

## OTKA ZÁRÓJELENTÉS

**A p53 géncsalád tagjai daganat szupresszióban betöltött, transzkripcionális és kereszt-regulációs funkcióinak elemzése****(Analysis of the transcriptional activaton and cross-regulatoryfunctions of the p53 family members in tumour suppression by functional genomics)**A p53 géncsalád egyes tagjai által specifikusan szabályozott célgének azonosítása cDNS microarray technikával:

A humán p53 kulcsfontosságú szerepet játszik mind ultraibolya (UV), mind ionizáló sugárzás utáni megfelelő stressz-válaszban, míg a p73 aktivitását csak bizonyos DNS károsodást okozó ágensek indukálják, UV sugárzás nem. A *Drosophila melanogaster* p53-ről (Dmp53) megállapították, hogy szükséges az ionizáló sugárzás utáni stressz-válaszhoz, azonban szerepét az UV károsodás által indukált folyamatokban *Drosophila melanogaster*-ben eddig nem vizsgálták. Mi megállapítottuk, hogy a *Dmp53* mutáns drosophilák fokozottan UV érzékenyek. A Dmp53 által UV-C sugárzás hatására indukált célgének azonosítása céljából vad típusú és *Dmp53* mutáns állatok génexpressziós mintázatát hasonlítottuk össze cDNS microarray technológia alkalmazásával. Vad típusú állatokban 49 olyan gén mutatott indukciót, amelyek transzkriptumának szintje *Dmp53* null mutánsokban nem változott. E lehetséges Dmp53 célgének közül 13 gént kiválasztottunk, hogy UV általi indukciójukat független módszerrel, kvantitatív „real time PCR” technikával is megvizsgáljuk. UV általi Dmp53-függő indukciót találtunk 12 gén esetében, és ezeket tovább tanulmányoztuk annak megállapítására, hogy Dmp53-függő aktivációjuk röntgen okozta DNS károsodás hatására is megvalósul-e. A *hid* (*head involution defective*, egy pro-apoptotikus peptidet kódoló gén), a *rho* (*rhomboïd*, egy endopeptidázt kódoló gén), a *ball* (*ballchen*, egy kromatin-módosító enzimet kódoló gén), a *Grip75* (egy mikrotubulus-kötő fehérjét kódoló gén), az *l(1)dd4* (*lethal (1) discs degenerate 4*, szintén mikrotubulus-kötő fehérjét kódoló gén) és a *CG8319* gének Dmp53-függő aktivációt mutattak mind UV-C mind röntgen kezelés hatására. Az *Ark* (*Apaf-1-related-killer*), a *tou* (*toutatis*, egy kromatin-módosító fehérjékhez hasonló fehérjét kódoló gén), az *ftz-fl* (*fushi tarazu transcription factor 1*), az *ebi* (egy fehérjelebontás szabályozásában szerepet játszó fehérjét kódoló gén), a *CG5620* és a *CG11982* gének csak UV-C kezelés hatására mutattak megemelkedett Dmp53-függő expressziót, röntgen hatására nem. A Dmp53 már ismert célgénjének, egy másik pro-apoptotikus peptidet kódoló *reaper*-nek mRNS szintje viszont csak röntgen sugárzás hatására emelkedett meg, UV hatására nem

változott. Eredményeink elsőként mutatják ki, hogy a Dmp53 különféle DNS károsodás hatására különféle célgéneket aktivál. Eredményeinket publikáltuk. (Ujfaludi Z., Boros I. M., Balint E.: Different sets of genes are activated by p53 upon UV or ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*).

