

## ЗМІНИ В ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ, ЗУМОВЛЕНІ НАДЕКСПРЕСІЄЮ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА ZXDC В ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИНАХ НИРКИ ЛІНІЇ НЕК293

О. В. ГАЛКІН<sup>1,2</sup>, О. Г. МІНЧЕНКО<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Канзаський університет, медичний центр, США;

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

<sup>3</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Відомо, що транскрипційний фактор ZXDC, що належить до родини ZXD протеїнів, здатний утворювати транскрипційно активний комплекс із ZXDA фактором, що бере участь у регуляції експресії гена МНСІІ. У цій роботі проведено дослідження експресії великої групи генів в ембріональних клітинах нирки лінії НЕК293, що характеризувалися надекспресією транскрипційного фактора ZXDC, з метою ідентифікації генів, транскрипція яких контролюється цим транскрипційним фактором. Показано, що надекспресія транскрипційного фактора ZXDC в ембріональних клітинах нирки лінії НЕК293 істотно змінює рівень експресії численної групи генів, що контролюють протікання різних процесів у клітинах, зокрема клітинний цикл, проліферацію та диференціацію клітин. Експресія більшості із них суттєво посилюється у клітинах нирки лінії НЕК293 з надекспресією транскрипційного фактора ZXDC, зокрема генів EGR2, BDNF, CDKN1C та IL5Ra. Одержані результати свідчать про вагомий роль транскрипційного фактора ZXDC у регуляції експресії великої групи генів, задіяних у регуляції важливих клітинних процесів.

*Ключові слова:* транскрипційний фактор ZXDC, клітини нирки НЕК293, регуляція транскрипції.

**Т**ранскрипційний фактор ZXDC є «С»-представником родини ZXD (zinc finger X-linked duplicated) протеїнів. ZXDC було вперше виявлено завдяки його зв'язуванню з регуляторними послідовностями генів у клітинах дріжджів як транс-активатор СІІ-го класу (СІІТА). Потім була синтезована та клонована кДНК транскрипційного фактора ZXDC, а також визначена послідовність нуклеотидних залишків мРНК і амінокислотна послідовність протеїну [1].

У геномі людини знайдено ще два гени, високогомологічні до гена транскрипційного фактора ZXDC, які було названо ZXDA і ZXDB та включено до складу родини ZXD-протеїнів. Схематичне зображення доменної організації протеїнів родини ZXD та рівня гомології окремих доменів у межах родини представлено на рис. 1. У гені транскрипційного фактора ZXDC є ділянка активації транскрипції та домен, що відповідає за взаємодію з СІІТА, а також ділянка, до складу якої входить десять цинкових пальців. У структурі гена транскрипційного фактора ZXDC є десять екзонів. Водночас гени транскрипційних факторів ZXDA та ZXDB людини, хоч і є високогомологіч-

ними до ZXDC, мають у своєму складі лише один екзон. Транскрипційні фактори ZXDA та ZXDC здатні взаємодіяти між собою, утворюючи функціонально активний димер шляхом взаємодії ділянок цинкових пальців у складі обох протеїнів.

Нещодавно було відкрито ZXDC2, ізоформу транскрипційного фактора ZXDC, яка утворюється шляхом транскрипції гена ZXDC з альтернативного промотора [2]. Вона здатна зв'язуватися як із ZXDA, так і з ZXDC.

Раніше було показано, що транскрипційний фактор ZXDC бере участь у регуляції експресії генів головного комплексу гістосумісності МНСІІ (major histocompatibility complex class II), утворюючи комплекс із ZXDA, який, взаємодіючи із СІІТА, зв'язується із промоторними ділянками генів МНСІІ та активує їх транскрипцію [3]. Також було показано, що ZXDC2, ізоформа транскрипційного фактора ZXDC, здатна блокувати активацію транскрипції гена МНСІІ фактором ZXDC і виконує, таким чином роль, негативного регулятора [2].

Окрім регуляції експресії гена МНСІІ, інші функції транскрипційного фактора ZXDC

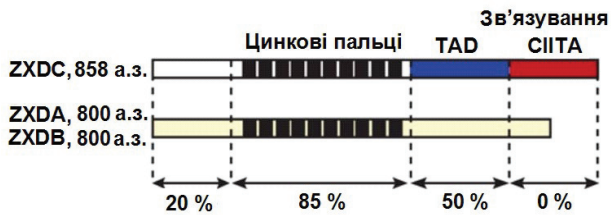


Рис. 1. Схематичне зображення доменної організації протеїнів родини ZXD. Наведено рівень гомології окремих доменів у межах родини у відсотках

залишалися невідомими. У цьому дослідженні ми вивчали вплив надекспресії транскрипційного фактора ZXDC на експресію багатьох генів в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 з метою ідентифікувати ті гени, що прямо чи опосередковано регулюються цим транскрипційним фактором. Встановлено, що надекспресія транскрипційного фактора ZXDC змінює рівень експресії багатьох генів, що беруть участь у різноманітних клітинних процесах.

