

# Pre-inisiyasyon transkripsiyon kompleksi proteinlerinden TAF7'nin Ser159 mutasyonu hücre döngüsü G2/M geçişinde yığılma yol açıyor

[Ser159 mutation of the pre-initiation complex protein TAF7 CAUSES A G2/M block in cell cycle]

Dilek Göktürk<sup>1</sup>,

Halil Ateş<sup>2</sup>,

Zeynep Sercan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir;  
<sup>2</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı, İzmir

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Zeynep Sercan

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,  
35340 İnciraltı, İzmir, Türkiye  
Telefon: +90 232 4124608  
E-posta: zeynep.sercan@deu.edu.tr

Kayıt Tarihi: 27 Ağustos 2013; Kabul Tarihi: 12 Temmuz 2014  
[Registered: 27 August 2013; Accepted: 12 July 2014]

## ÖZET

**Amaç:** Transkripsiyonun kontrolünde “TATA Bağlayan Protein (TBP) Asosiye Faktörlerin” (TAF) rol oynadığı düşünülmektedir. Bu TAF’lardan TAF7, transkripsiyon ve hücre döngüsünün düzenlenmesi ile ilgili olarak üzerinde durulan proteinlerden bir tanesidir. TAF7’nin tam ve doğru bir kompleks oluşana kadar transkripsiyonu baskıladığı, ancak tam ve doğru bir kompleks oluştuğunda transkripsiyonun başlamasına izin veren bir kontrol noktasında görev aldığı ileri sürülmüştür. TAF7 hücre döngüsünün regülasyonunda da rol oynadığı ve G2/M geçişinde, Ser159 aminoasidinden fosforillendiği bildirilmiştir. Ancak TAF7’nin hücre döngüsü kinetikleri üzerindeki doğrudan etkisi bilinmemektedir. Bu etkiyi incelemek amacıyla tetrasiklinle regüle edilen (TRES) sistem ile HeLa hücrelerinde, TAF7’nin yabancıl ve Ser159 mutant formlarının yüksek düzeyde kontrollü ekspresyonlarını sağlayarak hücre döngüsü analizlerini gerçekleştirdik.

**Metod:** Bölgeye yönelik mutagenез yöntemi ile TAF7’nin Ser159 aminoasidi alanine dönüştürüldü. Yabancıl tip ve mutant TAF7 genleri klonlandı ve tetrasiklin ile indüklenebilen bir ekspresyon sistemine klonlanan plazmidlerin stabil transkripsiyonu gerçekleştirildi. Akım sitometrisiyle hücre DNA içeriği incelenerek hücre döngüsü analizleri gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Fosforillenemeyen Ser159 mutant TAF7 barındıran hücreler, hücre döngüsünün G2/M geçişinde yığılma gösterdi. Sonuçlarımız TAF7 Ser159 fosforilasyon mutantı hücrelerin döngüye girme ve M fazına kadar ilerlemede bir sorun yaşamadıklarını ancak mitoz aşamasına geçişte defektif olduklarını göstermektedir.

**Sonuç:** Bulgularımız TAF7’de gözlenen Ser159 modifikasyonunun işlevsel bir karşılığı olduğunu göstermekte ve hücre döngüsü kontrolünde daha önce çalışılmamış bir protein grubunun önemini vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** TAF7, TAF proteinleri, transkripsiyon, genetik regülasyon, hücre döngüsü.

**Çıkar Çatışması:** Yazarların çıkar çatışması yoktur.

## ABSTRACT

**Objective:** TATA Binding Protein (TBP) associated factors (TAFs) have been shown to participate in transcriptional regulation. TAF7 is one of the TAFs, which role has been emphasized in the regulation of transcription and cell cycle. It has been suggested that TAF7 acts at a check point at the initiation of transcription by not leaving the pre-initiation complex until it is completely and correctly built. It has also been reported that TAF7 play a role in cell cycle regulation and is hyper-phosphorylated on Ser159 at the G2/M checkpoint. To study the effect of this phosphorylation on cell cycle kinetics, we did cell cycle analyses on WT and TAF7 Ser159 mutant cells in a tetracycline controlled expression system.

**Methods:** TAF7’s Ser159 amino aside was converted to Ala159 by site directed mutagenesis. Both WT TAF7 and Ser159 mutant TAF7 vectors were cloned into tetracycline controlled expression plasmids and stable transfected into HeLa cells. Cell cycle analyses were performed by measuring DNA content by flow cytometry.

**Results:** Cells stably transfected with mutant TAF7 accumulated at the G2/M checkpoint. These cells displayed no defect in entering the cell cycle or in passing through S phase.

**Conclusion:** Our results suggest that TAF7’s Ser159 phosphorylation has a functional yet undefined role in G2/M transition of the cell cycle; and emphasizes the need for more intensive studies.

