

**EGY METILTRANSZFERÁZ DOMÉNT TARTALMAZÓ RNS-KÖTŐ FEHÉRJE
FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA**

Ph.D. Thesis

Izzet Enünlü

Témavezető

Prof. Dr. Boros Imre

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Biokémia Intézet

Eukarióta Transzkripciószabályozás Labor

Szeged

2003

1. BEVEZETŐ

RNS-fehérje kölcsönhatások számos sejtszintű folyamatban vesznek részt, a transzkripciószabályozástól a fehérjék kifejeződéséig. Sokrétű szerepük révén új RNS-kötő fehérjék azonosítása hozzájárulhat a sejtekben lejátszódó folyamatok alaposabb megértéséhez. Ezen gondolat mentén RNS-kötő fehérjét kerestünk *Drosophila melanogaster*-ben, és egy addig még funkcionálisan nem ismert génterméket azonosítottunk (Udvardy és munkatársai). Ebben a munkában célul tűztük ki az ecetmuslica fehérje és emlős homológjának karakterizálását.

A DTL fehérje homológjai számos más organizmusban is fellelhetők, az adatbázisokban több EST is reprezentálja, ami arra utal, hogy fontos szerepet játszhat a sejt életében. A munkánk kezdetekor egyik DTL homológnak sem azonosították a szerepét, bár kutatásaink közben más csoportok leírták bizonyos tulajdonságait ennek az új fehérje családnak.

1.1. Elméleti háttér

Bár valamikor úgy gondolták, hogy az RNS egy passzív genetikai másolat, mára kiderült, hogy kulcsszerepet játszik több sejt-folyamatban. Egy RNS molekula képes bázispárosodással dupla-hélixet formálni a sima hélix-től való eltérések olyan kombinációival, mint a hairpinek, stem-hurkok, szimmetrikus vagy aszimmetrikus belső hurkok, bulge-hurkok, purin-purin téves párosodások, GU vagy lötyögő párosodások és álcsonnók (1,2). A helikális és nem-helikális motívumok kombinációja az RNS molekulák bonyolult 3-dimeziós szerkezetekbe való rendeződését biztosítja, ami megközelíti a fehérjék összetettségét. RNS-kötő fehérjék ezt a térbeli elrendeződést ismerik fel. Ennek eredményeképp változatos RNS és RNS-kötő struktúrák figyelhetők meg.

1.1.1. RNS kötő fehérjék

Az RNS-kötő fehérjék moduláris struktúrákból épülnek fel. Az RNS kötésért felelős felismerő motívum általában 70-150 aminosav hosszú. Három típusát különböztetjük meg az eukarióta RNS-kötő doméneknek:

1. az RNS felismerő motívum (RRM)
2. K-homológia domén (KH)
3. duplaszálú RNS kötő domén (dsRBD).

Ezen felül még számos más RNS-kötő motívum is található RNS-kötő fehérjékben.

1.2. A tézis célkitűzései

Ebben a munkában célul tűztük ki egy általunk azonosított RNS kötő fehérje karakterizálását. A HIV TAR-RNS kötő képességgel rendelkező fehérjét kerestünk *Drosophila melanogaster*-ben (Udvardy és munkatársai). Egy előzőleg még nem azonosított fehérjét találtunk, amit *Drosophila* TAT Like-nak (DTL) neveztünk el. Meglepetésünkre DTL homológ fehérjék megtalálhatók sok más organizmusban is. Élesztőtől emberig a fehérje jól konzervált RNS-metiltranszferáz boxokból áll. Az

adatbázisokban található nagyszámú EST azt mutatja, hogy a fehérjéket kódoló gének intenzív átíródás alatt állnak.

A tanulmány főbb célkitűzései:

- Azonosítani a DTL fehérje homológjait adatbázisos keresések alapján
- Ezen adatokat felhasználva:
 1. konzervált régiókat meghatározni, amik segítenek a funkció feltárásában
 2. homológ emlős EST-eket azonosítani, hogy azokat is tanulmányozhassuk párhuzamosan az *ecetmuslica* fehérjével
- Megvizsgálni, hogy az azonosított konzervált motívumok funkcionálisan aktívak-e
- Azonosítani a DTL és emlős homológja expressziós mintázatát. Ennek érdekében poliklonális ellenanyagokat termeltettünk nyúlban, és Western-blottal valamint immunolokalizációval különböző szöveteket és sejtrészeket vizsgáltunk
- A DTL fehérje kölcsönható partnereinek azonosítása *in vivo* és *in vitro* módszerekkel, valamint a kölcsönhatás helyeinek megtalálása
- RNS interferenciát alkalmazva meghatározni a DTL homológ fehérje szerepét a sejt szintű folyamatokban.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Élesztő kéthibrid