#### Матеріали і методи

Дослідження проведено на ембріональних клітинах нирки лінії HEK293, які вирощували при 37 °С в середовищі DMEM (Cellgro, США), до якого додавали глютамін до кінцевої концентрації 4 мМ та ембріональну сироватку телят до кінцевої концентрації 10%, в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>. Трансфекцію клітин рекомбінантними ДНК проводили з допомогою Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) в чашках Петрі діаметром 35 мм. Для трансфекції ембріональних клітин нирки лінії HEK293 було використано дві рекомбінантні ДНК. Одна з них, pDNA3.1-ZXDC, містить кДНК транскрипційного фактора ZXDC в еукаріотичному експресійному векторі pDNA3.1, а друга, pCMV-SPORT6-β-gal, що була контролем ефективності трансфекції, містила кДНК β-gal в еукаріотичному експресійному векторі pCMV-SPORT6. Для трансфекції клітин лінії HEK293 у стерильні пробірки вносили по 500 мкл середовища OptiMEM (Gibco) та по 4 мкг ДНК, змішували, потім додавали по 10 мкл Lipofectamine 2000, знову перемішували й інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Далі цю суміш додавали до культури клітин, попередньо промитих середовищем OptiMEM, та інкубували протягом трьох годин при t = 37 °С в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>, після чого змінювали середовище на DMEM з 10% ембріональної сироватки телят. Трансфор-

мовані клітини вирощували протягом 48 год при 37 °С в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>.

РНК із клітин лінії HEK293 виділяли за допомогою реагенту Trizol (Invitrogen). Для цього клітини відмивали і додавали до них 1 мл реагенту Trizol. Лізат клітин переносили у пробірки, в які вносили 200 мкл хлороформу, перемішували та центрифугували (16 600 g, +4 °С) протягом 15 хв. Відбирали 300 мкл супернатанту і РНК осаджували 240 мкл ізопропанолу протягом двох годин при -20 °С. Одержані під час центрифугування осадки РНК промивали 600 мкл 70%-го етанолу та розчиняли у стерильній воді, вільній від нуклеаз (BioRad Lab., США).

Виділені РНК додатково очищали за допомогою RNAasy Mini Kit (Qiagen, Німеччина) відповідно до протоколу виробника. Якість виділених РНК перевіряли на аналізаторі «Agilent 2100 Bioanalyzer» (США). Одержані препарати РНК були придатними для мікроарей-аналізу. В них не було виявлено домішок ДНК, наявність яких в одержаних препаратах РНК перевіряли шляхом ампліфікації фрагмента гена *GAPDH* з використанням «PCR Master Mix» (Fermentas) та специфічних праймерів до цього гена (Invitrogen).

Мікроарей-аналіз експресії генів та оброблення результатів проводили на системі Affymetrix GeneChip з використанням мікроарея HG-U133 Plus 2.0 (виробництва Affymetrix) згідно з протоколом виробника на базі Медичного центру Канзаського університету.

Зворотну транскрипцію РНК проводили за допомогою набору «Quantitect Reverse Transcription Kit» (Qiagen) відповідно до протоколу виробника. Для реакції зворотної транскрипції брали 1 мкг РНК та оліго-dT праймер. Далі проводили ампліфікацію одержаних препаратів кДНК. Реакційна суміш містила 8,2 мкл води, вільної від нуклеаз, 1 мкл кДНК, 0,8 мкл 10 мкМ суміші праймерів та 10 мкл двократної суміші для полімеразної ланцюгової реакції (Fermentas).

Для дослідження експресії мРНК транскрипційного фактора ZXDC використовували такі праймери: 5'-GCTGCCAATATTCTGGGACC-3' (прямий) та зворотний 3'-GAACAGGAGATCCAGGACCT-5'. Прямий праймер починається з 521 нуклеотидного залишку (5'-позиція), а зворотний – з 774 нуклеотидного залишку (3'-позиція).

Послідовності праймерів, які було використано для визначення рівнів експресії цільових генів:

**GAPDH:**

прямий  
5'–АТСАСТGCCACCCAGAAGACT–3'  
та зворотний  
3'–GATGACSTTGCCCACAGCCTT–5';

**IL5Ra:**

прямий  
5'–GCCAAGAATACAGCAAAGACACACT–3'  
та зворотний  
3'–ТААСАAGCACCGCAAGCCAGTCA–5';

**GATA1:**

прямий  
5'–ТСТАСССТGССТСААСТGTGTGT–3'  
та зворотний  
3'–GCCGCTCTGTCTTCAAAGTCTC–5';

**BDNF:**

прямий  
5'–CGTGTGTGACAGTATTAGTGAGT–3'  
та зворотний  
3'–СТТGGTCTCGTAGAAGTATTGCT–5';

**CDKN1C:**

прямий  
5'–CCTGGCGTGGGCTCGGTGGA–3'  
та зворотний  
3'–GGTTGCTGCTACATGAACGGTCC–5';

**EGR2:**

прямий  
5'–GTAAGCCSTTTCCCTGCCCACTG–3'  
та зворотний  
3'–GGTCCCTCGCTGCCTCCACTG–3'.