**Key Words:** TAF7, transcription, genetic regulation, cell cycle.

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Giriş

Gen transkripsiyonu büyük ölçüde kendilerine özgü dizi motiflerini tanıyan transkripsiyon faktörlerinin promotör bölgelere bağlanması, transkripsiyonda görev alan molekülleri kendisine çekmesi ve aktive etmesi ile gerçekleşir. Ökaryotik hücrelerde transkripsiyonun başlaması için öncelikle RNA polimeraz II'nin genel transkripsiyon faktörleri ile bir kompleks oluşturarak promotöre bağlanması gerekmektedir. Pre-inisiyasyon kompleksi olarak adlandırılan bu yapıda, genel transkripsiyon faktörleri (GTF) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF ve TFIIH bir araya gelerek promotör üzerinde karmaşık bir yapı oluşturur ve RNA polimeraz II karboksil terminalini fosforilleyerek, transkripsiyonu başlatması sağlanır. Promotöre ilk bağlanan GTF TFIID'dir. Promotörün TATA kutusuna bağlanan TFIID, TBP'den (TATA Bağlayan Protein) ve TAF'lardan (TBP asosiye faktörlerden) oluşmaktadır [1,2]. Uzun zaman TFIID yapısında yer alan TAF'ların yapısal proteinler oldukları düşünülmüş; ancak son yıllarda bunların işlevsel özellikleri de tanımlanarak farklı hücresel süreçlerde düşünülen çok daha karmaşık etkileşimlerde buldukları ortaya çıkmıştır. TAF'lardan biri olan TAF7, transkripsiyon kontrolü ile ilgili olarak üzerinde durulması gerekli proteinlerden bir tanesidir. TAF7, bir diğer TAF proteini olan TAF1 ile birlikte ökaryotik transkripsiyonun başlama evresinde (inisiasyonda) önemli rol oynar. TAF1'in protein kinaz (PK) ve asetiltransferaz (AT) katalitik aktivitesine sahip olduğu ve AT aktivitesiyle histon H3 asetilasyon seviyelerinin düzenlenmesinde rolü olabileceği gösterilmiştir [3,4]. Pre-inisiasyon kompleksinde TAF7, TAF1'in AT aktivitesine sahip bölgesine bağlanarak baskılar. Böylelikle TAF1'in AT aktivitesine ihtiyaç duyan promotörlerde transkripsiyonel başlama, TAF7 tarafından engellenir [5]. TAF7'nin, bir kontrol noktasında işlev görerek, pre-inisiasyon kompleksinin tam ve doğru bir şekilde bir araya gelmesinden sonra kompleksden ayrıldığı ve TAF7 varlığıyla baskılanan transkripsiyonun -bu ayrılmayla- tekrar başlayarak tamamlandığı ileri sürülmüştür [6]. Yukarıda bahsedilen TAF1'e ait PK ve AT aktivitesinin memeli hücrelerde hücre döngüsü için gerekli genlerin transkripsiyonu için önemli olduğu bilinmektedir [7]. Siklin ve siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar) hücre döngüsü kontrolünde görevli, çok önemli proteinlerdir [3,8]. Ekspresyonları döngüsel özellik gösteren bu proteinlere ait genlerin transkripsiyonel kontrolünde histon modifikasyonları önemli rol oynamaktadır. Örneğin histon H3 asetilasyonunun döngüsel siklin D1 ve siklin A transkripsiyonunu uyardığı gösterilmiştir. Yüksek düzeyde ekspresyon ve siRNA ile ekspresyonu baskılama deneyleri, TAF7'nin bu genlerin promotörlerinde bir transkripsiyonel baskılayıcı (represör) olarak davrandığını düşündürmektedir [4]. TAF7'nin düzenleyici işlevleri olduğunu destekleyen bir diğer bulgu da hücre döngüsünde G2/M geçişinde Ser159 amino asidinin fosforillenmesidir [6]. Bu fosforillenmenin önemi tanımlanamamış olsa da TAF7'nin hücre döngüsünün transkripsiyonel kontrolün-

de rol oynadığı görüşünü kuvvetlendirmektedir.

Her ne kadar TAF7'nin hücre döngüsü genlerinin transkripsiyonel kontrolünde farklı aşamalarda rol oynadığı ileri sürülmüşse de bu bulguların doğrudan hücre döngüsü kinetikleri üzerindeki etkileri araştırılmamıştır. TAF7'nin hücre döngüsü kinetikleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla tetrasiklinle regüle edilen (TREX) sistem ile HeLa hücrelerinde, TAF7'nin yabancı ve Ser159 mutant formlarının yüksek düzeyde kontrollü ekspresyonlarını sağlayarak hücre döngüsü analizlerini gerçekleştirdik.

## Gereç ve Yöntemler

### *Hücre hatları ve hücre kültürü*

Deneylerde HeLa hücre hattı (ATCC, katalog no:CCL-2™) ve T-REx™HeLa hücre hattı (İnvitrogen, katalog no:R714-07) kullanıldı. T-REx™HeLa hücreleri, deneylerde kullanılan ve ileride detayları verilecek tetrasiklinle düzenlenen ekspresyon sisteminin represörünü (baskılayıcısını) stabil olarak eksprese etmektedir. HeLa hücreleri %10 FBS, 2 mM L-glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ortamında üretilirken; T-REx™HeLa hücrelerinin ortamına yukarıdakiler ek olarak 5µg/mL blastisidin eklendi. Tüm hücreler 37°C, %5 CO2 koşullarında üretildi. Tüm hücrelerin üretiminde tetrasiklin "free" FBS (Hyclone) kullanıldı.