2.2. *In vitro* fehérje kötő esszé

2.3. Sejtmagi és citoplazmatikus fehérje frakcionálás

2.4. Immunolokalizáció

2.5. Sejtszortálás

2.6. siRNS szintézis

3. EREDMÉNYEK

3.1. *Drosophila* TAT Like fehérje (DTL)

3.1.1. *dtl* gén egy metiltranszferáz doménnel rendelkező RNS kötő fehérjét kódol

Udvardy Andor laboratóriumában azonosítottak egy fehérjét, ami a HIV vírus TAT fehérjéjéhez hasonló RNS kötő aktivitást mutatott.

Mivel a fehérjét annak TAR RNS kötő tulajdonsága alapján azonosították, *dl*-nek (*Drosophila* TAT Like) neveztük el. A *dtl* gén érdekes szerkezetű, két nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaz.

Adatbázis kereséseket hajtottunk végre annak érdekében, hogy konzervált régiókat azonosítsunk a fehérjében és így következtethessünk a funkciójára. A keresés kimutatta, hogy a DTLdown fehérjének

számos organizmusban létezik homológja, az élesztőtől az emberig. A legkonzerváltabb régiók metiltransferáz motívumok voltak, mint a 9 aminosav hosszú metiltransferáz Motívum I (VVDAFCGVG), a 7 aminosavas Motívum II (KADVFL) és egy S-adenozil-L-metionin kötő régió.

3.1.2. Schneider S2 sejtben a DTL a citoplazmában található

DTL down elleni affinitás kromatográfiával tisztított poliklonális ellenanyagokat használtunk a fehérje sejtbeni lokalizációjának meghatározására *Drosophila* S2 sejtekben. Az S2 sejtekből sejtmagi és citoplazmatikus sejt kivonatokot készítettünk és blottoltuk az ellenanyagokkal. A western blot mindkét DTL izoformát a citoplazmában mutatta. Az immunolokalizációt ugyanezekkel az antitestekkel végeztük S2 sejteken. A pontosabb lokalizációhoz egér anti-tubulin ellenanyaggal együtt használtuk a DTL-ellenes antitesteket. Az ellenanyagok együttes alkalmazása azt mutatta, hogy a DTL és a mikrotubulus sejtbeni mintázata átfed egymással.

3.2. A DTL fehérje emlős homológja

3.2.1. Az emlős DTL-nek különböző izoformái léteznek

DTL-t egy emlős vírus RNS-sel való kölcsönhatása révén találtuk meg. Ezért gondoltuk, hogy a DTL emlős homológjának karakterizálása segítséget nyújthat az *ecetmuslica* fehérje működésének megismeréséhez. Mivel a homológia a DTL és rokonai között a C-terminális régióra korlátozódik, egy olyan egér EST szekvenciát rendeltünk, amely nagymérvű hasonlóságot mutatott az említett szakaszon.

Az *in vitro* tanulmányok elősegítésére poliklonális antipeptid ellenanyagot állítottunk elő egy 14 aminosavas rész felhasználásával : **EIPNSPHATEVEIK**, ami a 44-57-ik aminosavat jelenti a rendelt szekvenciából. A közelmúltban egy másik csoport is leírta a DTL emlős homológját, amit PIMT-nek (PRIP Interacting Protein with Methyl Transferase domain) neveztek el. A DTL emlős homológját ezért PIMT-nek, az EST szekvenciát PIMT-C-nek fogom nevezni a félreértések elkerülése végett.

Patkány szöveteket teszteltünk Western blot analízissel, hogy megállapítsuk a PIMT szöveti eloszlását. Az ellenanyag három specifikus csíkot mutatott. Egy 50 kDa-os fehérjét detektáltunk minden vizsgált szövetben, egy 90 kDa-os fehérjét agyban, szívben és tesztikuláris szövetekben és egy 30 kDa fehérjét találtunk vese homogenizátumban.