Ампліфікацію проводили за таких умов: 94 °C, 15 с; 60 °C, 20 с; 72 °C, 20 с; 24–45 циклів. Для ампліфікації EGR2 гібридизацію праймерів проводили при 70 °C.

Продукти реакції аналізували застосовуючи електрофорез у 2%-му агарозному гелі з використанням буфера TBE. Гелі фотографували, використовуючи систему Typhoon 9410 (GE Healthcare). Денситометричний аналіз продуктів реакції було проведено за програмою TotalLab.

**Вестерн-блот аналіз.** Надекспресію гена ZXDC у контрольних пробах було додатково підтверджено за допомогою вестерн-блот аналізу. Для цього 1x10<sup>6</sup> клітин лінії HEK293, з надекспресією ZXDC чи β-галактозидази, лізували у буфері Леммлі, інкубували 3 хв при 94 °C і центрифугували при 16 600 g та +24 °C протягом 3 хв. Одержані лізати розділяли електрофорезом в 10%-му поліакриламідному гелі з використанням трис-гліцинової системи буферів. Продукти електрофорезу переносили на мембрану PVDF шляхом електропереносу у 25 мМ трис – 192 мМ гліциновому буфері з 10% метанолу протягом 1 год при 100 В. Далі

мембрану інкубували у буфері TBS-T (10 мМ трис-НCl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween-20) із додаванням 5% знежиреного молока (BioRad), протягом 1 год при кімнатній температурі. Для вестерн-блот аналізу було використано моноклональні первинні антитіла до ZXDC (GenScript, США) та поліклональні до GAPDH (GenScript), що додавалися у TBS-T буфері із 3% знежиреного молока у відношенні 1 : 2000 та 1 : 10 000 відповідно. Мембрану інкубували з первинними антитілами протягом 18 год при +4 °C з постійним перемішуванням на платформі. Далі мембрани з ZXDC та GAPDH промивали буфером TBS-T та інкубували протягом 1 год із вторинними антикролячими антитілами, кон'югованими з HRP (Santa-Cruz, США), які додавали в розведенні 1 : 5000 у буфері TBS-T, у складі якого було 3% знежиреного молока. Далі мембрану промивали буфером TBS-T та проявляли, використовуючи реагент ESL+ (GE Healthcare) відповідно до протоколу виробника, та фотографували за допомогою системи Typhoon 9410 (GE Healthcare).

**Результати та обговорення**

Транскрипційні фактори відіграють важливу роль у регуляції метаболізму, а тому ідентифікація генів, рівень транскрипції яких вони контролюють, має надзвичайне значення для розуміння біологічної ролі цього транскрипційного фактора, можливих механізмів його дії в нормі та за патологічних станів, а також порушень регуляторних шляхів і метаболічних процесів у разі його виключення або надекспресії. У цій роботі нами проаналізовано експресію великої кількості генів в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 з надекспресією транскрипційного фактора ZXDC з допомогою мікроарей аналізу, в якому для тестування генів використовують олігонуклеотид, специфічний до певних генів людини. Для цього треба було одержати клітини лінії HEK293 з надекспресією транскрипційного фактора ZXDC. Рекombінантну плазмиду pсDNA-3.1-ZXDC, що містить клоновану кДНК ZXDC, вводили до клітин нирки лінії HEK293 шляхом трансфекції і потім відбирали клони клітин з надекспресією транскрипційного фактора ZXDC. Для того, щоб нівелювати зміни у транскрипції генів, спричинені клітинним стресом через трансфекцію та надекспресію великої кількості протеїну, для контролю клітини лінії HEK293 були трансфековані плазмідом рCMV-SPORT6-β-gal, що містить кДНК α-субодиниці β-галактозида-

зи, рівень експресії якої у цих клітинах був подібним до рівня експресії ZXDC із плазміди рсDNA-3.1-ZXDC. Надекспресію транскрипційного фактора ZXDC у цих клітинах було перевірено за допомогою вестерн-блот аналізу, потім підтверджено напівкількісним аналізом полімеразної ланцюгової реакції (рис. 2 та 3). Було показано, що трансфековані клітини надекспресують β-галактозидазу у значній кількості (дані не наведено).

