

УДК 577.112.7:616

АКТИВАЦІЯ ТРАНСКРИПЦІЇ ГЕНА EGR2 В ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ КЛІТИНАХ З НАДЕКСПРЕСІЄЮ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА ZXDC

О. В. Галкін^{1,2}О. Г. Мінченко³¹Університет медичного центру Канзасу, м. Канзас, США²Київський національний університет імені Тараса Шевченка³Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Транскрипційний фактор ZXDC бере участь у регуляції експресії гена МНСІІ в евкаріотів. Раніше за допомогою мікроарей-аналізу та полімеразної ланцюгової реакції було встановлено, що над-експресія фактора ZXDC в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 спричинює підвищення рівня експресії низки інших генів, зокрема BDNF, CDKN1C, IL5Ra та EGR2. У цьому дослідженні з використанням кількісної полімеразної ланцюгової реакції було визначено, що рівень експресії мРНК EGR2 підвищується у 2,3 рази в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 та майже у 7 разів — у культурі промієлоцитів лінії HL60 з посиленою експресією ZXDC. Для з'ясування механізмів збільшення рівня експресії гена EGR2 ми клонували промоторну ділянку EGR2 (від -341 до +134) у репортерну плазмиду рGL3basic з експресією люциферази. Встановлено, що при котранс-фекції клітин лінії HEK293 плазмідними конструкціями рGL-EGR2-341 та рcDNA3.1-ZXDC експресія люциферази у цих клітинах підвищувалася майже у 2 рази. Крім того, з використанням хроматин-імунопреципітації було показано, що ZXDC зв'язується з промоторною зоною гена EGR2 у клітинах промієлоцитів лінії HL60 *in vivo*. Отримані дані свідчать про те, що транскрипційний фактор ZXDC бере участь у регуляції транскрипції гена EGR2, зв'язуючись із його промоторною ділянкою.

Ключові слова: транскрипційні фактори, ZXDC, EGR2, надекспресія гена, регуляція транскрипції, клітини промієлоцитів HL60, клітини нирки HEK293.

Відомо, що ZXDC (zinc finger X-linked duplicated family member C) є фактором регуляції транскрипції в евкаріотів, який утворює функціональний комплекс із транскрипційними факторами СІТА та ZXDA, зв'язується з промотором гена головного комплексу гістосумісності МНСІІ (major histocompatibility complex class II) й активує його, таким чином беручи участь у регуляції рівня його експресії [1, 2]. Крім того, було показано, що домінантно-негативний варіант транскрипційного фактора ZXDC2 здатен блокувати активацію промотору гена МНСІІ, утворюючи інгібіторний комплекс з ZXDC [3].

Встановлено також, що ZXDC бере участь у регуляції транскрипції не лише гена МНСІІ, а й низки інших генів. Так, підвищена експресія ZXDC в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 посилювала рівень експресії генів з мозку нейротропного фактора BDNF (brain-derived neurotrophic fac-

tor), інгібітору 1С циклін-залежної кінази CDKN1C (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C), альфа-рецептора інтерлейкіну 5 IL5Ra (interleukin 5 receptor, α), фактора 2 ранніх змін росту EGR2 (early growth response 2) та ряду інших факторів, які беруть участь у регуляції клітинного циклу, міжклітинних взаємодіях і дозріванні та диференціації клітин імунної системи [4].

Протеїновий продукт одного із цих генів, а саме EGR2, належить до родини протеїнів із цинковими пальцями типу Cys2His2, що мають здатність до зв'язування зі специфічними послідовностями промоторних ділянок ДНК, регулюючи таким чином транскрипцію генів [5, 6]. Рівень експресії гена EGR2 підвищувався за надекспресії ZXDC більш ніж утричі [4]. Відомо, що фактор 2 ранніх змін росту EGR2 бере участь у формуванні нервової тканини, активуючи гени, які регулюють синтез мієліну і опосередковують процес мієлінізації периферійної

нервової системи, а також у регуляції диференціації шваннівських клітин [7, 8]. Більш того, виявлено залежність диференціації адипоцитів і остеокластів від рівня експресії гена *EGR2*, а також показано, що він є важливим для процесу селекції в тимусі [9–11].

Також було показано, що *EGR2* бере участь у диференціації клітин імунної системи мієлоїдного ряду. Так, експресія гена *EGR2* суттєво підвищується під час диференціації мієлоїдних клітин у моноцити [12]. Встановлено, що підвищена експресія гена *EGR2* супроводжується репресією низки генів, що контролюють диференціацію нейтрофілів. У свою чергу, експресія гена *EGR2* перебуває під контролем головного фактора диференціації моноцитів PU.1 та під впливом факторів сироватки і 12-О-тетрадеканойлфторбол-13-ацетату, що опосередковано наявністю у промоторі гена елемента CArG1, що відповідає за активацію експресії гена *EGR2* [13]. Це підтверджено даними досліджень на нокаутних за геном *EGR2* мишах [14]. Так, у цих нокаутних мишей виявлено низку дефектів у M-CSF-залежній диференціації мієлоїдних попередників у макрофаги. Нещодавно було встановлено, що транскрипційний фактор *EGR2* може зв'язуватися з ділянкою у промоторній зоні гена одного з головних факторів регуляції моноцитів *c-fms* та індукувати його експресію [15]. Таким чином, наведені вище дані вказують на те, що транскрипційний фактор *EGR2* відіграє важливу роль у регуляції диференціації мієлоїдних попередників, схильючи їх до диференціації у моноцити [14, 16].