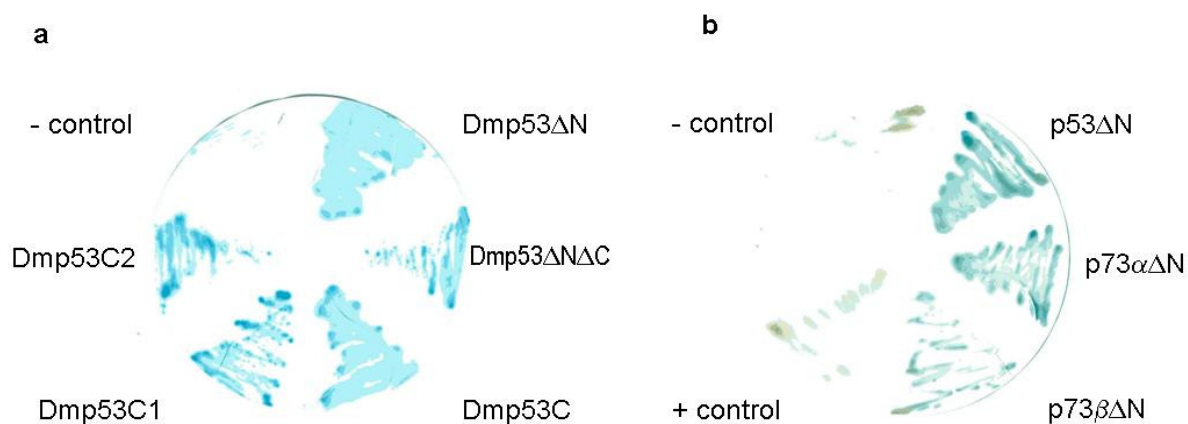
A p53-rokon fehérjék stabilitásának, transzkripció és apoptotikus aktivitásának szabályozása: fehérje-fehérje kölcsönhatás által:

A Dmp53-mal kölcsönhatásba lépő és aktivitását szabályozó fehérjék azonosítására az élesztő két-hibrid rendszert alkalmaztuk, mely során *Drosophila* embrionális cDNS könyvtárat szűrtünk az N-terminális transzkripció-aktivációs doménjétől megfosztott Dmp53-mal. E kísérleteink során az emlős Daxx fehérje *Drosophila* homológját, a DLP-t (Daxx like protein) mint Dmp53-vel kölcsönható fehérjét azonosítottuk. Emlősökben a Daxx fehérjéről kimutatták, hogy kölcsönhatásba lép mind a p53-mal, mind a p73-mal, azonban a p53 transzkripció aktivitására kifejtett hatása a szakirodalomban ellentmondásos. Bár a humán *daxx* gén 740 aminosavat kódol, a *Drosophila DLP* gén pedig 1659 aminosavat, a DLP fehérje Dmp53-kölcsönható régiója 51%-ban hasonló a Daxx p53-kötő régiójához. Megvizsgáltuk a *DLP* expresszióját különböző fejlődési stádiumokban kvantitatív „real time PCR” és *in situ* hibridizáció alkalmazásával, és megállapítottuk, hogy a *DLP* expressziója az egyedfejlődés során szabályozott.

A továbbiakban előállítottuk a *DLP* gén mutációit P elem imprecíz remobilizációjával. Megállapítottuk, hogy a mutáns *DLP* gént hordozó állatok, a *Dmp53* mutánsokhoz hasonlóan életképesek, de élettartamuk megrövidül, és a nőstények csökkent fertilitást mutatnak. A *Dmp53* mutáns állatokkal ellentétben azonban, a *DLP* mutánsok nem érzékenyek ionizáló sugárzásra, ami arra utal, hogy a DLP nem esszenciális a Dmp53 által röntgen hatására indukált stressz-válaszban. A *DLP* mutáció és Dmp53 megemelt expresszió genetikai kölcsönhatásának tanulmányozása során a *DLP* mutáció enhancer hatását találtuk, ami arra utal, hogy a vad típusú DLP fehérje a Dmp53 által irányított folyamatokat represszálhatja. Mivel a Daxx fehérjéről ismert, hogy hatása van a transzkripció szabályozására, megvizsgáltuk, hogy a Dmp53 transzkripció célgénjeiként azonosított, pro-apoptotikus gének, *reaper* és *Ark*, expressziója megváltozik-e DLP mutáns állatokban. A *reaper* mRNS szintjében nem találtunk különbséget, azonban az *Ark* mRNS szintje szignifikánsan alacsonyabb volt *DLP* mutáns - és hasonlóan *Dmp53* mutáns - lárvákban, mint vad típusú lárvákban. Továbbá DLP-t túltermelő törzsek vizsgálatakor azt találtuk, hogy az *Ark* mRNA szint drámaian megnövekedett, tehát megállapítottuk, hogy a DLP szerepet játszik