Для виявлення генів, експресія яких у клітинах лінії HEK293 змінилася внаслідок надекспресії транскрипційного фактора ZXDC, із використанням групи контрольних генів, дані трьох повторів мікроарей-аналізу було нормалізовано та усереднено, відібрано гени з низьким рівнем варіабельності поміж кожного арею та у межах ареїв. За допомогою застосованого алгоритму було виявлено 632 гени, експресія яких змінилася у три та більше разів, а потім з них було відібрано лише ті гени, мРНК яких кодують протеїни з уже відомою функцією. Варто зазначити, що типовий мікроарей виробництва «Affymetrix» містить кілька груп проб для кожного гена. До складу кожної групи проб входять 11 олігонуклеотидних проб. Загальний сигнал вираховується шляхом усереднення сигналів, одержаних для окремих проб в межах групи. Подальший аналіз сигналів, одержаних у мікроарей-аналізі, показав, що для багатьох генів підвищення загального сигналу для групи проб обумовлене підвищенням сигналу для окремих проб, перевіркою яких із використанням blast-аналізу встановлено, що велика кількість проб здатна за цих експери-

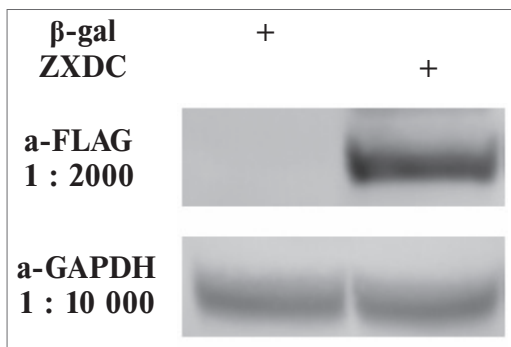


Рис. 2. Вестерн-блот аналіз експресії транскрипційного фактора ZXDC в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293, що надекспресували цей фактор, порівняно з контрольними клітинами з надекспресією β-галактозидази (β-gal). По рівню експресії GAPDH оцінювали кількість аналізуємого протеїну

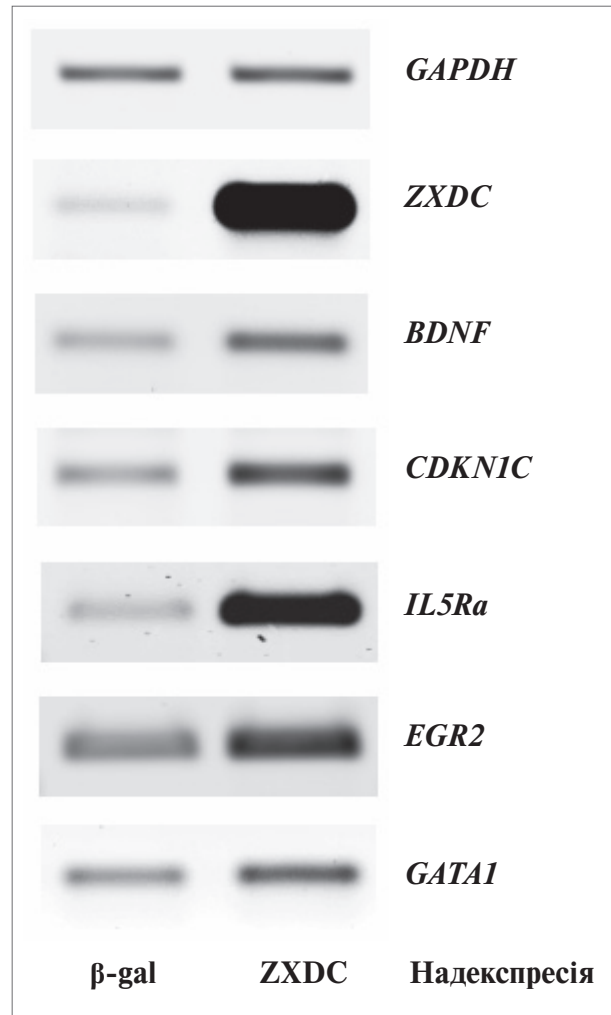


Рис. 3. Аналіз експресії генів в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 з надекспресією транскрипційного фактора ZXDC або β-галактозидази (β-gal) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції кДНК, синтезованих зворотною транскриптазою з тотальної РНК. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофору в 2%-му агарозному гелі, забарвлювали бромистим етидієм і фотографували

ментальних умов гібридуватися до сторонніх мРНК, таким чином завищуючи сигнал.