Метою цієї роботи було вивчення молекулярних механізмів активації експресії гена транскрипційного фактора *EGR2* за надекспресії фактора транскрипції ZXDC шляхом створення і дослідження експресії репортерної конструкції з промоторною зоною гена *EGR2*.

Матеріали і методи

Плазміди. Для трансфекції клітин HL60 та HEK293 було використано плазміди pCDNA3.1-ZXDC та pCMV-SPORT6- β -gal, описані раніше [4].

Плазміду pGL-EGR2-341 було отримано шляхом клонування промоторної ділянки гена *EGR2* від -772 до +134 у плазміду pGL3basic (Promega, США) з подальшим її вкороченням до -341. Спочатку з геномної ДНК було ампліфіковано промоторну ділянку гена *EGR2* з використанням таких прай-

мерів: прямого 5'-AAGCTGCATTTCTCTCGAAGCTCCC-3' і зворотного 5'-GGAAGSTTTGTCTATTTGCCACTGAC-3'. Продукт ампліфікації та плазміду pGL3basic розрізали за сайтами рестрикції *NheI* і *HindIII*, продукти рестрикції було виділено, проведено лігазну реакцію та клонування. Виділену з отриманих позитивних клонів плазмідну ДНК розрізали рестрикційними ендонуклеазами *NheI* та *EcoRI*, далі липкі кінці отриманого фрагмента плазміди було «затуплено» за допомогою T4-полімерази, а отриману конструкцію «зшито» за допомогою лігази. Таким чином отримали плазміду pGL-EGR2-341 на основі pGL3basic, що містила промоторну послідовність гена *EGR2* з координатами від -341 до +134.

Трансфекція. У роботі використовували клітинні лінії HEK293 (ембріональні клітини нирки) та HL60 (пром'єлоцити). Для трансфекції клітини лінії HEK293 було посіяно у 35 мм чашки з використанням середовища DMEM (Cellgro, США) і додаванням глутаміну до 4 mM, ембріональної сироватки телят до 10% та антибіотиків. Культуру клітин вирощували при 37 °C в атмосфері з 5% CO₂ протягом 24 год. Трансфекцію плазмідної ДНК проводили, застосовуючи TurboFect (Fermentas, США), причому для кожної трансфекції було використано 4 μ г ДНК pCDNA3.1-ZXDC та pCMV-SPORT6- β -gal. Для цього у стерильні полістиренові пробірки вносили по 400 μ л середовища OptiMEM (Gibco, США) і додавали 4 μ г ДНК та 6 μ л TurboFect, інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі і вносили в чашки з культурами клітин, попередньо промитими середовищем OptiMEM. Трансфєковані клітини інкубували упродовж 48 год при 37 °C в атмосфері з 5% CO₂.

Для трансфекції клітин лінії HL60 їх було посіяно у 10 см чашку в кількості 25·10⁴ на 10 мл живильного середовища RPMI-1640 (Cellgro), що містило 4 mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят та антибіотики. Культуру клітин вирощували при 37 °C в атмосфері з 5% CO₂ протягом 48 год. Потім клітини знімали з чашки, рахували та розводили у середовищі RPMI-1640 до щільності 1·10⁷/мл. Трансфекцію проводили методом електропорації, для чого суспензію клітин, що містила 500 тис. клітин, вносили в спеціальні кювети для електропорації, додавали 40 μ г ДНК плазміди pCDNA3.1-ZXDC або pCMV-SPORT6- β -gal. Електропорацію проводили за допомогою електропоратора BioRad (США) при таких характеристиках: 240 В та 960 мкФ. Транс-

фековані клітини інкубували при 4 °С протягом 30 хв, перенесли в чашки із середовищем RPMI-1640, що містило 4 мМ глутаміну та 10% ембріональної сироватки телят і вирощували впродовж 48 год при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂.

Виділення РНК. Тотальну РНК з ембріональних клітин нирки лінії НЕК293 та лінії HL60 (промієлоцити) виділяли за допомогою реагента Trizol (Invitrogen, США). Живильне середовище відбирали з чашок, клітини промивали DPBS і додавали до них по 1 мл реагенту Trizol. Лізат клітин перенесли у пробірки, додавали по 200 μl хлороформу, перемішували та центрифугували при 16 600 g і +4 °С протягом 15 хв. Відбирали 350 μl супернатанта, змішували з 350 μl ізопропанолу, додавали 5 μg лінійного аcriламідy, інкубували впродовж 20 хв за -20 °С і центрифугували при 16 600 g та +4 °С 20 хв. До отриманого осаду РНК доливали 600 μl 70%-го етанолу й центрифугували при 16 600 g і +4 °С 5 хв. Супернатант зливали, пробірки інкубували відкритими при кімнатній температурі протягом 2 хв для випаровування залишків етанолу, а висушений осад РНК розчиняли у стерильній воді, вільній від домішок рибонуклеаз (BioRad, США).

Дослідження активності репортерних конструкцій. Активність репортерних конструкцій з промоторною ділянкою гена транскрипційного фактора EGR2 досліджували в ембріональних клітинах нирки лінії НЕК293. Для проведення трансфекції клітини вирощували в середовищі RPMI-1640 (Cellgro) зі вмістом 4 мМ глутаміну та 10% ембріональної сироватки телят при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂ протягом 24 год, промивали середовищем OptiMEM (Gibco) і додавали до них 400 μl середовища OptiMEM, яке містило 1 μg ДНК плазмід та 2 μl TurboFect.