3.2.2. A PIMT 55 kDa izoformája a citoplazmában található és kolokalizálódik a mikrotubulussal

HeLa sejtekben a PIMT ellenanyag csak egy 55 kDa fehérjét detektál. Ezt a rövidebb formát PIMT55-nek neveztük el. A HeLa sejteket citoplazmatikus és magi frakciókra bontottuk és Western blottal teszteltük, hogy a PIMT55 sejtbeni lokalizációját megállapíthassuk. Úgy találtuk, hogy a PIMT55 a DTL-hez hasonlóan a citoplazmában helyezkedik el. Immunolokalizáció során a PIMT55 hasonló elrendeződést mutatott, mint a mikrotubulus sejtvez a DTL-hez hasonlóan.

3.2.3. A PIMT C-terminális része kölcsönhat a WAIT-1 fehérjével

Élesztő két hibrid kísérleteket végeztünk, hogy a PIMT interakciós partnereit azonosítsuk. Ezekben a kísérletekben a PIMT-C-t használtuk mint csalit, és humán vérből származó cDNS

könyvtárat teszteltünk vele. A legerősebb kölcsönhatást a WAIT-1 fehérje mutatta, az öt kódoló cDNS-t több független kísérletből megkaptuk. WAIT-1 az egér EED-nek és a *Drosophila* Extra Sex Comb (ESC) fehérjének az emlős homológja.

3.2.4. A PIMT mennyiségének siRNS általi csökkentése sejtciklus eltolódáshoz vezet

Annak érdekében, hogy többet megtudjunk a PIMT fehérje funkciójáról időlegesen lecsökkentettük a mennyiségét PIMT RNS specifikus siRNS-t használva. A PIMT és GFP specifikus siRNS-ek Donze és munkatársai által leírt módszerrel lettek szintetizálva (36).

Az analízis azt mutatta, hogy az siRNS-ekkel kezelt sejtekben a sejtciklus eltolódott a nem kezelt kontrollhoz képest. Az eredményeink azt mutatták, hogy a kezeléstől számított 24h múlva a kezelt sejtek száma a G1 fázisban, 40 óra múlva a G2-ben, míg 48 óra elteltével a G2/M fázisban volt magasabb.

3.2.5. PIMT55 expressziója megnövekszik az S fázis előtt

Mivel a PIMT55 hiánya megváltoztatta a sejtek osztódási ciklusát, feltételeztük, hogy a fehérje mennyisége is változik a sejtciklus során. Ennek tesztelésére a sejteket különböző kezelések alá vetettük, hogy ne tudjanak átlépni bizonyos sejtciklus fázisokat. A sejtektől megvontuk a szérumot, így feldúsultak a G1 fázisban, hidroxüreát adtunk hozzájuk, így a G1/S fázis átmenetnél álltak meg és végül kolchicinnel kezeltük őket, ami azt eredményezte, hogy a sejtek nem tudtak kilépni a G2 fázisból. Mindhárom mintából azonos mennyiségű fehérjét teszteltünk PIMT elleni ellenanyaggal Western blot kísérletben. Az eredmények azt mutatták, hogy a PIMT55 mennyisége megnövekszik az S fázisban.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. A DTL fehérjét a második nyitott leolvasási keret kódolja

A DTL fehérjét egy érdekes gén kódolja, amely két nyitott leolvasási keretet tartalmaz. A második ORF egy evolúciósan konzervált fehérjét kódol az első stop kodonhoz képest egy bázispár eltolódással.

A fehérje ellen készített specifikus ellenanyagot a specificitása megnövelésének érdekében affinitáskromatográfiával megtisztítottuk, és Schneider sejteket teszteltünk vele Western blottal. Két specifikus fehérjét detektáltunk, az egyik ~60 kDa tömegű volt, a másik ~120 kDa. A 60 kDa-os fehérje valószínűleg a második ORF terméke, míg a 120 kDa-os fehérje egy posztranszlációs modifikáción átesett formája lehet.

4.2. A DTL fehérje homológjai

Adatbázisokban számos DTL homológ fehérjét találtunk különböző organizmusokban. Munkánk kezdetekor ezeket a fehérjéket még nem írták le, csak EST-k reprezentálták őket.