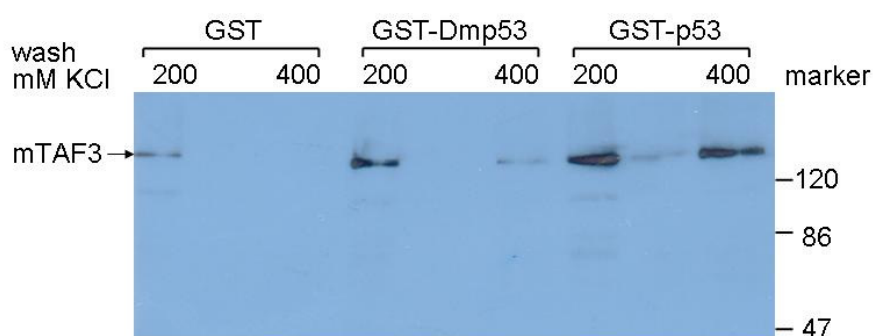
az *Ark* gén bazális aktivitásának fenntartásában. Ezen eredményeink publikálása folyamatban van. (Bodai L, Pardi N, Újfaludi Z, Bereczki O, Komonyi O., Balint E., Boros I.M.: Daxx-like protein of *Drosophila* interacts with Dmp53, and effects longevity and *Ark* mRNA level.)

Élesztő két-hibrid módszerrel Dmp53-kölcsönható fehérjeként azonosítottunk egy TATA-kötő fehérje asszociált faktort, a TFIID egy eddig kevésbé jellemzett alegységét, a TAFII155-t. A TAFII155 Dmp53-kötő régióját a fehérje középső részére lokalizáltuk (787-966. aminosavig), és megállapítottuk, hogy a TAFII155 a Dmp53 C terminális oligomerizációs (C1) és bázikus szabályozó doménjével (C2), valamint gyengébben a

