti kölcsönhatásért felelős régió meglététől függ, hogy érvényesül-e az mTAF3 gátló hatása a p53 transzkripciót aktiváló képességén.

#### **Összefoglalás**

Eredményeimet összefoglalva:

1. A Dmp53 fehérje új kölcsönható partnere, a DmTAF3.
2. A humán p53 géncsalád tagjai a p53, p73 $\alpha$  és p73 $\beta$  is képesek kölcsönhatásba lépni a DmTAF3-mal.
3. A TAF3 és a p53 fehérjék közötti kölcsönhatás evolúciósan konzervált *in vitro* és *in vivo* is.
4. Az egér TAF3 specifikusan és drasztikusan gátolja a p53 transzkripciót aktiváló képességét, mely a p53 fehérje szintjének kis mértékű csökkenéséhez vezet.
5. A p53 rokon fehérjék transzkripciót aktiváló képességét nem befolyásolja jelentősen az mTAF3, endogén p53 jelenlétében viszont az mTAF3 hatására megváltozik a p73 $\alpha$  és a p73 $\beta$  fehérjék szintje.
6. A p53 transzkripciót aktiváló képességére kifejtett mTAF3 hatás függ a PHD domén jelenlététől.
7. A vad típusú mTAF3 fehérjével ellentétben a PHD doménben mutáns mTAF3-ak nem befolyásolják a p53 fehérje szintjét.
8. A C-terminális PHD finger doménnel nem rendelkező humán TAF3 homológ is gátolja a p53 és a rokon fehérjék közül a p73 $\beta$  transzkripciót aktiváló képességét.

### **A dolgozat témaköréhez kapcsolódó közlemények**

1. **Bereczki O**, Ujfaludi Z, Pardi N, Nagy Z, Tora L, Boros IM, Balint E.  
*TATA binding protein associated factor 3 (TAF3) interacts with p53 and inhibits its function.* BMC Mol Biol. 2008, 9:57. IF: 3,5.

2. Bodai L, Pardi N, **Ujfaludi Z**, Bereczki O, Komonyi O, Balint E, Boros IM.  
*Daxx-like protein of Drosophila interacts with Dmp53 and affects longevity and Ark mRNA level.* J Biol Chem. 2007; 282(50): 36386-93. IF: 5,808

### **Társszerzői nyilatkozat**

Alulírott felelős szerző igazolom, hogy a Jelölt doktori értekezését ismerem. Az abban foglalt tudományos eredményeket fokozat megszerzéséhez más szerző nem használta fel. A Jelölt a társszerzős közleményében közölt adatok létrehozásában és eredmények elérésében jelentős mértékben résztvett.

Szeged, 2009. november.

.....  
Dr. Boros Imre Miklós