Zhu és munkatársai élesztő kéthibridben izoláltak humán máj cDNS könyvtárból egy magi receptor-koaktivátor fehérjét, amit PIMT-nek neveztek el, a PRIP fehérjét használva csaliként. A

PIMT cDNS egy 852 aminosavas fehérjét kódol, ami egy metiltranszferáz I motívumot (VVDAFCGVG) és egy nem variábilis szegmenst (GXXGXXI) tartalmaz, ami az RNS-kötő fehérjékben található K-homológia motívumokra jellemző. Immunofluoreszcens kísérletek azt mutatják, hogy a 92 kDa-os PIMT és a PRIP fehérje kolokalizálódik a sejtmagban. PIMT köt S-adenozil-L-metionint, ami a metildonor a metilációs reakciókban, és köt RNS-t is, valószínűsítvén, hogy RNS metiltranszferáz funkcióval rendelkezik (38).

Továbbá 2002-ben Mouaikel és munkatársai leírták a DTL élesztő homológját, a TGS1p nevet adva neki. Azt találták, hogy a TGS1p hipermetilálja bizonyos snoRNS-ek capstruktúráját. A fehérjét a sejtmagban a Cajal testben, és a citoplazmában detektálták, bár a citoplazmatikus változat funkciója még nem tisztázott (41). A kísérleteik szerint a humán TGS1 fehérje (hTGS1), vagy mint korábban neveztük PIMT, ugyanolyan karakterisztikával rendelkezik, mint élesztő homológja (42).

4.3. A PIMT fehérje három különböző izoformája létezik a különböző szövetekben

Western blotokban patkány szövetekben különböző izoformákat tudtunk detektálni. Egy 50 kDa-os fehérjét detektáltunk minden vizsgált szövetben, Zhu és munkatársai által leírt 90 kDa-os fehérjét agyban és tesztikuláris szövetekben és egy 30 kDa fehérjét vese homogenizátumban találtunk. Továbbá a kísérletek többségében használt HeLa sejtekben egy 55 kDa-os izoformát detektáltunk.

Zhu és munkatársai szerint a PIMT gén több mint 13 exonból áll (38). Ez azt valószínűsíti, hogy alternatív éréssel létrejöhetnek az általunk talált különböző variánsok. Az adatbázisban fellelhető rövidebb EST-k is azt sugallják, hogy létezik alternatív éréssel létrejött formája a *PIMT/hTGS1* génnek.

4.4. A DTL és a PIMT 55 kDa-os izoformája citoplazmatikus fehérje, és asszociálódik a mikrotubulusokkal

Rovar, valamint emlős citoplazma és magi preparátumokon elvégzett Western blot azt mutatja, hogy a DTL és a PIMT 55 kDa-os formája a citoplazmában helyezkedik el. Immunolokalizációs kísérletek arra mutattak, hogy a két fehérje elhelyezkedési mintázata megegyezik a mikrotubulusával. Az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a PIMT 90 kDa formája valószínűleg a magban található, míg az 55 kDa-os variáns a citoplazmában helyezkedik el. Azonban nyilvánvaló, hogy a fehérjecsalád legfőbb tulajdonságát, a citoskeletális lokalizációját egyik fent említett publikáció sem említi.

4.5. Az emlős DTL kölcsönhat a WAIT-1 fehérjével

BLAST keresések és aminosavsorrend összehasonlítások azt mutatják, hogy a DTL és homológ fehérjék a C-terminális részen konzerválódtak. Ezért a további kísérletekben erre a régióra fókuszáltunk. Élesztő kéthibridben kerestünk interakciós partnereket a PIMT/hTGS1 C-terminálisát használva csaliként, humán vérből származó cDNS könyvtárban. Azt találtuk, hogy a WAIT-1 fehérje (NP_003788) kölcsönhat a PIMT/hTGS1-gyel. Megfigyelésünket alátámasztottuk deléziós mutánsok és nonspecifikus konstrukciók alkalmazásával. GST pull down esszével bizonyítottuk a kölcsönhatást *in vitro*.

WAIT-1 az egér EED (Embryonic Ectoderm Development) és a *Drosophila* ESC (Extra Sex Comb) fehérjék emlős homológja (39). Ez a két fehérje a polycomb család tagja, amelyek a génexpresszióban szerepet játszó faktorok DNS felismerőhelyének megváltoztatásában játszanak szerepet (43).

4.6. A DTL funkciója

A PIMT fehérje mennyiségének siRNS-ekkel való csökkentése a sejtciklus eltolódását eredményezte. Emellett a különböző sejtciklus stádiumokból származó fehérjeminták azt mutatják, hogy a PIMT mennyisége megnövekszik S fázisban. Ez egy újabb bizonyítéka a PIMT és a sejtciklus közötti kapcsolatnak. Korábban kimutatták, hogy a PIMT *C. elegans* homológjának (T08G11.4) kiütése rendellenes orsó kialakulásához, lassú növekedéshez és lárvális letalitáshoz vezet (47).