Для трансфекції було використано такі суміші плазмід:

- 1) pRLdCMV (0,025 μg), (pGL3-EGR2-341 (0,2 μg) і pCMV-SPORT6-β-gal (0,8 μg);
- 2) pRLdCMV (0,025 μg), pGL3-EGR2-341 (0,2 μg), pcDNA3.1-ZXDC (0,3 μg) та pCMV-SPORT6-β-gal (0,5 μg);
- 3) pRLdCMV (0,025 μg), pGL3basic (0,2 μg) та pCMV-SPORT6-β-gal (0,8 μg);
- 4) pRLdCMV (0,025 μg), pGL3basic (0,2 μg), pcDNA3.1-ZXDC (0,3 μg) та pCMV-SPORT6-β-gal (0,5 μg).

Трансфековані клітини інкубували впродовж 48 год при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂. Далі визначали активність люциферази

з використанням Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, США) відповідно до протоколу виробника. Для визначення люциферазної активності Renilla та Firefly брали 5 μl лізату, вимірювання проводили за допомогою люмінометра моделі 20/20 виробництва Turner Biosystems (США). Сигнал вираховували як відношення активності люциферазної активності Renilla до Firefly.

Хроматинімунопреципітація. Хроматинімунопреципітацію здійснювали за методикою Гаммера [17], модифікованою для ембріональних клітин нирки лінії НЕК293 і лінії промієлоцитів HL60. Для цього готували суспензію клітин обох ліній у середовищі DMEM з 4 мМ глутаміну та 10%-ї ембріональної сироватки телят до щільності 1·10⁶ клітин/мл. До 20 мл суспензії клітин додавали 0,54 мл розчину формальдегіду й інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хв. Далі до суспензії клітин додавали 2 мл 1,25 М розчину гліцину та інкубували при кімнатній температурі 10 хв. Після цього суспензію клітин центрифугували при 700g і 4 °С протягом 4 хв, промивали 10 мл буфера DPBS і повторювали центрифугування.

Осад клітин було ресуспендовано в 0,5 мл холодного буфера 1, що містив 25 мМ HEPES, pH 8,0; 0,1% ноніденту NP40; 2 мМ хлориду магнію; 10 мМ хлориду калію та розчин інгібіторів протеїназ (Roche, США). Суспензію клітин інкубували при 4 °С протягом 10 хв і центрифугували за 12 000 g упродовж 10 хв для отримання ядерної фракції. Осад клітинних ядер суспендували в 1,2 мл буфера 2, що містив 50 мМ HEPES, pH 8,0; 140 мМ хлориду натрію; 1% SDS; 1% Тритону-X100; 1 мМ EDTA та розчин інгібіторів протеїназ (Roche), додавали 20 μl 0,5 μg/мл розчину РНКаз А (Roche), інкубували протягом 20 хв при 4 °С і заморожували при -80 °С. Потім лізати розморожували при +4 °С та обробляли ультразвуком на апараті Microson за схемою 10 Вт / 10 с / 2 рази; 8 Вт / 10 с / 8 разів і центрифугували при 20 000g та 4 °С протягом 10 хв. До 1,2 мл супернатанта додавали 5,8 мл буфера 3, який містив 50 мМ HEPES, pH 8,0; 140 мМ NaCl, 1% Тритону-X100, розчин інгібіторів протеїназ (Roche) та 1 мМ EDTA, а потім по 100 μl магнітних мікрогранул, укритих протеїном G (Dynabeads, Invitrogen, США), відмитих у розчині 3, та інкубували при 4 °С упродовж 1 год. Далі мікрогранули осаджували за допомогою магнітної підставки, супернатанти розділяли на порції по 1 мл. Для кожної імунопреципітації брали по 2 порції лізату

(еквівалент генома 5-10⁶ клітин). До лізатів додавали антитіла: 4 μg моноклональних мишачих IgG (Roche), 4 μg поліклональних кролячих антитіл до ZXDC та інкубували при 4 °C протягом 5 год. Потім до кожної пробірки додавали 15 μl магнітних мікрогранул, укритих протеїном G, відмитих у розчині 3, та інкубували при 4 °C 2 год.

Мікрогранули осаджували за допомогою магнітної підставки і промивали протягом 5 хв у буферному розчині 4, який містив 20 mM Tris, pH 8,0; 140 mM хлориду натрію, 1% Тритону-X100, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, потім буфером 5 зі вмістом 20 mM Tris, pH 8,0; 500 mM хлориду натрію, 1% Тритону-X100, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, а далі буфером 6 — 10 mM Tris, pH 8,0; 500 mM хлориду натрію, 1% ноніденту NP40, 1% дезоксихолату натрію, 1 mM EDTA, 25 mM хлориду літію, а наприкінці — буфером, який містив 10 mM Tris, pH 8,0, і 1 mM EDTA (TE). Мікрогранули суспендували в 220 μl розчину 1% SDS з 0,1 mM карбонату натрію та інкубували протягом 15 хв, потім осаджували, відбирали 200 μl супернатанту і повторювали відмивку.