Було проаналізовано проби для близько 300 генів (дані не наведено) і відібрано ті з них, для яких зміна сигналу не була обумовлена неякісним дизайном проб чи дефектами поверхні чипу. У таблиці представлені гени, рівень експресії яких, згідно з результатами мікроарей-аналізу, змінювався у клітинах лінії HEK293 внаслідок надекспресії транскрипційного фактора ZXDC у три і більше разів, і які відіграють важливу роль у регуляції багатьох внутрішньоклітинних процесів, включаючи

Гени, рівень експресії яких в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 змінився внаслідок надекспресії гена транскрипційного фактора ZXDC

Позначення гена	Повна назва гена	Зміна рівня експресії гена, рази
<i>Диференціація та функціонування клітин імунної системи</i>		
<i>IL5RA</i>	Альфа рецептор інтерлейкіну 5 (interleukin 5 receptor, $\alpha$ )	8,84
<i>IL9R</i>	Рецептор інтерлейкіну 9 (interleukin 9 receptor)	3,72
<i>EGR2</i>	Фактор 2 ранніх змін росту (early growth response 2)	3,52
<i>Регуляція клітинного циклу</i>		
<i>CDC14A</i>	Гомолог А CDC14 (CDC14 homolog A)	8,14
<i>RSPO3</i>	R-спондин 3 (R-spondin 3)	7,85
<i>FGF18</i>	Попередник фактора росту фібробластів 18 (fibroblast growth factor 18 precursor)	5,98
<i>CCNA1</i>	Циклін A1 (cyclin A1)	4,14
<i>FGFR3</i>	Рецептор 3 фактора росту фібробластів (fibroblast growth factor receptor 3)	3,7
<i>CDKN1C</i>	Інгібітор 1C циклін-залежної кінази (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C)	3,01
<i>MAPK1</i>	Активуєма мітогеном протеїнкіназа 1 (mitogen-activated protein kinase 1)	-4,16
<i>CDK10</i>	Циклінзалежна кіназа 10 (cyclin-dependent kinase 10)	-5,16
<i>Утворення та функціонування нервової тканини</i>		
<i>BDNF</i>	Нейротропний фактор, отриманий з мозку (brain-derived neurotrophic factor)	6,32
<i>GABRG3</i>	A-гама-3 рецептор гама-аміномасляної кислоти ( $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) A receptor, $\gamma$ 3)	6,12
<i>CHRNA3</i>	Альфа-3 поліпептид холінергічного рецептора нікотинного типу (cholinergic receptor, nicotinic, $\alpha$ polypeptide 3)	3,85
<i>Міжклітинні взаємодії</i>		
<i>MMP15</i>	Металопротеїназа матриксу 15 (matrix metalloproteinase 15)	7,78
<i>ICAM4</i>	Внутрішньоклітинна молекула адгезії 4 (intercellular adhesion molecule 4)	3,89

регуляцію клітинного циклу, диференціації та проліферації.

Так, гени *CDC14* (*CDC14* homolog A), *CCNA1* (cyclin A1), *MAPK1* (mitogen-activated protein kinase 1), *CDK10* (cyclin-dependent kinase 10) та *CDKN1C* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C) беруть участь у регуляції клітинного циклу [4–8]. Експресія трьох з них (*CDC14*, *CCNA1* та *CDKN1C*) посилилася у клітинах лінії HEK293 внаслідок надекспресії транскрипційного фактора ZXDC у 8,14; 4,14 та 3,01 рази відповідно, а експресія двох інших (*MAPK1* та *CDK10*), навпаки, знизилася у 4,16 та 5,16 рази відповідно.

Гени *RSPO3* (R-spondin 3), *FZD1* [Frizzled (Drosophila) homologs 1] та *FGFR3* (fibroblast growth factor receptor 3) задіяні у сигнальній трансдукції [9–11]. Експресія генів *RSPO3* та *FGFR3* посилилася у клітинах лінії HEK293 у разі надекспресії транскрипційного фактора ZXDC у 7, 85 та 3,37 рази відповідно. Частина генів, представлених у таблиці, бере участь у проліферації та диференціації клітин. Це гени *FGF18* (fibroblast growth factor 18 precursor), *FGFR3* та *MAPK1* [6, 11, 12]. Експресія гена *FGF18* посилилася у клітинах лінії HEK293 внаслідок надекспресії транскрипційного фак-