### *TAF7 geninin polimeraz zincir tepkimesiyle (PZT) çoğaltılması*

Memeli ekspresyon vektörüne klonlanacak TAF7 geni öncelikle polimeraz zincir tepkimesi ile çoğaltıldı. PstI ve XbaI restriksiyon enzim (RE) kesim bölgelerini içeren ileri 5'CTA TCT GCA GTA GCT GGA ACT TTT TAG ve geri 5'CCA GTC TAG AAG ACT GAA ATT AAA TATC primerler kullanılarak hedef bölge çoğaltıldı. 1mM MgCl2, 200µM dNTP, 1,25U yüksek doğrulukta Taq DNA polimeraz (Fermentas, katalog no:K0191), 1X reaksiyon tamponu (Fermentas, katalog no:K0191), 1ng plazmid DNA, 0,4µM ileri ve geri primerleri içeren PZT karışımı hazırlandı. Termal profil 94°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyonu takiben, 30 döngü boyunca 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye tavlama, 68°C ve her döngüde 0,1°C arttırma koşulunda uzatma ve 68°C'de 10 dakika son uzatma olarak uygulandı. PZT sonucunda 1157 baz çifti büyüklüğündeki ürün %0,8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi.

PZT ile çoğaltılan ve TAF7 genini içeren 1157 baz çifti büyüklüğündeki ürün vektöre klonlandıktan sonra elde edilen klonlarda ürün varlığı yine aynı termal koşullarda PZT ile kontrol edilmiştir. Bu aşamada yine TAF7'ye ait ancak daha küçük ürün veren primerler (5' primer CCG CTC GAG AGT AAA AGC AAA GAT GAT GCT CCT CAC; 3' CCA TAA CAC AGG GCA CTA GTG CCC TGT GTT ATGG) kullanılmıştır. PZT amplifikasyon ürünü 211bp'dir.

### ***Tetrasiklinle düzenlenen ekspresyon sistemi ve klonlama***

Geçici transfeksiyon yönteminde transfeksiyon etkinliğinin her zaman yüksek ve tekrarlanabilir olmamasının yaratabileceği problemlerin önüne geçmek amacıyla tetrasiklin ile indüklenebilen bir ekspresyon sisteminin kullanılmasına karar verildi (Invitrogen, katalog no:K1020-01). Sistemin plazmidini olan pcDNA4TO'ya TAF7 klonlandı. pcDNA4TO'ya TAF7 klonlanması için, PZT sonrası saflaştırılmadan çoğaltılan edilen TAF7 ürünü ve pcDNA4TO plazmidini, XbaI (Fermentas, Katalog no:ER0681) ve PstI (Fermentas, Katalog no:ER0611) restriksiyon enzimleri ile kesildi. Ürünler agaroz jelden DNA saflaştırma kiti (Roche, katalog no:11696505001) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde saflaştırıldı. Ligasyon reaksiyonu için (Ligasyon kiti, Roche katalog no:11635379001) su, IX reaksiyon tamponu, 5U ligaz enzimi, 1:1 (100ng:100ng), 1:2 (100ng: 200ng) ve 1:3 (100ng:300ng) oranlarında saflaştırılmış TAF7 ve pcDNA4TO plazmidini enzim kesim ürünleri, 25 µl'lik toplam hacimde hazırlandı ve 22°C'de 5 dakika inkübe edildi. Ligasyon ürünlerinin 5'er µl'siyle kompetan bakteriler (Invitrogen, katalog no:12297-016) ürün protokolü takip edilerek transforme edildi. Transformasyon işlemi sonrası bakteriler, 100µg/ml ampisilinli LB agar petrilere ekilerek 24 saat 37°C de inkübe edildi. Yirmi dört saat sonra kenarları düzgün ve hacimce büyük olan koloniler seçilerek, 25µg/ml zeosin (Invitrogen, katalog no: R250-01) içeren 5'er ml'lik LB ortamlara ekildi ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Mini-prep plazmid izolasyonları, mini-prep plazmid izolasyon kiti (Roche, katalog no: 03143414001) kullanılarak, kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

### ***Bölgeye yönelik mutagenезle TAF7 Ser159 mutantının oluşturulması***

TAF7'nin fosforillenmemesinin hücre döngüsü üzerindeki etkilerini araştırmak için Invitrogene marka "GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen, katalog no:12397-014)" kullanılarak pcDNA 4 TO TAF7 plazmidindeki TAF7 geninin serin 159 amino asidi, alanin amino asidine dönüştürüldü. Mutagenез için serin159 (TCT) yerine alanin159 kodonunu (GCT) barındıran ve birbirileri ile örtüşen ileri (5'CAAAGAAGAAATATATTGAAGCTCCAGATGTTG) ve geri (5'TTCAATATATTTCTTCTTTGCTGTCTTCCG) primerler oluşturuldu ve üretici firmanın protokollerine uyularak mutagenез gerçekleştirildi. Mutant TAF7 genini içeren plazmidin çoğaltılması için, kompetan bakteri (Invitrogen, katalog no: 18258-012) transformasyonu sonrası, 100µg/ml konsantrasyonunda ampisilin içeren LB agar ortamına ekimi, koloni seçimi, 1L hacimde 100µg/ml ampisilin içeren sıvı LB ortamında üretilmesi ve maxi-prep plazmid izolasyonları (Qiagen, EndoFree Plasmid Maxi Kit ile - katalog no:12362) yapıldı. Tüm klonlanan plazmidlerde "insertlerin" doğru yönde yerleşip yerleşmediği ve herhangi bir mutasyon taşıyıp taşımadığının kontrolü

için DNA dizi analizleri yaptırıldı.

### ***Optimum tetrasiklin/doksisisiklin dozunun belirlenmesi:***

pcDNA4TO plazmidine TAF7 geninin klonlanmasından sonra, kullanılacak tetrasiklin/doksisisiklin dozunun optimize edilmesinde LacZ genini içeren pcDNA4TO/LacZ kontrol plazmidini kullanıldı. LacZ geni β-galaktosidaz enzimini eksprese eder. Aynı sistemde, tetrasiklin ile regülen edilen LacZ geninin ürünü olan β-galaktosidaz enziminin aktivitesi ölçülerek optimum tetrasiklin/doksisisiklin dozu belirlendi. β-galaktosidaz enziminin aktivitesi ölçümü için β-Gal Assay Kit (Invitrogen, katalog no: K1455-01) kullanıldı.