До отриманих 400 μl супернатанта додавали 14 μl 5M хлориду натрію, 14 μl 1 M Tris, pH 6,5; 8 μl 0,5 M EDTA та 5 μl (50 μg) протеїнази K. Супернатанти інкубували при 65 °C упродовж 14 год, далі з них виділяли ДНК за допомогою CHIP DNA clean & concentrator kit (Zymo Research, США) відповідно до інструкцій виробника. Отриману ДНК розчинили в 60 μl буфера для елюції, з яких для проведення полімеразної ланцюгової реакції брали по 1 μl.

Зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі. Виділену з ембріональних клітин нирки лінії HEK293 та лінії HL60 тотальну РНК було використано для реакції зворотної транскрипції за допомогою Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Німеччина) відповідно до протоколу виробника. Для реакції зворотної транскрипції брали 1 μg РНК та використовували оліго-дТ-праймери.

Далі комплементарну ДНК (кДНК) чи ДНК, отриману після хроматинімунопреципітації було ампліфіковано за допомогою кількісної ПЛР. Для реакції брали 8,2 μl води, вільної від нуклеаз, 1 μl кДНК, 0,8 μl 10 mM суміші праймерів та 10 μl реакційної суміші для ПЛР у режимі реального часу (Fermentas).

Послідовності праймерів, що їх було використано для полімеразної ланцюгової реакції: для кДНК GAPDH — прямий праймер 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGACT-3', зворотний 5'-GATGACCTTGCCCACAGCCTT-3'; для

кДНК EGR2 — прямий праймер 5'-GTAAGC CTTTTCCCTGCCCACTG-3', зворотний — 5'-GGTCCCTCGCTGCCTCCACTG-3'; а для виявлення ДНК промотора гена EGR2 після хроматинімунопреципітації застосовували такі праймери: прямий — 5'-GCCCAGCCCTGT TCCTCAGTCCATAT-3', зворотний — 5'-GACGGAAAGTGTTGCTСТААGT-3'. Ампліфікацію проводили в ампліфікаторі Iq5 (BioRad, США) у таких умовах: 94 °C — 15 с; 60 °C — 20 с (для кДНК EGR2 при 70 °C); 72 °C — 20 с; 45 циклів. Результати обробляти за допомогою програмного забезпечення фірми-виробника, а обчислення здійснювали за методом Delta-delta C(t) [18].

Результати та обговорення

ZXDC регулює експресію гена EGR2 на рівні транскрипції

Дослідження експресії гена транскрипційного фактора 2 ранніх змін росту EGR2 (early growth response 2) було проведено на двох лініях клітин: ембріональних епітеліальних клітинах нирки лінії HEK293 та клітинах лінії HL60, що являють собою проміелоцити, здатні диференціюватися до гранулоцитів під впливом 5'-трансретиноевої кислоти та до моноцитів під впливом 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетату, у зв'язку з чим вони є зручною модельною системою для вивчення диференціації клітин імунної системи. Вибір цих двох досить різних ліній клітин зумовлений тим, що в попередніх дослідженнях, які було проведено на клітинах лінії HEK293 за допомогою мікроарей-аналізу, встановлено, що ZXDC бере участь у регуляції транскрипції низки генів, зокрема EGR2, BDNF, CDKN1C, IL5Ra та NEUROD1, а також генів, які беруть участь у диференціації клітин імунної системи [4].

Рівень експресії мРНК EGR2 вивчали за допомогою кількісної ПЛР у клітинах ліній HEK293 та HL60 з надекспресією транскрипційного фактора ZXDC, які отримували шляхом трансфекції плазмідною рсDNA-3.1-ZXDC, як описано у розділі Матеріали і методи. Як контроль використовували клітини, трансфеговані плазмідною рCMV-SPORT6-β-gal, що експресує альфа-субодиницю β-галактозидази. Надекспресію ZXDC у трансфегованих плазмідною рсDNA-3.1-ZXDC клітинах ліній HEK293 та HL60 було перевірено за допомогою кількісної ПЛР (дані не наведено).

Результати проведених досліджень показали, що надекспресія транскрипційного фактора ZXDC зумовлювала підвищення

рівня експресії мРНК фактора EGR2 у 2,32 раза в ембріональних епітеліальних клітинах нирки лінії HEK293 (рис. 1) і майже у 7 разів — у клітинах промієлоцитів лінії HL60 (рис. 2).

Отримані дані щодо експресії мРНК фактора EGR2 методом кількісної ПЛР узгоджуються з результатами попередніх досліджень, в яких експресію генів вивчали методом мікроарею та перевіряли ПЛР [4]. Підвищення експресії мРНК фактора EGR2 в ембріональних епітеліальних клітинах нирки лінії HEK293, у яких не експресуються специфічні для клітин імунної системи транскрипційні фактори, свідчить про те, що за відсутності інших тканинно-специфічних факторів ZXDC здатен до прямої транскрипційної активації EGR2.