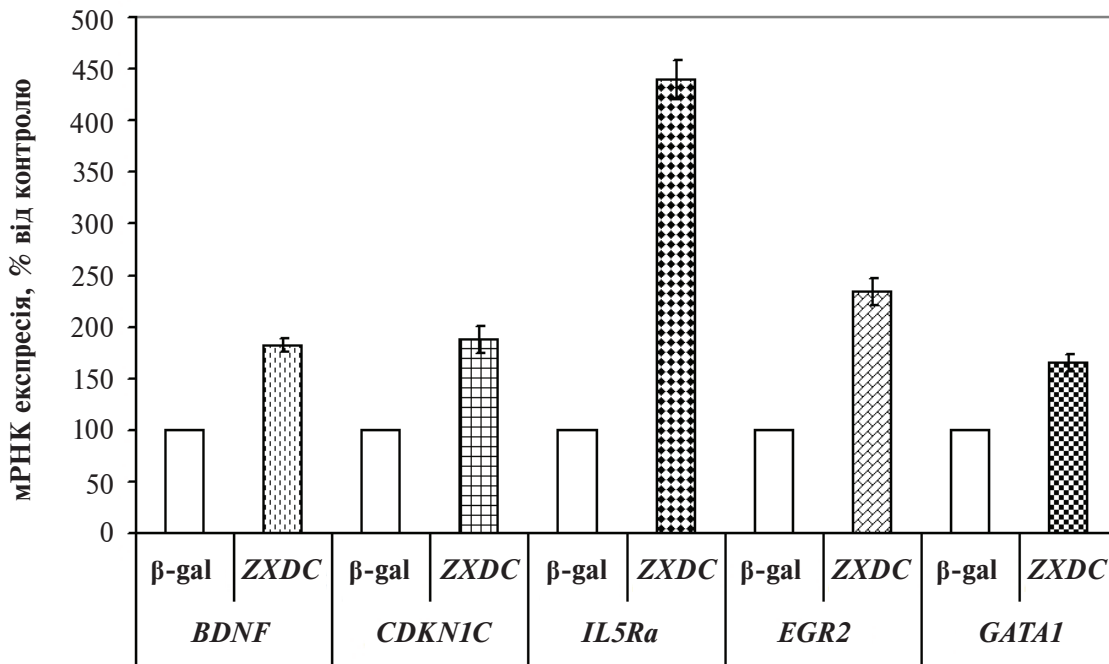


Рис. 4. Результати денситометричного аналізу продуктів полімеразної ланцюгової реакції, проведеного за допомогою програми TotalLab. Рівні експресії мРНК *BDNF*, *CDKN1C*, *IL5Ra*, *GATA1* та *EGR2* нормалізували за експресією мРНК *GAPDH*;  $P < 0,05$

тора ZXDC майже у шість разів. Гени *FGF18* та *CDC14* також беруть участь у формуванні та рості пухлин [13].

За надекспресії транскрипційного фактора ZXDC у клітинах лінії HEK293 більше ніж у шість разів посилюється експресія гена *BDNF* (brain-derived neurotrophic factor), задіяного в регуляції диференціації та проліферації нейронів [14]. Показано, що експресія генів *GABRG3* ( $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) A receptor,  $\gamma$  3) та *CHRNA3* (cholinergic receptor, nicotinic,  $\alpha$ -polypeptide 3), які беруть участь у механізмах синаптичної передачі [15, 16], також істотно посилюється у клітинах лінії HEK293 у разі надекспресії транскрипційного фактора ZXDC: гена *GABRG3* у 6,12 раза, а гена *CHRNA3* у 3,85 раза.

Встановлено також, що внаслідок надекспресії гена транскрипційного фактора ZXDC у клітинах лінії HEK293 істотно (у 3,89 раза) посилюється експресія гена *ICAM4* (intercellular adhesion molecule 4) та у 7,78 раза *MMP15* (matrix metalloproteinase 15). Ці гени беруть участь у міжклітинних взаємодіях та взаємодіях клітин з міжклітинним матриксом [17, 18]. Виявлено також групу генів, чутливих до надекспресії гена транскрипційного фактора ZXDC, що мають відношення до диференціації клітин імунної системи. Це гени *IL5Ra*

(interleukin 5 receptor,  $\alpha$ ), *EGR2* (early growth response 2) та *IL9R* (interleukin 9 receptor), експресія яких посилювалась у клітинах лінії HEK293 внаслідок надекспресії ZXDC у 8,84; 3,72 та 3,52 раза відповідно. Низкою авторів встановлено, що *IL5Ra*, *IL9R* та *EGR2* беруть участь у диференціації клітин крові [19–21].

Для підтвердження змін в експресії деяких генів, про які згадувалося вище, ми провели аналіз експресії декількох генів (*BDNF*, *CDKN1C*, *EGR2*, *IL5Ra* та *GAPDH* як контрольного гена) з допомогою напівкількісного варіанта полімеразної ланцюгової реакції. Результати цих досліджень представлено на рис. 3 та 4. Для денситометричних розрахунків ми використали дані трьох незалежних повторів експерименту.

Згідно з результатами аналізу рівнів мРНК полімеразною ланцюговою реакцією, спостерігається підвищення експресії генів *BDNF*, *CDKN1C*, *EGR2*, *GATA1* та *IL5Ra* у клітинах нирки лінії HEK293 внаслідок надекспресії гена транскрипційного фактора ZXDC, що підтверджує результати мікроарей-аналізу. Деяка невідповідність кількісних характеристик рівнів експресії проаналізованих мРНК, одержаних за допомогою двох методів, можна пояснити тим, що використаний нами метод полімеразної ланцюгової реакції є напівкіль-

кісним, хоча і дані мікроарей-аналізу зрідка завищені.