### ***Stabil transfeksiyon***

pcDNA4TO-TAF7 ve TAF7 mutant plazmidleri T-REx™ HeLa hücre hattına Fugene HD (Roche, katalog no:04709691001) transfeksiyon ajanı kullanılarak, ürün protokolünde önerilen yöntemle transfekte edildi. Transfeksiyondan bir gün sonra ortam değiştirilip, daha önceden optimum konsantrasyonu belirlenmiş (1000µg/ml) zeosinli ortamda hücreler 2 ay idame ettirilerek stabil klonların oluşması sağlandı. Kolonilerden ayrı ayrı çoğaltılarak, hücreleri elde edilen her bir klon numaralandırıldı. Her birine 24 saat boyunca 1000 ng/ml doksisisiklin uygulanıp hücre lizatları hazırlandı ve TAF7 antikoruyla (Abcam katalog no:ab57494) western blotları yapıldı. Doksisisiklin (1000ng/ml) eklendiğinde en yüksek verimlilikte TAF7 ve mutant TAF7 eksprese eden klonlar belirlenerek deneylerin devamı için seçildi.

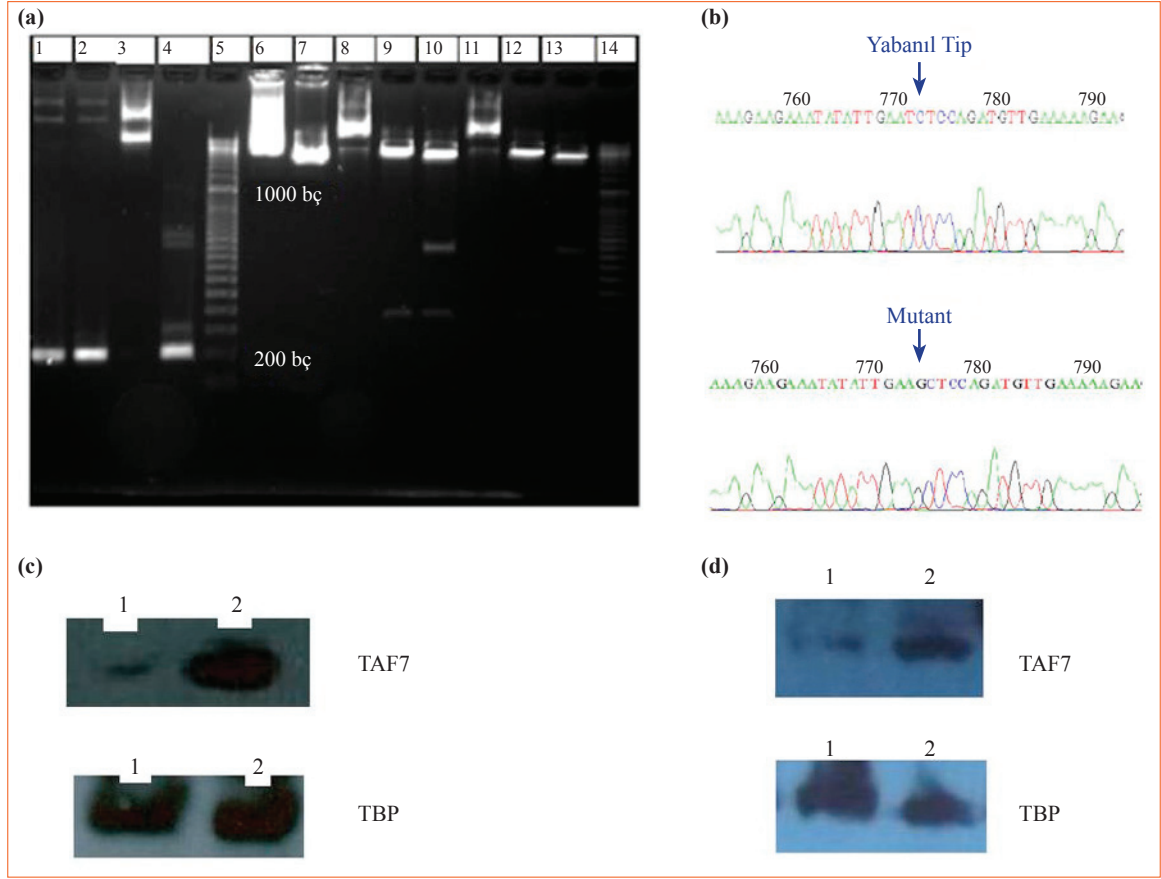
### ***Akım sitometrisi ile hücre döngüsü analizleri***

Yabancıl tip (normal) TAF7'ye göre TAF7<sup>S159A</sup> mutantının hücre döngüsüne olan etkilerini inceleme amacıyla TAF7<sup>S159A</sup> mutantını ve yabancıl tip TAF7 ifade eden hücreler karşılaştırıldı. Tüm hücreler öncelikle serumuz ortamda 24 saat üretilerek senkronize bir populasyonun oluşması sağlandı. Tetrasiklinle regüle edilen ekspresyon sisteminde, yabancıl TAF7 T-REx™ HeLa hücreleri ve Ser159 mutant TAF7 içeren T-REx™ HeLa hücreleri, 500ng/ml doksisisiklin (bir tetrasiklin analogu) ile 24 saat inkübe edilerek TAF7'nin yüksek düzeyde ekspresyonu sağlandı. Hücre DNA içeriği, hücre döngüsü analiz kiti (BD Cycletest Plus DNA reagent kit-katalog no:340242) kullanılarak belirlendi. Kit protokolünde yazdığı şekilde hücreler floresan bir boya olan propidiyum iyodid (PI) boyandı ve DNA içerikleri akım sitometrisinde (BD FACSCanto™II) ölçülerek hücre döngü analizleri gerçekleştirildi. Tüm deneyler en az iki kere tekrarlandı.

## **Bulgular**

### ***TREX sistemine TAF7'nin klonlanması***

pcDNA 4TO plazmidine TAF7 geninin klonlanması için PZT tepkimesi kuruldu (Şekil 1a) ve bunu takiben diğer klonlama basamakları gerçekleştirildi. Klonlamanın başa-



**Şekil 1.** TAF7 ve Mutant TAF7'nin TREX HeLa Hücre hattına stabil transfeksiyonu **(a)** Maksi-prep ile çoğaltılan pcDNA4TO-TAF7 plazmidinin PZT ve enzim kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: 1. kuyu, 5# koloni TAF7 ifade PZT ürünü (211 bç); 2. kuyu, 6# koloni TAF7 ifade PZT ürünü (211 bç); 3. kuyu, boş plazmid TAF7 PZT ürünü; 4. kuyu, TAF7 "insert"inin TAF7 ifade PZT ürünü (211 bç); 5. kuyu, Fermentas O Range Ruler 100 bç+500 bç DNA marker; 6. kuyu, boş plazmid; 7. kuyu, boş plazmid HindIII kesimi 5048 bç (plazmid iskeleti); 8. kuyu, 5# koloni mini-prep; 9. kuyu, 5# koloni HindIII kesimi 6193 bç (plazmid iskeleti + TAF7); 10. kuyu, 5# koloni HindIII ve ApaI kesimi 5048 bp (plazmid iskeleti) ve 1145 bp (TAF7); 11. kuyu, 6# koloni mini-prep; 12. kuyu, 6# koloni HindIII kesimi 6193 bp (plazmid iskeleti + TAF7); 13. kuyu, 6# koloni HindIII ve ApaI kesimi 5048 bp (plazmid iskeleti) ve 1145 bp (TAF7); 14. kuyu, Fermentas O Range Ruler 100 bç+500 bç DNA marker. **(b)** Mutagenез sonrası pcDNA4TO TAF7 mutant plazmidinde ser159 (TCT) – ala159 (GCT) dönüşümünün gerçekleştiğini gösteren DNA dizi analiz sonuçları **(c)** TREX HeLa hücre hattına pcDNA4TO-TAF7 (içerisine TAF7 klonlanmış pcDNA4TO plazmidini) stabil transfeksiyonu sonrası doksisisiklin yokluğunda ve varlığında TAF7 ifadesinin western blot yöntemi ile gösterilmesi: 1. kuyu, doksisisiklin eklenmemiş (total hücre lizatlarında izlenen bazal TAF7 ifadesi artı pcDNA4TO-TAF7'ya ait olası kaçak ekspresyonu yansıtmaktadır); 2. kuyu, doksisisiklin eklenmiş (total hücre lizatlarında izlenen bazal TAF7 ifadesi artı pcDNA4TO-TAF7'nin doksisisiklin ile uyarılmış ekspresyonunu yansıtmaktadır) **(d)** TREX HeLa hücre hattına pcDNA4TO-TAF7 **mutant** plazmidini stabil transfeksiyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi: 1. kuyu, doksisisiklin eklenmemiş; 2. kuyu, doksisisiklin eklenmiş.

rılı olduğu kolonilerin tespiti için kurulan restriksiyon enzim kesim reaksiyonları ve PZT ürünleri, %0,8'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 1a). Sonuç olarak 5 ve 6 numaralı kolonilerde TAF7'nin klonlanmış olduğu görüldü (Şekil 1a – 1, 2, 9, 10, 12 ve 13. kuyular). Klonlamanın kendisi ve yönü DNA dizi analizi ile doğrulandı.

#### **Bölgeye yönelik mutagenез ile TAF7 Ser159 mutantının oluşturulması ve klonlanması**

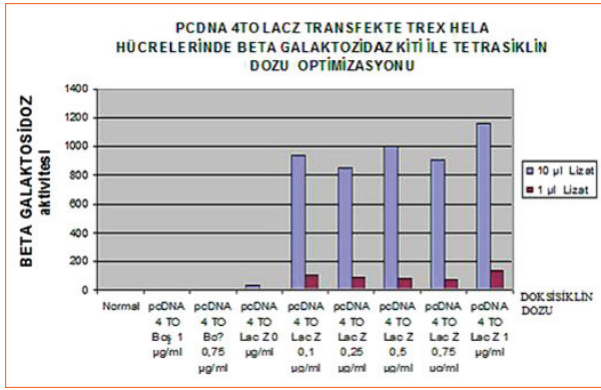
pcDNA4TO-TAF7 plazmidinde *in-vitro* mutagenез işlemi sonrası, kompetan bakteriler mutagenез ürünü ile transforme edildi ve mutant plazmid çoğaltılarak saflaştırıldı. Mutagenезin hedeflendiği şekilde gerçekleştiği DNA dizi analizi ile doğrulandı (Şekil 1b).