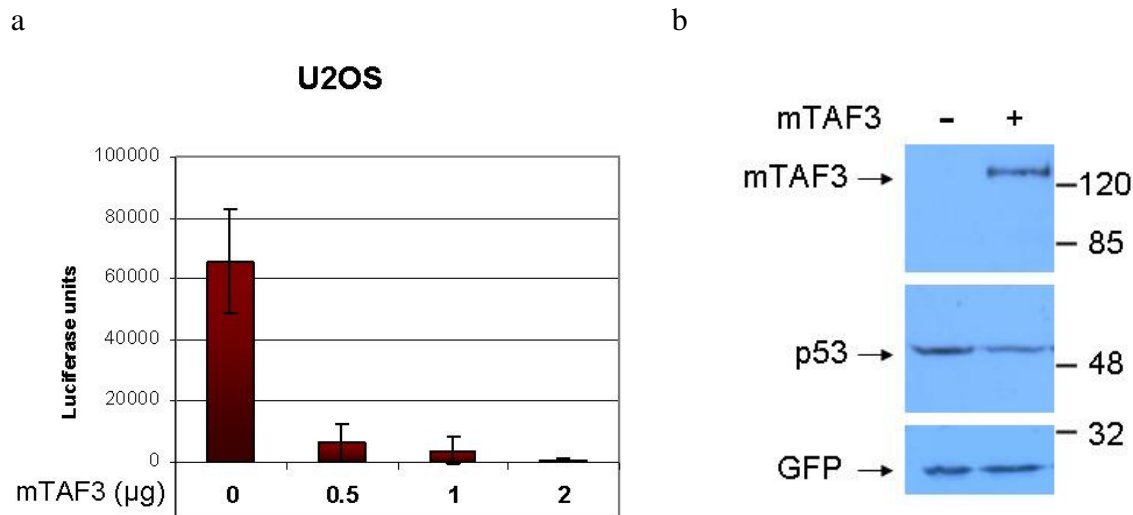


**1. ábra. A TAFII155 és a p53 családtagok kölcsönhatásának kimutatása élesztő kettős hibrid kísérletekkel.** Aktivációs doménhez fuzionált *Drosophila* cDNS könyvtárat szűrtünk *lexA* DNS kötő doménhez fuzionált, aktivációs doménjétől megfosztott Dmp53-mal élesztő kettős hibrid módszer alkalmazásával. Fehérje-fehérje kölcsönhatás a His- auxotófia komplementációját és a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás indukcióját eredményezi, ami filteren kimutatható. A szűrés során azonosított részleges TAFII155 klónt (561-966 aminosavak a TAFII155-ből) használtuk a további kísérletekben, kivéve a +kontrollt. (a) TAFII155 több helyen is kölcsönhat a Dmp53 fehérjével. Dmp53 $\Delta$ N: 47-385 aminosavak, Dmp53 $\Delta$ N $\Delta$ C: 47-294 aminosavak, Dmp53C: 277-385 aminosavak, Dmp53C1: 277-351 aminosavak, Dmp53C2: 349-385 aminosavak a Dmp53 fehérjéből, negatív kontroll: TAFII155(561-966) és ADA2 (egy transzkripciós adaptor/koaktivátor) kotranszfekciója. (b) TAFII155 kölcsönhatásba lép a humán p53-mal, és a p73 különböző izoformáival. p53 $\Delta$ N: a p53 160-393 aminosavja, p73 $\alpha$  $\Delta$ N: a p73 $\alpha$  248-636 aminosavja, p73 $\beta$  $\Delta$ N: a p73 $\beta$  248-499 aminosavja, pozitív kontroll: rpb4 és rpb7 (RNS polimeráz II alegységek) kotranszfekciója, negatív kontroll: ugyanaz, mint az (a) részen.

középső DNS-kötő doménnel is kölcsönhat (1a ábra). A kötődést „GST pull down” módszerrel *in vitro* is megerősítettük. További élesztő két-hibrid kísérletben kimutattuk, hogy a TAFII155 fehérje nemcsak a Dmp53-mal, hanem a humán p53-mal, sőt a p53 géncsalád másik két tagjával a p73 $\alpha$  és p73 $\beta$  fehérjékkel is képes interakcióba lépni (1b ábra). A továbbiakban a TAFII155 emlős homológját a TAF3-t vizsgáltuk *in vitro* „GST pull down” és ko-immunprecipitációs kísérletekkel, és kimutattuk, hogy a TAF3 is képes mind a Dmp53-hoz, mind a p53-hoz egyaránt kötödni (2. ábra), tehát a kölcsönhatás evolúcionárisan konzervált. Megvizsgáltuk a TAF3-nak a p53 és családtagjai transzkripciós aktivitására kifejtett hatását luciferáz riporter alkalmazásával. A TAF3 túltermelése vad típusú endogén p53-t expresszáló U2OS sejtekben igen erősen gátolta a p53-függő riporter aktivitását (3a ábra). Hasonlót tapasztaltunk HeLa sejtekben transzfektált p53 esetén, továbbá p73 $\alpha$  vagy  $\beta$  p53-függő luciferáz riporterrel és TAF3-mal történő kotranszfekciója esetén. Tehát megállapítottuk, hogy a megnövekedett TAF3 expresszió gátolja a p53, a p73 $\beta$  és kisebb mértékben a p73 $\alpha$  transzkripciós aktivitását. Megvizsgáltuk immunoblot illetve „real time PCR” alkalmazásával, hogy a TAF3 befolyásolja-e a p53 fehérje illetve mRNA szintjét. Azt találtuk, hogy TAF3 túltermelése a p53 fehérje szintjének csökkenéséhez vezet (3b ábra), azonban a p53 transzkriptum szintje nem változik. Ezen eredményünk arra utal, hogy a TAF3 a p53 fehérje szintjének csökkentése révén (is) gátolja a p53-szabályozott transzkripciót.