Таким чином, надекспресія транскрипційного фактора ZXDC змінює у клітинах нирки лінії HEK293, порівняно з контрольними клітинами, що надекспресували β-галактозидазу, експресію значного числа генів, задіяних у регуляції багатьох важливих внутрішньоклітинних процесів.

Зміна експресії досить великої кількості генів внаслідок надекспресії ZXDC свідчить про те, що транскрипційний фактор ZXDC може грати роль активатора чи супресора їхньої транскрипції, або здійснювати опосередкований вплив через регуляторні каскади, або взаємодіючи з іншими транскрипційними факторами. Так, експресія низки генів збільшилася під впливом транскрипційного фактора ZXDC, включаючи гени, що є малоактивними у клітинах HEK293 (*BDNF*, *IL5Ra*, *EGR2*, *GATA1* та інші згідно з результатами мікроарей-аналізу), але експресуються в інших типах клітин стабільно на окремих етапах клітинного розвитку чи у відповідь на певні регуляторні сигнали. Так, Raf/MEK/ERK-залежна активація PU.1 та C/EBPα, які регулюють рівні *EGR2* та *GATA1* і таким чином опосередковують диференціацію мієлоїдних попередників, та SMAD-каскад, що опосередковує *BDNF*-залежну проліферацію та диференціацію нейронів, повністю або частково не функціонують у клітинах лінії HEK293. Відомо, що високий рівень експресії ZXDC спостерігається в кістковому мозку та тимусі, що експресія генів *EGR2* та *IL5Ra* звичайно є значно вищою у спеціалізованих клітинах мієлоїдного ряду, причому рівень їх є критичним на певних етапах диференціації макрофагів та еозинофілів, і, можливо, що транскрипційний фактор ZXDC відіграє певну роль у виборі мієлоїдними попередниками напрямку диференціації.

Високий рівень експресії транскрипційного фактора ZXDC в мозку [1] може свідчити про його можливу роль у регуляції експресії генів і у нервових клітинах, зокрема гена *BDNF*, задіяного в регуляції диференціації та проліферації нейронів [14], а також генів *GABRG3* та *CHRNA3*, що беруть участь у механізмах синаптичної передачі [15, 16], експресія яких істотно посилюється у разі надекспресії транскрипційного фактора ZXDC у клітинах нирки лінії HEK293.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про можливу роль транскрипційного фактора ZXDC у регуляції експресії великої групи генів, що контролюють перебіг важливих клітинних процесів, зокрема

таких як клітинний цикл, міжклітинні взаємодії, проліферація та диференціація клітин:

1. За допомогою мікроарей-аналізу ідентифіковано гени, експресія яких змінилася в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 під впливом надекспресії транскрипційного фактора ZXDC, серед них *IL5Ra*, *IL9R*, *EGR2*, *CDC14A*, *RSPO3*, *FGF18*, *CCNA1*, *FGFR3*, *CDKN1C*, *MAPK1*, *CDK10*, *BDNF*, *GABRG3*, *CHRNA3*, *MMP15* та *ICAM4*.

2. Посилення експресії генів *IL5Ra*, *BDNF*, *EGR2* та *CDKN1C* в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 з надекспресією транскрипційного фактора ZXDC підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

3. Результати роботи свідчать про вагомий роль транскрипційного фактора ZXDC у регуляції експресії великої групи генів, задіяних у регуляції важливих клітинних процесів.

Автори вдячні Dr. Joseph D. Fontes з Медичного центру Канзаського університету США за надану можливість виконання цієї роботи під його керівництвом.

#### **ИЗМЕНЕНИЯ В ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ НАДЕКСПРЕССИЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА ZXDC В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПОЧКИ ЛИНИИ HEK293**

*А. В. Галкин<sup>1,2</sup>, А. Г. Минченко<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Канзасский Университет, медицинский центр, США;

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев; e-mail: ominchenko@yahoo.com

Известно, что транскрипционный фактор ZXDC принадлежит к семейству ZXD-протеинов, способен образовывать транскрипционноактивный комплекс с ZXDA и принимает участие в регуляции экспрессии гена *MHCII*. В работе проведено исследование экспрессии большой группы генів в эмбриональных клетках почки линии HEK293, которые имели надэкспрессию транскрипционного фактора ZXDC, с целью идентификации генів, транскрипция которых контролируется этим транскрипционным фактором. Показано, что надэкспрессия транскрипционного фактора ZXDC в эмбриональных клетках почки линии HEK293 существенно изменяет уровень экспрессии большой группы генів, которые

контролируют протекание различных процессов в клетках, в частности, клеточный цикл, пролиферацию и дифференциацию клеток. Экспрессия большинства из них значительно усиливается в клетках почки линии HEK293 с надэкспрессией транскрипционного фактора ZXDC, в частности генов *EGR2*, *BDNF*, *CDKN1C* и *IL5Ra*. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли транскрипционного фактора ZXDC в регуляции экспрессии большой группы генов, которые вовлечены в контроль важных клеточных процессов.