#### **Optimum tetrasiklin/doksisisiklin dozunun belirlenmesi**

pcDNA4TO plazmidine TAF7 geninin klonlanmasından ve stabil transfeksiyonun gerçekleştirilmesinden sonra, kullanılacak doksisisiklin dozunun optimize edilmesinde LacZ genini içeren pcDNA4TO/LacZ kontrol plazmidini kullanıldı. Doksisisiklin dozunun belirlenmesinde  $\beta$ -galaktosidaz aktivite ölçümü esas alındı. Sonuç olarak 1000 $\mu$ g/ml doksisisiklin kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi (Şekil 2).

#### **Stabil transfeksiyon**

pcDNA4TOTAF7 ve pcDNA4TOTAF7 Mutant plazmidleri TREX HeLa hücrelerine transfekte edilip, zeosinli ortamda inkübe edildikten sonra, zeosine dirençli (plaz-



**Şekil 2.** Tetrasiklinle regüle edilen ekspresyon sisteminde pcDNA4TO/LacZ kontrol plazmidini kullanarak  $\beta$ -galaktosidaz aktivite ölçümüyle optimum tetrasiklin konsantrasyonunun belirlenmesi.

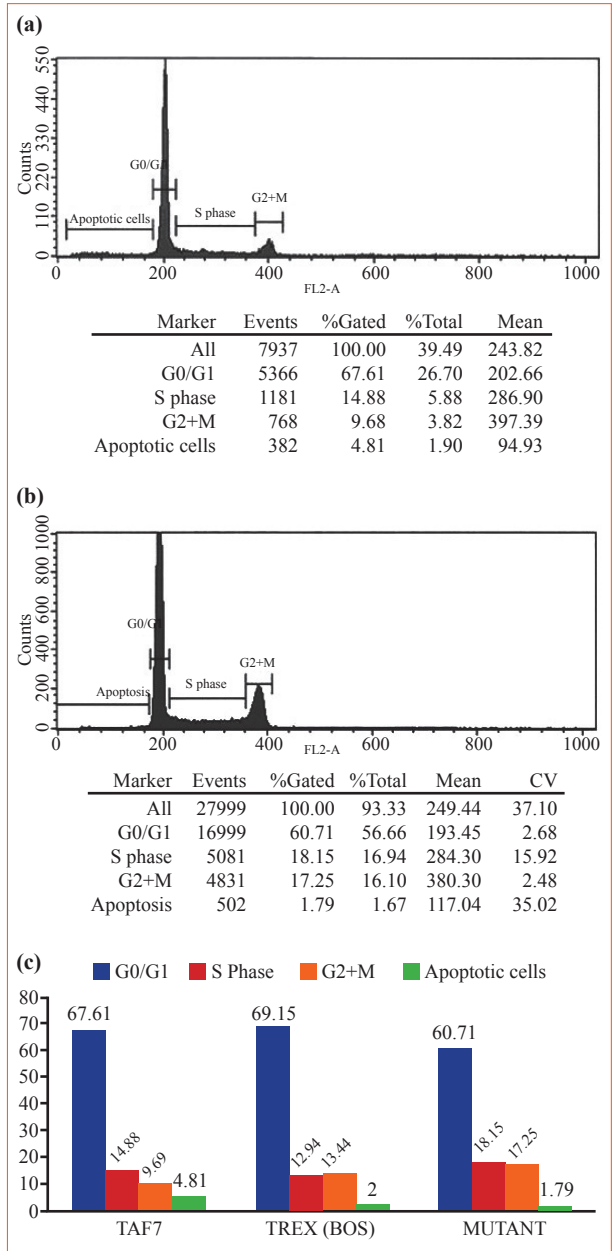
midin genomuna katılmış olduğu düşünülür) hücreler gözle görülür koloniler oluşturduktan sonra, 30 tanesi seçilip 24 kuyulu plak gözlerine ekilmiştir. Hücre lizatları hazırlanıp, protein konsantrasyonları ölçülmüştür ve TAF7 antikoruyla Western blotları yapılmıştır. Sonuç olarak pcDNA4TO-TAF7 transfekte hücrelerde 48 numaralı koloninin plazmidini stabil olarak yüksek düzeyde ekspresyon ettiği (Şekil 1c); pcDNA4TO- mutantTAF7 transfekte hücrelerde ise 4 numaralı koloninin plazmidini stabil olarak yüksek düzeyde ekspresyon ettiği (Şekil 1d) gösterilmiştir.

### Akım sitometrisi ile hücre döngüsü analizleri

Hücre döngüsü analizleri, yabancı tip ile karşılaştırılınca hücre döngüsünde fosforillenemeyen Ser159 mutant TAF7 barındıran hücrelerin, G2/M geçişinde anlamlı bir yığılım gösterdiklerini ortaya koymuştur (Şekil 3). Kontrol yabancı tip TAF7 barındıran hücreler G2/M geçişinde yaklaşık %9,5'lük bir yığılım gösterirken (Şekil 3a ve Şekil 3c); bu oran mutant TAF7 barındıran hücrelerde %17'ye çıkmaktadır (Şekil 3b ve Şekil 3c). Bununla paralel olarak döngüye girmeyen hücre popülasyonu (G0'daki hücreler), yabancı tip TAF7 kontrolde %67.61'ken; mutant TAF7 barındıran hücrelerde bu popülasyon %60.71'dir (Şekil 3a-c). Benzer şekilde S fazındaki hücre popülasyonu mutant TAF7 hücrelerinde daha yüksektir. Bu sonuçlar TAF7 Ser159 fosforilasyon mutantı hücrelerin döngüye girme ve M fazına kadar ilerlemede bir sorun yaşamadıklarını ancak mitoz aşamasına geçişte defektif olduklarını göstermektedir.