2. ábra. Az emlős TAF3 kölcsönhat mind a *Drosophila* mind a humán p53-mal. Ízeltlábú sejtvonalon túltermelt egér TAF3-t (mTAF3) inkubáltunk GST-Dmp53-kötött illetve GST-hp53 kötött gyöngyökkel. Negatív kontrollként GST-gyöngyöt használtunk. Az interakció erősségét különböző só-koncentrációs mosást alkalmazva (200 ill. 400 mM KCl) vizsgáltuk. Elúció után a TAF3-t Western blottal mutattuk ki 39TA1C7 poliklonális anti-TAF3 ellenanyag felhasználásával.



**3. ábra. A TAF3 túltermelése erősen gátolja a p53 transzkripció aktivitását és csökkenti a p53 fehérje szintjét.** (a) U2OS sejteket p53 által aktiválható luciferáz riporter konstrukcióval és üres vektorral (0) vagy a feltüntetett mennyiségű (0,5 µg, 1 µg vagy 2 µg) TAF3-t túltermelő plazmiddal kotranszfektáltuk, majd 24 óra elteltével a luciferáz aktivitást mértük. (b) U2OS sejteket üres vektorral (-) vagy mTAF3-t túltermelő plazmiddal (+) és kontrollként GFP-t expresszáló konstrukcióval kotranszfektáltuk. A fehérje szintet Western blotting után a anti-TAF3 (felső panel), anti-p53 (középső panel) és anti-GFP (alsó panel) ellenanyagok felhasználásával analizáltuk.

A p53-kölcsönható fehérjéket kódoló gének daganatok kialakulásában betöltött esetleges szerepének vizsgálatára tanulmányoztuk 4 mutáns p53-t tartalmazó humán daganat-sejtvonalban (Ramos, K562, THP-1, és Jeg-3), és 5 vad típusú p53-t tartalmazó humán daganat-sejtvonalban (Sw1353, HT1080, 293PT, RVH1 és HeLa), valamint normál fibroblastban (MRC5) a Daxx és a TAF3 gének expresszióját. Bár voltak különbségek az expressziós szintben, ezek nem korreláltak a p53 státuszával.

#### A p53 géncsalád tagjainak szabályozása poszttranszlációs módosítás által:

Élesztő két-hibrid kísérleteinkben a sumoiláció folyamatában szerepet játszó mindhárom enzim-típus képviselőjét (UBA2: E1 ubikvitin-aktiváló enzim, UBC9: E2 ubikvitin-konjugáló enzim, PIAS1: E3 ubikvitin ligáz) Dmp53-mal kölcsönhatóként azonosítottuk. A p53 fehérjéről és a p73 különböző izoformáiról már kimutatták, hogy sumoiláció történik rajtuk, ezért feltételezzük, hogy valószínűleg a Dmp53 is sumoilálódik. A

sumoiláció Dmp53-re kifejtett lehetséges szerepének vizsgálatához csak nem-sumoilálható Dmp53 fehérjét expresszáló *Drosophila*-kat állítottunk elő úgy, hogy a fehérje egyetlen sumoilációs konszenzus szekvenciájában a sumoilálható lizint argininre mutáltuk (K302R) és ezt a nem-sumoilálható p53 fehérjét valamint a vad típusút GAL4-UAS expressziós rendszerrel *Dmp53* null *Drosophilák*ban túltermeltük. Vadtípusú p53 általános expressziót biztosító driverrel való túltermelése késői báb-letalitást okozott, míg a Dmp53K302R túltermelése már L2 lárvastádiumban letalitást okozott. A Dmp53K302R mutánsal kapott erősebb fenotípust megnövekedett apoptotikus aktivitásra utal. Hasonló erőteljesebb apoptotikus aktivitásra utaló súlyosabb fenotípusokat tapasztaltunk számos más driver alkalmazásával is, például az engrailed driverrel, amely bizonyos szegment-részekben biztosít expressziót, a vad típusú Dmp53 becsípett szárnyat eredményezett, míg a nem-sumoilálható mutáns letalitást. Megvizsgáltuk, hogy a megnövekedett apoptózis megemelkedett expresszióknak köszönhető-e. A Dmp53K302R mRNS szintje nem volt magasabb, mint a vad típusúé, viszont a mutáns Dmp53 fehérje szintje sokszorososa volt a vad típusú Dmp53 fehérje szintjének. Tehát a megnövekedett apoptózist megemelkedett fehérje szint okozza, ami arra utal, hogy a mutáció a fehérje degradációját befolyásolja. Bár a 302. lizin nem csak sumoilációnak, hanem ubikvitinációnak és esetleg acetilációnak is szubsztrátja lehet, eredményeink, amelyek a Dmp53 és számos sumoilációban szerepet játszó enzim kölcsönhatását mutatják, arra engednek következtetni, hogy a sumoilációnak is szerepe lehet a Dmp53 fehérje stabilitásának szabályozásában.