Léteznek olyan eukarióta fehérjék, amelyek mint splicing faktorokat azonosítottak, de emellett szükségesek a normális sejtciklushoz is (48). Korábban élesztőben kimutatták, hogy a pre-mRNS érése és a sejtciklus között kapcsolat van (49,50).

Ennélfogva a PIMT által okozott sejtciklus eltolódása megmagyarázható azzal, hogy a csökkent mennyiségű PIMT kevesebb snoRNS éréseben tud részt venni, így az mRNA és rRNS érése nem lesz tökéletes.

Azonban a *C. elegans*ban megfigyelt abnormális orsó kialakulása arra mutat, hogy a PIMT/hTGS1 fehérjének összetettebb szerepe lehet annál, mint hogy részt vesz az mRNA és rRNS éréseben. Az a tény, hogy a PIMT55 kolokalizálódik a mikrotubulussal és kölcsönhat a WAIT-1-gyel arra utal, hogy részt vehet a sejt-sejt kommunikációkban és sejt-mátrix kölcsönhatásokban magasabb eukariótákban. Az orsó kialakulása kapcsolatba hozható a nagyon rövid asztrális mikrotubulusok aktin struktúrákkal való reakcióival (51). Valószínűleg az asztrális mikrotubulusok közvetítik a jelet a perifériáról (integrin vagy aktin sejtvezérlés).

Másrésről tények igazolják, hogy nagy mennyiségű mRNA kötődik a sejtvezérléshez (52). Ez arra utal, hogy léteznek olyan „általános” RNS-kötő fehérjék, amelyek ezt a kapcsolatot biztosítják az RNS-ek és a sejtvezérlés között. A PIMT/hTGS1 55 kDa-os változata egyike lehet ezeknek az RNS-kötő, sejtvezérlés asszociált fehérjéknek. Erre utal, hogy a sejtben a citoskeleton mentén helyezkedik el.

5. KONKLÚZIÓ

- *Drosophila melanogaster* schneider S2 sejtekben a DTL fehérje két izoformája létezik. A 60 kDa-os fehérje egy belső riboszómális kezdőpontról képződik, míg a 120 kDa-os változat a 60 kDa-os fehérje posztranszlációsán módosított variánsa. Mindkét fehérje a citoplazmában található, és mikrotubulushoz kötődik.
- A DTL emlős homológjának három izoformája fejeződik ki patkány szövetekben: 90 kDa-os izoforma az agyi és szívből származó szövetekben detektálható, az 55 kDa-os fehérje minden vizsgált szövetben megtalálható és a 30 kDa-os változat a vese szövetekben fejeződik ki.

- Humán HeLa sejtekben az 55 kDa-os fehérje található meg. A PIMT55, mint a DTL, citoplazmatikus fehérje és kolokalizálódik a mikrotubulussal.
- Az emlős DTL a C-terminális végén keresztül kölcsönhatásba lép a WAIT-1 fehérjével. A WD ismétlődések által formált β -propeller struktúra esszenciális a kölcsönhatáshoz.
- Az emlős DTL siRNS-ekkel való gátlása a sejtciklus eltolódásához vezet.