### Tartışma

İnsan Genom projesi kapsamında insan DNA dizisinin belirlenmiş olması, biyoloji ve tıp bilimi için çok büyük öneme sahip olmakla birlikte pek çok probleme tek başına çözüm olmaktan uzaktır. Bazı dizilimi artık bilinen genlerin ekspresyon kontrol mekanizmalarının ve farklı hücresel süreçlerin transkripsiyon düzeyinde nasıl düzenlendiğinin tanımlanması gerekmektedir. Bu alanda yapılmış olan çok yoğun araştırmalar pek çok transkripsiyon



**Şekil 3.** Hücre döngüsü analiz sonuçları: (a) pcDNA4TOTAF7 TREX HeLa hücrelerinin (stabil olarak yabancı tip TAF7 ekspresyon eden hücreler) senkronizasyon sonrası hücrelerdeki DNA içeriğinin ölçüldüğü 24 saatlik hücre döngüsü akım sitometri analiz sonucu (b) pcDNA4TO Mutant TAF7 TREX HeLa hücrelerinin (stabil olarak Ser159 mutant TAF7 ekspresyon eden hücreler) senkronizasyon sonrası hücrelerdeki DNA içeriğinin ölçüldüğü 24 saatlik hücre döngüsü akım sitometri analiz sonucu (c) Akım sitometri sonuçlarının tabloda gösterimi; TREX (BOŞ), pcDNA4TO Boş plazmidini barındıran TREX HeLa hücreleri.

faktörünün, DNA elementinin, işlevsel özellikte post-translasyonel modifikasyonlarının, sinyal ileti yolağının ortaya çıkmasına ve farklı süreçlerle ilişkilendirilmesine yol açmıştır. Daha önce transkripsiyon kontrolde önemi anlaşılmamış moleküller önem kazanmıştır. Bu bağlamda öne çıkan bir grup protein de genel transkripsiyon faktörlerinin yapısal alt birimleridir. Son yıllarda transkripsiyon kontrolünde özellikle "Tata Box Binding Protein"

(TBP) ve “TBP asosiy faktörlerin” (TAF) önemli rolleri olabileceği ileri sürülmüştür [6,10,11].

TAF'lardan TAF7, transkripsiyon düzenlenmesi ve hücre döngüsü kontrolü ile ilgili olarak üzerinde durulması gerekli proteinlerden bir tanesidir. TAF7 proteinin işlevi ile ilgili az sayıda makale bulunmaktadır [4-7,9-15]. Bu çalışmalarda TAF7'nin, TAF1'i bloke ettiğini ve böylelikle transkripsiyon başlamasının bir kontrol noktasında görev aldığını ileri sürülmüştür [6]. Tüm transkripsiyon kompleksinin sağlıklı oluşması sonrasında TAF7, TAF1 üzerindeki blokajı kaldırmakta ve transkripsiyonun başlamasına izin vermektedir. Ayrıca uzama (elongasyon) faktörü P-TEFb ile etkileşerek transkripsiyonel uzamayı desteklemektedir [6,10].

Hücre döngüsü düzenlenmesinde, transkripsiyon düzeyindeki denetleme çok önemlidir. Bir yandan hücre döngüsünün farklı aşamalarında belirli genler eksprese edilirken diğer taraftan mitozda genel transkripsiyon durmaktadır. Transkripsiyonel regülasyonda kilit işlevleri olan TAF7'nin, hücre döngüsü proteinleri olan siklin A ve siklin D1'in transkripsiyonel kontrollünde de önemli rolü olduğu bildirilmiştir [4]. Burada yine TAF7'nin TAF1 ile olan etkileşimi karşımıza çıkmaktadır. TAF1'in protein kinaz (PK) ve histon asetiltransferaz aktivite (AT) bulunmaktadır. Her iki enzimatik aktivite, memeli hücrelerinde G1 geçişi için gerekli genlerin transkripsiyonu için önemlidir. TAF7'nin, TAF1'e bağlanmakta ve TAF1'in AT aktivitesini ve dolayısıyla histon H3 asetilasyon düzeyini düzenlemektedir. Histon H3'un asetilasyonu siklin D1 ve siklin A transkripsiyonunu sağlamaktadır. TAF7'nin yüksek ekspresyon ve siRNA ile baskılama deneyleri sonucunda siklin genlerin promotörlerinde TAF7'nin baskılayıcı fonksiyonu olduğu gösterilmiştir [4]. Siklin D1 ve siklin A promotörlerine bağlanarak transkripsiyonu baskılayan TAF7, TAF1'in kinaz aktivitesiyle fosforillenerek TFIID kompleksinden ayrılmaktadır. TAF7'nin ayrılmasıyla H3 asetilasyon seviyesi artar ve genlerin transkripsiyonu sağlanır. TAF7'nin Ser264 aminoasidi TAF1'in kinaz aktivitesi için bir substrattır. TAF7 S264 fosfo-mutantlarıyla yapılan deneyler, TAF7'nin fosforillenememesinin, siklin D1 ve siklin A promotör H3 asetilasyonunu etkilediği gösterilmiştir.