#### A p73 izoformák izoforma-specifikus lebontásának és szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata:

Az Mdm2 E3 ubikvitin ligázról ismert, hogy a p53-t proteasomális lebontásra és nukleáris exportra jelöli ki. A holland laboratóriummal együttműködésben megvizsgáltuk, hogy az Mdm2 hogyan szabályozza a különböző p73 izoformákat. Azt találtuk, hogy a p73 $\alpha$  izoformára az Mdm2-nek nincs hatása, a p73 $\gamma$  és  $\epsilon$  izoformákat proteasomális lebontásra jelöli ki, a  $\beta$  és  $\delta$  izoformákat azonban stabilizálja. Az Mdm2-nek az izoformák sejten belüli lokalizációjára is differenciális hatása van: míg a p73  $\epsilon$ -t és  $\gamma$ -t a p53-hoz hasonlóan a citoplazmába küldi, addig a p73 $\delta$  egyenletes nukleáris eloszlású marad, az  $\alpha$  és  $\beta$  izoformák pedig a sejtmagon belül szemcsékbe lokalizálódnak. A COP1 RING-ujj domaint tartalmazó E3 ubikvitin ligázról a közelmúltban írták le, és p73-ra gyakorolt hatását még nem vizsgálták. Mi azt találtuk, hogy a COP1 lebontja a p73  $\alpha$ -t,  $\beta$ -t,  $\gamma$ -t, és  $\delta$ -t, azonban stabilizálja a p73  $\epsilon$ -t. A lebontásnak funkcionális következménye is van, ugyanis kimutattuk, hogy a COP1 gátolja

a p73  $\alpha$  és  $\beta$  által indukált apoptózist. Az MDM2-től eltérően azonban a COP1 nem változtatja meg a p73  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\delta$  szubcelluláris lokalizációját, ezek az izoformák nukleárisak maradnak. Ellenben a p73-nak hatása van a COP1 szubcelluláris lokalizációjára: az egyébként citoplazmatikus eloszlást mutató COP1 a nukleuszba relokalizálódik p73  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\delta$  expressziója esetén. Tovább vizsgáltuk a p73-nak a COP1-re gyakorolt hatását, és megállapítottuk, hogy a p73  $\gamma$  izoforma a p53-hoz hasonlóan indukálja a *COP1* gén expresszióját, míg az  $\alpha$  és  $\beta$  izoformák nem. Tehát egyes p73 izoformák és a COP1 között negatív visszacsatolás áll fenn, a p53-Mdm2 negatív visszacsatolósos körhöz hasonlóan.

Az együttműködés keretében Bereczki Orsolya, Ph.D. hallgató öt napot töltött Hollandiában, Dr. Marion Lohrum laboratóriumában. E tanulmányút alatt megismerkedett a kromatin immunprecipitáció módszerrel, amelyet ezután laboratóriumunkban is bevezettünk.

Mivel a projekt jelentős eredményeinek impakt faktorról rendelkező folyóiratcikkben történő közzétételét később, 2 éven belül tervezzük, kérjük, hogy ezen jelentésben foglaltak alapján születtett minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeket.