



Doctoral Thesis

Structural and biochemical studies on human TAF2

Author(s):

Mijuskovic, Martina

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005462021> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 17313

STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON HUMAN
TAF2

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
MARTINA MIJUSKOVIC
Dipl. Eng. Biol., Univ. of Zagreb, Croatia
born March 26, 1979
citizen of Croatia

accepted on the recommendation of
Prof. Timothy J. Richmond, examiner
Prof. Rudolf Glockshuber, co-examiner

2007

SUMMARY

Eukaryotes have thousands of genes whose expression must be tightly regulated to ensure the organism's survival, growth and development. Synthesis of messenger RNA, a process known as transcription by RNA polymerase II, is a first step in the expression of protein-coding genes. RNA polymerase II core promoter is the most important element in the control of transcription initiation. It is the ultimate target of action of all factors that are involved in the regulation of class II gene transcription. For RNA polymerase II to accurately and efficiently initiate transcription from the core promoter, it requires a set of "general transcription factors". These include the transcription factors (TF) IIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, and TFIIF. TFIID is a multisubunit complex composed of the TATA-box binding protein (TBP) and up to 14 TBP-associated factors (TAFs). It has a variety of functions, including core promoter recognition and enzymatic activities that are thought to assist in transcription activation.

The focus of this work is human (h) TAF2, the second largest subunit of human TFIID which is implicated in the recognition of initiator core promoter element together with hTAF1. The purification protocol of recombinantly produced hTAF2 is developed that provides enough material for crystallization experiments and biochemical characterization of hTAF2. By combination of limited proteolysis and gel filtration studies, hTAF2 is shown to consist of two structural domains. One is a large globular domain of compact structure and 116 kDa in size. This domain represents the structural core of hTAF2. The other domain, termed "TAF2 tail", is structurally disordered and 22 kDa in size.

Finally, functional analysis of hTAF2 revealed that it has non-specific DNA binding activity, localized to the lysine-rich tail domain. This activity might add to the recognition of core promoter by TFIID, but can not be responsible for the specific sequence recognition itself. *In vitro* binding experiments with human TAF8/TAF10 complex showed that hTAF2 directly interacts with this complex. This result reveals important new information about the architecture of TFIID.

RÉSUMÉ

Les organismes eucaryotes possèdent des milliers de gènes dont l'expression doit être finement régulée pour assurer leur survie, croissance et développement. La synthèse de l'ARN messager, connue sous le nom de transcription dépendante de l'ARN polymérase de type II (ARN pol II), constitue une première étape dans le processus d'expression des gènes codant pour des protéines. La séquence cœur des promoteurs dépendants de l'ARN pol II est l'élément le plus important du contrôle de l'initiation de la transcription. Il est la cible ultime de l'action de tous les facteurs qui sont impliqués dans la régulation de la transcription des gènes de classe II. L'initiation de la transcription par l'ARN pol II, à partir de la séquence cœur du promoteur, requiert précision et efficacité ce qui nécessite le recours à une série de facteurs de transcription dits « généraux ». On compte les facteurs de transcription (TF, Transcription Factors) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, et TFIIH. TFIID est un complexe multimérique composé de la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP, TATA box Binding Protein), et jusqu'à 14 facteurs associés à la TBP (TAF, TBP Associated Factors). Il possède une variété de fonctions dont la reconnaissance du promoteur et des activités enzymatiques dont on pense qu'elles favorisent l'activation de la transcription.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur TAF2 humain (hTAF2), la deuxième plus grande sous-unité de TFIID. hTAF2 est impliqué, avec hTAF1, dans la reconnaissance de l'élément initiateur de la transcription dans la séquence cœur du promoteur. Le protocole développé pour la purification de hTAF2, produit de manière recombinante, permet l'obtention de matériel en quantité suffisante pour la réalisation d'expérience de cristallisation et la caractérisation biochimique de hTAF2. De plus, la combinaison d'études par protéolyse ménagée et de filtration sur gel a montré que hTAF2 est constitué de deux domaines structuraux. L'un, le cœur structural de hTAF2, est un large domaine globulaire de structure compacte et de taille 116kDa. L'autre domaine, de taille 22 kDa, appelé « domaine queue de TAF2 » est structurellement désordonné.

Enfin, les études fonctionnelles réalisées ont révélé que hTAF2 possède une activité spécifique de liaison à l'ADN, localisée dans le « domaine queue » riche en lysine. Cette activité pourrait favoriser la liaison de TFIID à la séquence cœur du promoteur, mais ne peut pas être responsable en elle-même de la reconnaissance spécifique du promoteur. Par ailleurs, les

tests de liaison réalisés *in vitro* ont montré que hTAF2 interagit directement avec le complexe TAF8/TAF10. Ce résultat révèle d'importantes informations novatrices concernant l'architecture de TFIID.