Bu bulgulara ek olarak hücre döngüsünün düzenlenmesiyle ilgili süreçlerde hedef genlerin ekspresyon kontrolünde rol oynayan c-Jun proteininin TAF7 ile fiziksel etkileşime girdiği bilinmektedir [12]. Bir diğer ilginç bulgu ise TAF7'nin hücre döngüsünde G2/M geçişinde Ser159 aminoasidinden fosforillendiğinin gösterilmesidir. Ancak bu fosforillenmenin önemi bilinmemektedir [9]. TAF7'nin hücre döngüsü kinetikleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla tetrasiklinle regüle edilen (TRES) sistem ile HeLa hücrelerinde, TAF7'nin yabancı ve etkisi bilinmeyen Ser159 mutant formlarının yüksek düzeyde kontrollü ekspresyonlarını sağlayarak hücre döngüsü ana-

lizlerini gerçekleştirdik. Yabancı tip TAF7'ı eksprese eden hücrelerle karşılaştırdığımızda, mutant Ser159 hücrelerin (fosforillenemeyen hücrelerin) G2/M aşamasında yığılım gösterdiklerini bulguladık. Bu hücreler G2/M aşamasında bloklanmakta ve döngüde ilerleyememektedir. Ancak bu fosfo-mutantın, hücre döngüsüne girişte ve DNA replikasyonunun gerçekleştiği S fazı ilerleyişine etkisi yok gibi gözükmektedir. Tam senkronizasyonun kanser hücre hatlarında sağlanmasının çok zor olduğu göz önünde tutulduğunda G/M geçişinde yığılımanın görünenden daha yüksek olabileceği ileri sürülebilir.

Bulgularımız TAF7'de gözlenen Ser159 modifikasyonunun işlevsel bir karşılığı olduğunu göstermektedir. Hücre döngüsü kontrolünde daha önce çalışılmamış bir protein grubunun önemini vurgulamaktadır. Genel transkripsiyon kompleksinin yapısal molekülleri olarak kabul edilen TAF proteinlerinde izlenen post-translasyonel modifikasyonlar ve saptanana katalitik aktivite, önümüzdeki yıllarda bu ihmal edilen protein grubunun önemli hücresel süreçlerde oynadıkları rollere ışık tutacaktır.

#### **Bilgi ve teşekkür**

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Şube Müdürlüğü 2007. KB.SAG.024 No.lu ve TÜBİTAK 109T937 No.lu projeler ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi BAP Birimine teşekkür ederiz.

Dr. Dilek Göktürk'ün şimdiki adresi: Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Adana.

#### **Çıkar çatışması**

Yazarların çıkar çatışması yoktur.

#### **Kaynaklar**

- [1] Liu X, Bushnell DA, Kornberg RD. RNA polymerase II transcription: structure and mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1829(1):2-8.
- [2] Cler E, Papai G, Schultz P, Davidson I. Recent advances in understanding the structure and function of general transcription factor TFIID. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(13):2123-34.
- [3] Dunphy EL, Johnson T, Auerbach SS, Wang EH. Requirement for TAF(II)250 acetyltransferase activity in cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2000; 20(4):1134-9.
- [4] Kloet SL, Whiting JL, Gafken P, Ranish J, Wang EH. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 and cyclin A gene transcription by TFIID subunits TAF1 and TAF7. *Mol Cell Biol* 2012; 32(16):3358-69.
- [5] Gegonne A, Weissman JD, Singer DS. TAFII55 binding to TAFII250 inhibits its acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(22):12432-7.
- [6] Gegonne A, Weissman JD, Zhou M, Brady JN, Singer DS. TAF7: a possible transcription initiation check-point regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(3):602-7.
- [7] Hilton TL, Li Y, Dunphy EL, Wang EH. TAF1 histone acetyltransferase activity in Sp1 activation of the cyclin D1 promoter. *Mol Cell Biol* 2005; 25(10):4321-32.
- [8] Orlando DA, Lin CY, Bernard A, Wang JY, Socolar JE, et al. Glob-

- al control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. *Nature* 2008; 453(7197):944-7.
- [9] Pijnappel WP, Kolkman A, Baltissen MP, Heck A Jr, Timmers HM. Quantitative mass spectrometry of TATA binding protein-containing complexes and subunit phosphorylations during the cell cycle. *Proteome Sci* 2009; 7:46.
- [10] Gegonne A, Weissman JD, Lu H, Zhou M, Dasgupta A, et al. TFIID component TAF7 functionally interacts with both TFIIF and P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(14):5367-72.
- [11] Devaiah BN, Lu H, Gegonne A, Sercan Z, Zhang H, et al. Novel functions for TAF7, a regulator of TAF1-independent transcription. *J Biol Chem* 2010; 285(50):38772-80.
- [12] Munz C, Psichari E, Mandilis D, Lavigne AC, Spiliotaki M, et al. TAF7 (TAFII55) plays a role in the transcription activation by c-Jun. *J Biol Chem* 2003; 278(24):21510-6.
- [13] Gegonne A, Tai X, Zhang J, Wu G, Zhu J, et al. The general transcription factor TAF7 is essential for embryonic development but not essential for the survival or differentiation of mature T cells. *Mol Cell Biol* 2012; 32(10):1984-97.
- [14] Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Nishimura K, Igarashi K, et al. TATA-binding protein-associated factor 7 regulates polyamine transport activity and polyamine analog-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(29):29921-9.
- [15] Leurent C, Sanders SL, Demény MA, Garbett KA, Ruhlmann C, et al. Mapping key functional sites within yeast TFIID. *EMBO J* 2004; 23(4):719-27.