6. REFERENCIÁK

1. Shen LX, Cai Z, Tinoco I Jr. (1995) RNA structure at high resolution. *FASEB J* **9**(11):1023-33
2. Tinoco I Jr, Bustamante C. (1999) How RNA folds. *J Mol Biol.* **293**(2):271-81.
3. Crowder S, Holton J, Alber T. (2001) Covariance analysis of RNA recognition motifs identifies functionally linked amino acids. *J Mol Biol.* **310**(4):793-800.
4. Braddock DT, Louis JM, Baber JL, Levens D, Clore GM. (2002) Structure and dynamics of KH domains from FBP bound to single-stranded DNA. *Nature* **415**: 1051 - 1056
5. Saunders LR, Barber GN. (2003) The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J* **17**(9):961-83.
6. Laity JH, Lee BM, Wright PE. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* **11**(1):39-46.
7. Smith CA, Calabro V, Frankel AD. (2000) An RNA-binding chameleon. *Mol Cell.* **6**(5):1067-76.
8. Williamson JR. (2000) Induced fit in RNA-protein recognition. *Nat Struct Biol* **7**(10):834-7
9. Karn J. (1999) Tackling Tat. *J Mol Biol* **293**(2):235-54
10. Stulke J. (2002) Control of transcription termination in bacteria by RNA-binding proteins that modulate RNA structures. *Arch Microbiol.* **177**(6):433-40.
11. Wayne A. Decatur and Maurille J. Fournier (2003) RNA-guided Nucleotide Modification of Ribosomal and Other RNAs *J Biol Chem.* **278**(2):695-8.
12. Collins K. (2000) Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol.* **12**(3):378-83.
13. Will CL, Luhrmann R. (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* **13**(3):290-301
14. Reed R, Magni K. (2001) A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff. *Nat Cell Biol.* **3**(9):E201-4
15. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**(3):195-205.
16. Jansen RP. (1999) RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J* **13**(3):455-66
17. Dean KA, Aggarwal AK, Wharton RP. (2002) Translational repressors in Drosophila. *Trends Genet.* **11** 572-7.
18. Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. (2001) *Gene* **265**:11-23
19. Decatur WA, Fournier MJ (2003) RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J Biol Chem* **278**(2):695-8
20. Weinstein LB, Steitz JA. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP (1999) *Curr Opin Cell Biol.* **11**(3):378-84.
21. Kiss T. (2001) Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.* **20**(14):3617-22.
22. Maas S, Rich A. (2000) Changing genetic information through RNA editing. *Bioessays.* **22**(9):790-802.
23. Grams J, McManus MT, Hajduk SL. (2000) Processing of polycistronic guide RNAs is associated with RNA editing complexes in Trypanosoma brucei. *EMBO J.* **19**(20):5525-32.
24. Kiss T. (2002) Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* **109**(2):145-8.
25. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**(3):195-205

26. Collins CA, Guthrie C. (2000) The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat Struct Biol.* **7(10)**:850-4.
27. Akker SA, Smith PJ, Chew SL. (2001) Nuclear post-transcriptional control of gene expression. *J Mol Endocrinol* **27(2)**:123-31
28. . Norton PA. (1994) Alternative pre-mRNA splicing: factors involved in splice site selection. *J Cell Sci.* **107**:1-7.
29. Garcia-Martinez LF, Mavankal G, Peters P, Wu-Baer F, Gaynor RB. (1995) Tat functions to stimulate the elongation properties of transcription complexes paused by the duplicated TAR RNA element of human immunodeficiency virus 2. *J Mol Biol.* **254(3)**:350-63.
30. . Campisi DM, Calabro V, Frankel AD.(2001) Structure-based design of a dimeric RNA-peptide complex. *EMBO J.* **20(1-2)**:178-86
31. Vendel AC, Lumb KJ.. (2003). Molecular recognition of the human coactivator CBP by the HIV-1 transcriptional activator Tat. *Biochemistry* **42(4)**:910-6
32. . Marzio G, Tyagi M, Gutierrez MI, Giacca M. (1998) HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95(23)**:13519-24.
33. Ott M, Schnolzer M, Garnica J, Fischle W, Emiliani S, Rackwitz HR, Verdin E. (1999) Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol* **9(24)**:1489-92.
34. Chen D, Wang M, Zhou S, Zhou Q. (2002) HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *EMBO J.* **21(24)**:6801-10.
35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning . A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
36. Donze O, Picard D. (2002) RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **30(10)**:e46.
37. Shigemoto K, Brennan J, Walls E, Watson CJ, Stott D, Rigby PW, Reith AD. (2001) Identification and characterisation of a developmentally regulated mammalian gene that utilises -1 programmed ribosomal frameshifting. *Nucleic Acids Res.* **29(19)**:4079-88.
38. Zhu Y, Qi C, Cao WQ, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. (2001) Cloning and characterization of PIMT, a protein with a methyltransferase domain, which interacts with and enhances nuclear receptor coactivator PRIP function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98(18)**:10380-5.
39. Rietzler M, Bittner M, Kolanus W, Schuster A, Holzmann B. (1998) The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins. *J Biol Chem. Oct* **273(42)**:27459-66
40. Misra P, Qi C, Yu S, Shah SH, Cao WQ, Rao MS, Thimmapaya B, Zhu Y, Reddy JK. (2002) Interaction of PIMT with transcriptional coactivators CBP, p300, and PBP differential role in transcriptional regulation. *J Biol Chem.* **277(22)**:20011-9
41. Mouaikel J, Verheggen C, Bertrand E, Tazi J, Bordonne R. (2002) Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol Cell.* **9(4)**:891-901.
42. Verheggen C, Lafontaine DL, Samarsky D, Mouaikel J, Blanchard JM, Bordonne R, Bertrand E. (2002) Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO J.* **21(11)**:2736-45.
43. Orlando V. (2003) Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. *Cell.* **112(5)**:599-606.
44. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* **298(5595)**:1039-43.
45. .Hynes RO. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* **110(6)**:673-87.
46. Li D, Roberts R. (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci.* **58(14)**:2085-97.
47. Zipperlen P, Fraser AG, Kamath RS, Martinez-Campos M, Ahringer J. (2001) Roles for 147 embryonic lethal genes on C.elegans chromosome I identified by RNA interference and video microscopy. *EMBO J.* **20(15)**:3984-92