Той факт, що в клітинах промієлоцитів лінії HL60 під впливом надекспресії ZXDC підвищується рівень експресії мРНК фактора EGR2 значно більшою мірою, ніж в ембріональних епітеліальних клітинах нирки лінії HEK293, можливо пояснюється різним функціональним значенням даного транскрипційного фактора у цих двох лініях клітин. На це вказує і різний рівень експресії мРНК фактора EGR2 у контрольних клітинах нирки лінії HEK293 та в клітинах промієлоцитів лінії HL60 (дані не наведено). Низький базальний рівень експресії мРНК фактора EGR2 у клітинах нирки лінії HEK293 може свідчити про його меншу

функціональну роль у цих клітинах порівняно з мієлоїдними клітинами, де фактор EGR2 бере участь у регуляції мієлоїдної диференціації та в інших клітинних процесах. Те, що навіть у неспецифічних умовах та за відсутності мієлоїдспецифічних факторів надекспресія ZXDC призводить до підвищення рівня EGR2 у HEK293, свідчить про можливість прямої регуляції експресії мРНК фактора EGR2 транскрипційним фактором ZXDC шляхом його зв'язування з промоторною ділянкою гена EGR2.

Більш виражений рівень експресії мРНК фактора EGR2 у клітинах лінії HL60 імовірно зумовлений тим, що саме в цих клітинах він відіграє важливу роль під час диференціації, що забезпечується більш вираженою експресією в мієлоїдних клітинах факторів, які беруть участь у регуляції експресії фактора EGR2, а також у мієлоїдній диференціації, зокрема фактора PU.1, хоча не виключаються й інші, більш тонкі механізми регуляції активності промотора EGR2 під час диференціації.

Надекспресія транскрипційного фактора ZXDC активує промотор EGR2 у складі репортерної плазміди

Щоб визначити, чи впливає транскрипційний фактор ZXDC на активність транскрипції з промотору гена EGR2, було створено репортерну плазмиду, яка містила промоторну ділянку гена транскрипційного

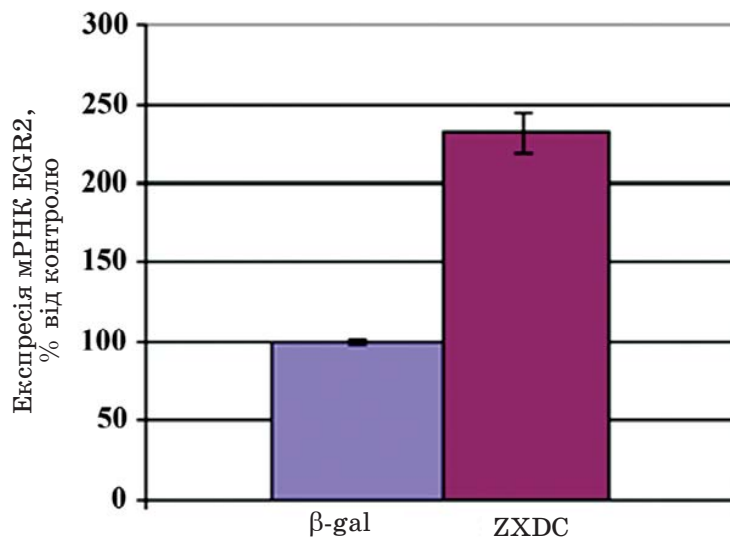


Рис. 1. Вплив надекспресії гена транскрипційного фактора ZXDC на рівень експресії мРНК фактора 2 ранніх змін росту EGR2 в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 порівняно з контрольними клітинами, трансфєкованими плазмідом рCMV-SPORT6-β-gal, що містить кДНК альфа-субодиниці бета-галактозидази під контролем промотору CMV, як і ZXDC, за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Наведено результати трьох незалежних експериментів

фактора EGR2 від -341 до +134 у плазміді pGL3basic. Дослідження проводили на ембріональних епітеліальних клітинах нирки лінії HEK293, які трансфекували плазмідами pGL3basic та pcDNA3.1-ZXDC, а також репортерною конструкцією pGL3-EGR2-341, в яких потім вимірювали продукт експресії репортерної системи — активність люциферази. Як впливає з даних, поданих на рис. 3, надекспресія транскрипційного фактора ZXDC суттєво посилювала функціональну активність промотору гена фактора EGR2 у репортерній конструкції pGL3-EGR2-341, оскільки люциферазна активність збільшувалась під час надекспресії ZXDC майже вдвічі, а це свідчить про здатність транскрипційного фактора ZXDC до активації промотору гена EGR2 у модельній репортерній системі. Можна припустити, що транскрипційний фактор ZXDC здатен до прямої активації промотору гена EGR2, але разом з тим активація транскрипції гена фактора EGR2 *in vivo* очевидно відбувається у разі залучення до активаційного комплексу ряду інших факторів регуляції транскрипції і є більш складним процесом порівняно з репортерною системою.

Транскрипційний фактор ZXDC зв'язується з промотором гена EGR2 *in vivo*

Наведені вище дані досліджень експресії репортерної конструкції вказують на можливість транскрипційного фактора ZXDC контролювати транскрипцію з промотору ге-

на EGR2. Однак репортерна система не має природного хроматинового генетичного контексту. У зв'язку з цим нами було проведено дослідження, метою яких було показати наявність зв'язування ендogenous ZXDC із промотором гена EGR2 *in vivo* за допомогою методу хроматинімунопреципітації.