Ключевые слова: транскрипционный фактор ZXDC, клетки почки HEK293, регуляция транскрипции.

**CHANGES IN GENES EXPRESSION CAUSED BY OVEREXPRESSION OF THE TRANSCRIPTION FACTOR ZXDC IN EMBRYONIC KIDNEY CELL OF HEK293 LINE**

*O. V. Galkin<sup>1,2</sup>, O. H. Minchenko<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>University of Kansas, Medical Center, USA;

<sup>2</sup>Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;

<sup>3</sup>Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv; e-mail: ominchenko@yahoo.com

**S u m m a r y**

The transcription factor ZXDC, a member of ZXD protein family, forms transcriptionally active complex with ZXDA and participates in the regulation of *MHCII* gene expression. In this work we investigate the expression of a large group of genes in kidney embryo cell of line HEK293 with overexpression of transcription factor ZXDC for identification of genes, which transcription is controlled by this transcription factor. We have shown that overexpression of the transcription factor ZXDC in kidney embryo cell of HEK293 line significantly changes the level of expression of large group of genes, which control the behavior of different cell processes, in particular cell cycle, cell proliferation and differentiation. The expression of most of these genes is significantly increased in the kidney cell line HEK293 with overexpression of transcription factor ZXDC, in particular *EGR2*, *BDNF*, *CDKN1C* and *IL5Ra* genes. Our results clearly demonstrated that transcription factor ZXDC plays a significant role in the regulation of expression of a large group of genes, which control important cell processes.

Key words: transcription factor ZXDC, kidney cells HEK293, transcription regulation.

1. Al-Kandari W., Jambunathan S., Navalgund V. et al. // *Mol. Immunol.* — 2007. — **44**, N 4. — P. 311–321.
2. Aleksandrova A., Galkin O., Koneni R. et al. // *Mol. Cell. Biochem.* — 2009. — Sep. 24. (E-pub).
3. Al-Kandari W., Koneni R., Navalgund V. et al. // *J. Mol. Biol.* — 2007. — **369**, N 5. — P. 1175–1187.
4. Kaiser B., Zimmerman A., Charbonneau H. et al. // *Mol. Biol. Cell.* — 2002. — **13**, N 7. — P. 2289–2300.
5. Ji P., Agrawal S., Diederichs S. et al. // *Oncogene.* — 2005. — **24**, N 16. — P. 2739–2744.
6. Lavoie J., L'Allemain G., Brunet A. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1996. — **271**. — P. 20608–20616.
7. Li S., MacLachlan T., De Luca A. et al. // *Cancer. Res.* — 1995. — **55**. — P. 3992–3995.
8. Lee M., Reynisdottir I., Massague J. et al. // *Genes. Dev.* — 1995. — **9**. — P. 639–649.
9. Kim K., Zhao J., Andarmani S. et al. // *Cell. Cycle.* — 2006. — **5**, N 1. — P. 23–26.
10. Zilberberg A., Yaniv A., Gazit A. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — **279**. — P. 17535–17542.
11. Ornitz D., Marie J. // *Genes. Dev.* — 2002. — **16**. — P. 1446–1465.
12. Ohbayashi N., Shibayama M., Kurotaki Y. et al. // *Genes. Dev.* — 2002. — **16**, N 7. — P. 870–879.
13. Li L., Ljungman M., Dixon J. // *J. Biol. Chem.* — 2000. — **275**, N 4. — P. 2410–2414.
14. Timmusk T., Lendahl U., Funakoshi H. et al. // *J. Cell. Biol.* — 1995. — **128**, N 1. — P. 185–199.
15. Glatt K., Glatt H., Lalande M. et al. // *Genomics.* — 1997. — **41**, N 1. — P. 63–69.
16. Dani J. // *Biol. Psychiatry.* — 2001. — **49**. — P. 166–174.
17. Southcott M., Tanner M., Anstee D. // *Blood.* — 1999. — **93**. — P. 4425–4435.
18. d'Ortho M., Will H., Atkinson S. et al. // *Eur. J. Biochem.* — 1997. — **250**, N 3. — P. 751–757.
19. Plaetinck G., Van der Heyden J., Tavernier J. et al. // *J. Exp. Med.* — 1990. — **172**, N 3. — P. 683–691.
20. Laslo P., Spooner C., Warmflash A. et al. // *Cell.* — 2006. — **126**, N 4. — P. 755–766.
21. Loder B., Mutschler R. J., Ray C. J. // *J. Exp. Med.* — 1999. — **190**. — P. 75–89.

Отримано 11.01.2010