48. Dahan O, Kupiec M. (2002) Mutations in genes of *Saccharomyces cerevisiae* encoding pre-mRNA splicing factors cause cell cycle arrest through activation of the spindle checkpoint. *Nucleic Acids Res.* **30(20)**:4361-70.
49. Burns CG, Ohi R, Mehta S, O'Toole ET, Winey M, Clark TA, Sugnet CW, Ares M Jr, Gould KL (2002) Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **22(3)**:801-15.
50. Chawla G, Sapra AK, Surana U, Vijayraghavan U. (2003) Dependence of pre-mRNA introns on PRP17, a non-essential splicing factor: implications for efficient progression through cell cycle transitions. *Nucleic Acids Res.* **31(9)**:2333-43.
51. Hwang E, Kusch J, Barral Y, Huffaker TC. (2003) Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J Cell Biol.* **161(3)**:483-8.
52. Jansen RP. (1999) RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J.* **13(3)**: 455

7. KÖZLEMÉNYEK

“Different isoforms of PRIP-interacting protein with methyltransferase domain/trimethylguanosine synthase localizes to the cytoplasm and nucleus”

Izzet Enünlü, Gábor Pápai, Imre Cserpán, Andor Udvardy, Kuan-Teh Jeang and Imre Boros
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003 Vol. 309, No. 1, 44-51

“Two different *Drosophila* ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes”

Selen Muratoglu, Sofia Georgieva, Gábor Pápai, Elisabeth Scheer, Izzet Enünlü, Orbán Komonyi, Imre Cserpán, Lubov Lebedeva, Elena Nabirochkina, Andor Udvardy, Laszlo Tora, and Imre Boros
Molecular and Cellular Biology 2003. 23: 306-321

Poszterek

Investigation of a complex genetic system in *Drosophila*

Pápai Gábor, Selen Muratoglu, Izzet Enünlü, Komonyi Orbán, Tóth Zsolt, Cserpán Imre, Udvardy Andor, Boros Imre
Meeting of the Hungarian Biochemistry Society 2002, Keszthely, Hungary

***Drosophila* Tat like protein human homologue**

Izzet Enünlü, Pápai Gábor, Udvardy Andor, Kuan-The Jeang, Boros Imre
Meeting of the Hungarian Biochemistry Society 2000, Sopron, Hungary

Analysing of novel *Drosophila* genes participating in transcription regulation

Selen Muratoglu, Komonyi Orbán, Tóth Zsolt, Izzet Enünlü, Maróy Péter, Udvardy Andor, Boros Imre
Meeting of the Hungarian Biochemistry Society 2000, Sopron, Hungary

***Drosophila* mutation, which leads to round chromosomes (and where else?)**

Komonyi Orbán, Pápai Gábor, Izzet Enünlü, Tóth Zsolt, Selen Muratoglu, Udvardy Andor, Boros Imre
Straub Days, Biological Research Center 2002, Szeged, Hungary

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott társszerzők ezen nyilatkozattal kijelentjük, hogy a fenti két tudományos közleményben ismertetett eredmények azon részének elérésében, amelyet Izzet Enünlü Ph.D. disszertációjában felhasznált, nevezettnek meghatározó szerepe volt, és ezen eredményeket más fokozat megszerzésére se eddig, se a jövőben nem kívánjuk felhasználni.

Szeged 2003 augusztus

Boros Imre

Udvardy Andor

Cserpán Imre

Komonyi Orbán

Pápai Gábor