Для цього клітини промієлоцитів лінії HL60 обробляли формальдегідом для «пришивання» усіх ДНК-зв'язувальних протеїнів до ДНК, потім виділяли ядра клітин, лізували їх та обробляли ультразвуком, щоб отримати фрагменти ДНК близько 250 пар нуклеотидних залишків. Лізати ядер клітин інкубували з антитілом до ZXDC чи з контрольними мишачими IgG. Імунні комплекси виділяли за допомогою мікрогранул зі зв'язаним протеїном G, промивали, руйнували зшиті з ДНК протеїни, обробляючи їх протеїназою, та виділяли отримані фрагменти ДНК. Одержану ДНК було проаналізовано за допомогою кількісної ПЛР у режимі реального часу із застосуванням праймерів до промоторної ділянки гена EGR2 та праймерів до ділянки, що розташована на відстані 4500 нуклеотидних залишків від місця ініціації транскрипції (неспецифічний контроль). Обчислення проводили за методом дельта-дельта C(t), порівнювали рівень збагачення преципітованого хроматину фрагментами промотору EGR2, використовуючи антитіла до ZXDC та контрольних неспецифічних антитіл. Результати цих досліджень наведено на рис. 4. Вони переконливо свід-

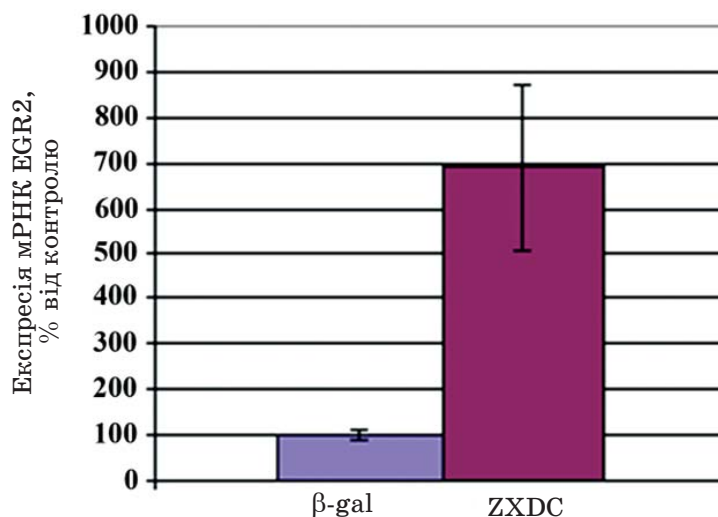


Рис. 2. Вплив надекспресії гена транскрипційного фактора ZXDC на рівень експресії мРНК фактора EGR2 в культурі промієлоцитів лінії HL60 порівняно з контрольними клітинами, трансфєкованими плазмідною pCMV-SPORT6-β-gal, за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Наведено результати трьох незалежних експериментів

чать про те, що транскрипційний фактор ZXDC може зв'язуватися з промотором гена *EGR2 in vivo*, оскільки його присутність на промоторі цього гена у недиференційованих клітинах промієлоцитів лінії HL60 виявлено за допомогою методу хроматинімунопреципітації.

Відомо, що транскрипційний фактор бере участь у диференціації гематопоетичних клітин, пригнічуючи експресію генів, які відповідають за диференціацію мієлоїдних клітин-попередників у гранулоцити та активуючи ті гени, що беруть участь у диференціації гематопоетичних клітин у моноцити [12, 13]. Так, у недиференційованих клітинах промієлоцитів лінії HL60 ген *EGR2* експресується на дуже низькому рівні, але в разі диференціації їх у гранулоцити під впливом 5'-трансретиноевої кислоти рівень експресії цього гена зростає в 4 рази. Водночас, при диференціації у моноцити за допомогою 12-О-тетрадеканоїлфорбол-13-ацетату рівень експресії гена *EGR2* зростає майже у 6 000 разів.

Отже, здатність транскрипційного фактора ZXDC до підвищення експресії гена *EGR2* і той факт, що в недиференційованих клітинах промієлоцитів ZXDC присутній на промоторній ділянці гена *EGR2*, свідчить про можливу участь ZXDC у регуляції на-

прямку диференціації клітин лінії HL60 шляхом модуляції експресії гена *EGR2* на рівні транскрипції.

Таким чином, встановлено, що надекспресія транскрипційного фактора ZXDC посилює експресію гена фактора 2 ранніх змін росту *EGR2* в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 значно меншою мірою, ніж у культурі промієлоцитів лінії HL60, що вказує на тканинно-специфічний характер цих змін.

Показано, що в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 з надекспресією транскрипційного фактора ZXDC істотно посилюється експресія люциферази репортерною конструкцією pGL-EGR2-341, яка містила промоторну ділянку гена *EGR2* від -341 до +134, що вказує на активацію транскрипції ізолюваного промотору гена *EGR2* за посиленої експресії гена ZXDC.

Стимулювальний ефект надекспресії транскрипційного фактора ZXDC на транскрипцію гена *EGR2* у клітинах промієлоцитів лінії HL60 зумовлений зв'язуванням транскрипційного фактора ZXDC з промоторною зоною гена *EGR2*, про що свідчать дані хроматинімунопреципітації.

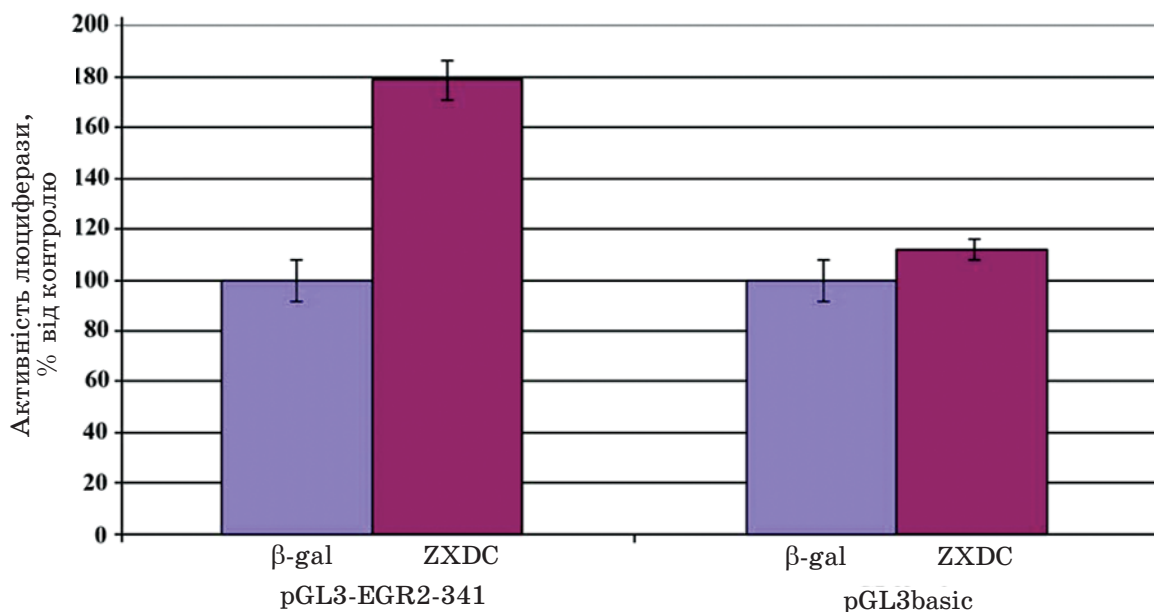


Рис. 3. Вплив надекспресії гена транскрипційного фактора ZXDC на рівень експресії люциферази репортерною конструкцією pGL-EGR2-341, яка містила промоторну ділянку гена *EGR2* від -341 до +134 у плазміді pGL3basic в ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 з надекспресією гена транскрипційного фактора ZXDC порівняно з контрольними клітинами, трансфеккованими плазмідною pCMV-SPORT6-β-gal.

Наведено результати трьох незалежних експериментів

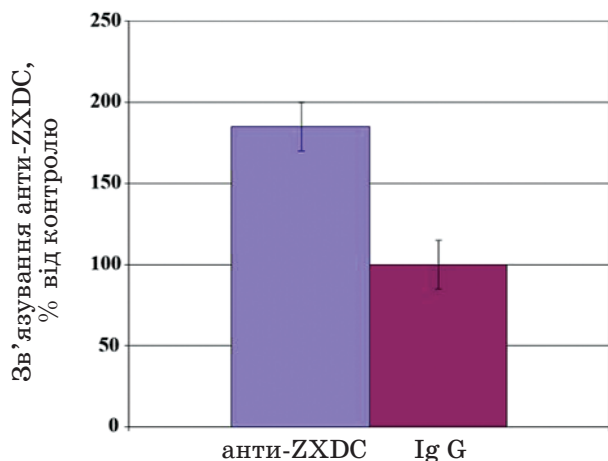


Рис. 4. Інтенсивність зв'язування транскрипційного фактора ZXDC з промотором гена EGR2 у клітинах промієлоцитів лінії HL60 за даними хроматинімунопреципітації фактора ZXDC із лізатів цих клітин з використанням антитіл до ZXDC порівняно з контрольними IgG. Наведено результати трьох незалежних експериментів

ЛІТЕРАТУРА

1. Al-Kandari W., Jambunathan S., Navalgund V. et al. ZXDC, a novel zinc finger protein that binds CIITA and activates MHC gene transcription // *Mol. Immunol.* — 2007. — V. 44, N 4. — P. 311–321.
2. Al-Kandari W., Koneni R., Navalgund V. et al. The zinc finger proteins ZXDA and ZXDC form a complex that binds CIITA and regulates MHC II gene transcription // *J. Mol. Biol.* — 2007. — V. 369, N 5. — P. 1175–1187.
3. Aleksandrova A., Galkin O., Koneni R., Fontes J. An N- and C-terminal truncated isoform of zinc finger X-linked duplicated C protein represses MHC class II transcription // *Mol. Cell. Biochem.* — 2010. — V. 337, N 1–2. — P. 1–7.
4. Галкін О. В., Мінченко О. Г. Зміни в експресії генів, зумовлені надекспресією транскрипційного фактора ZXDC у ембріональних клітинах нирки лінії HEK293 // *Укр. біохім. журн.* — 2010. — Т. 82, № 1. — С. 100–107.
5. Joseph L., Le Beau M., Jamieson G. et al. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with «zinc-binding finger» structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1988. — V. 85. — P. 7164–7168.
6. Vesque C., Charnay P. Mapping functional regions of the segment-specific transcription factor Krox-20 // *Nucl. Acid. Res.* — 1992. — V. 20. — P. 2485–2492.
7. Topilko P., Schneider-Maunoury S., Levi G. et al. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system // *Nature.* — 1994. — V. 371. — P. 796–799.
8. Zorick T., Syroid D., Arroyo E. et al. The transcription factors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation // *Mol. Cell. Neurosci.* — 1996. — V. 8. — P. 129–145.
9. Chen Z., Torrens J., Anand A. et al. Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms // *Cell. Metab.* — 2005. — V. 1. — P. 93–106.
10. Bradley E., Ruan M., Oursler M. Novel pro-survival functions of the Kruppel-like transcription factor Egr2 in promotion of macrophage colony-stimulating factor-mediated osteoclast survival downstream of the MEK/ERK pathway // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283. — P. 8055–8064.
11. Lauritsen J., Kurella S., Lee S. et al. Egr2 is required for Bcl-2 induction during positive selection // *J. Immunol.* — 2008. — V. 181. — P. 7778–7785.
12. Kharbanda S., Nakamura T., Stone R. et al. Expression of the early growth response 1 and 2 zinc finger genes during induction of monocytic differentiation // *J. Clin. Invest.* — 1991. — V. 88. — P. 571–577.
13. Rangnekar V., Aplin A., Sukhatme V. The serum and TPA responsive promoter and intron-exon structure of EGR2, a human early growth response gene encoding a zinc finger protein // *Nucl. Acid. Res.* — 1990. — V. 18. — P. 2749–2757.
14. Laslo P., Spooner C., Warmflash A. et al. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates // *Cell.* — 2006. — V. 126. — P. 755–766.
15. Krysinska H., Hoogenkamp M., Ingram R. et al. A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the c-fms gene // *Mol. Cell. Biol.* — 2007. — V. 27. — P. 878–887.
16. Friedman A. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development // *Oncogene.* — 2007. — V. 26. — P. 6816–6828.
17. Winnay J., Hammer G. Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation // *Mol. Endocrinol.* — 2006. — V. 20. — P. 147–166.
18. Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucl. Acid. Res.* — 2001. — V. 29. — P. E45.

**АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ
ГЕНА EGR2 В ГЕНЕТИЧЕСКИ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ
СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ
ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА ZXDC**

**ACTIVATION OF EGR2 GENE
TRANSCRIPTION IN GENETICALLY
MODIFIED CELLS WITH OVER
EXPRESSION OF TRANSCRIPTION
FACTOR ZXDC**

А. В. Галкин^{1,2}
А. Г. Минченко³

O. V. Galkin^{1,2}
O. H. Minchenko³

¹Университет медицинского центра Канзаса,
г. Канзас, США

²Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

³Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

¹University of Kansas Medical Center,
Kansas City, Kansas, USA

²Kyiv Taras Shevchenko National University

³Palladin Institute of Biochemistry
of National Academy of Science of Ukraine,
Kyiv

E-mail: ominchenko@yahoo.com

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Транскрипционный фактор ZXDC принимает участие в регуляции экспрессии гена MHCII у эукариот. Ранее с помощью микроаррей-анализа и полимеразной цепной реакции было установлено, что сверхэкспрессия фактора ZXDC в эмбриональных клетках почки линии HEK293 приводит к повышению уровня экспрессии ряда других генов, в частности BDNF, CDKN1C, IL5Ra и EGR2. В данном исследовании с использованием количественной полимеразной цепной реакции было определено, что уровень экспрессии мРНК EGR2 повышается в 2,3 раза в эмбриональных клетках почки линии HEK293 и почти в 7 раз — в культуре промиелоцитов линии HL60 с усиленной экспрессией транскрипционного фактора ZXDC. Для выяснения механизмов увеличения уровня экспрессии гена EGR2 мы клонировали промоторную область гена EGR2 (от -341 до +134) в репортерную плазмиду pGL3basic с экспрессией люциферазы. Установлено, что при котрансфекции клеток линии HEK293 плазмидными конструкциями pGL-EGR2-341 и pcDNA3.1-ZXDC экспрессия люциферазы в этих клетках увеличивалась почти в 2 раза. Кроме того, с использованием хроматиниммунопреципитации было показано, что транскрипционный фактор ZXDC связывается с промоторной областью гена EGR2 в клетках промиелоцитов линии HL60 *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют о том, что транскрипционный фактор ZXDC принимает участие в регуляции транскрипции гена EGR2, связываясь с его промоторной областью.

Transcription factor ZXDC participates in the regulation of MHCII gene expression in eukaryotes. Recently, using micro array and polymerase chain reaction assays, it was shown that overexpression of factor ZXDC in embryonic kidney cell line HEK293 enhances the expression of many genes, among them BDNF, CDKN1C, IL5Ra and EGR2. In this investigation, using quantitative polymerase chain reaction, it was shown that EGR2 mRNA expression is increased 2.3 times in embryonic kidney cell line HEK293 and almost 7 times in culture of myelocytes HL60 line which overexpress transcription factor ZXDC. In order to understand the induction mechanism of EGR2 gene expression, we cloned the promoter region of EGR2 gene (from -341 to +134) into a pGL3basic reporter plasmid with luciferase expression. It was determined that during co-transfection of HEK293 cell line with pGL-EGR2-341 and pcDNA3.1-ZXDC plasmid constructs, the expression of luciferase increased almost twice. Moreover, using chromatin immune precipitation assay, it was shown that the transcription factor ZXDC binds with the promoter region of EGR2 gene in promyelocytic leukemia cell line HL60 *in vivo*. The obtained data show that the transcription factor ZXDC regulates EGR2 gene transcription by binding with its promoter region.

Key words: transcription factors, ZXDC, EGR2, gene overexpression, transcription regulation, promyelocytic cells HL60, kidney cells HEK293.

Ключевые слова: транскрипционные факторы, ZXDC, EGR2, сверхэкспрессия гена, регуляция транскрипции, клетки промиелоцитов HL60, клетки почки HEK293.