

УДК 577.112.7:616

## ТРАНСКРИПЦІЙНИЙ ФАКТОР ZXDC ПРИЙМАЄ УЧАСТЬ У РЕГУЛЯЦІЇ ПРОЦЕСІВ МІЄЛОЇДНОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ

<sup>1,2</sup>Галкін О.В., <sup>3</sup>Мінченко О.Г.

<sup>1</sup>Університет медичного центру Канзасу, м. Канзас, США;

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

<sup>3</sup>Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України, Київ;

e-mail: ominchenko@yahoo.com, ogalkin@kumc.edu

Надійшла до редакції 13.02.2010

Транскрипційний фактор еукаріот ZXDC приймає участь у регуляції експресії генів МНСІІ, BDNF, CDKN1C та IL5R $\alpha$ , а також контролює транскрипцію гена EGR2, зв'язуючись з його промотором. У даному дослідженні встановлено, що надекспресія транскрипційного фактора ZXDC в клітинах промієлоцитів HL60 призводить до підвищення рівня експресії генів C/EBP $\alpha$ , CD14, CD11b та LRG1, але фактор ZXDC не активує промотор гена C/EBP $\alpha$  у складі люциферазної репортерної плазмиди. При надекспресії факторів GF11, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  та PU1 у клітинах HL60 спостерігалась транскрипційна репресія гена ZXDC. Отримані дані свідчать про те, що ZXDC може брати участь у регуляції диференціації гематопоетичних клітин, регулюючи експресію інших факторів диференціації.

**Ключові слова:** ZXDC, C/EBP $\alpha$ , CD14, GF11, клітини HL60, регуляція транскрипції.

### ВСТУП

ZXDC (zinc finger X-linked duplicated family member C) – фактор транскрипції еукаріот, що належить до родини ZXD білків. Разом з іншими членами ZXD родини, ZXDA, ZXDC2, та фактором транскрипції C/EBP $\alpha$ , ZXDC утворює комплекс, що зв'язується з промотором гена головного комплексу гістосумісності МНСІІ (major histocompatibility complex class II) та активує його транскрипцію [1-3].

Було показано також, що транскрипційний фактор ZXDC може брати участь у регуляції експресії деяких інших генів. За допомогою мікроарей аналізу встановлено, що надекспресія ZXDC в клітинах НЕК293 призводить до підвищення рівня транскрипції генів фактора 2 ранніх змін росту EGR2 (early growth response 2), отриманого з мозку нейротропного фактора BDNF (brain-derived neurotrophic factor), інгібітору 1C циклін-залежної кінази CDKN1C (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C), альфа рецептора інтерлейкіну 5 IL5R $\alpha$  (interleukin 5 receptor,  $\alpha$ ) та інших, що беруть участь у регуляції клітинного циклу, міжклітинних взаємодій, дозріванні і диференціації нервових клітин та клітин імунної системи [4]. Надекспресія фактора ZXDC призводила до більш сильного підвищення рівня експресії EGR2 у клітинах промієлоцитів лінії HL60 у порівнянні з клітинами лінії НЕК293, що свідчить про можливу функціональну роль транскрипційного фактора ZXDC у диференціації клітин мієлоїдного ряду. Також було показано, що фактор ZXDC зв'язується з промотором EGR2, клонованим у репортерну плазмиду, та активує

його. За допомогою імунопреципітації хроматину була виявлена здатність транскрипційного фактора ZXDC зв'язуватись *in vivo* з промотором гена EGR2 в клітинах HL60 та брати участь у регуляції його транскрипції [5].

Відомо, що ген EGR2 задіяний у диференціації клітин імунної системи мієлоїдного ряду і бере участь у регуляції диференціації мієлоїдних попередників у моноцити [6]. Також встановлено, що за надекспресії фактора ZXDC підвищується рівень експресії гена IL5R $\alpha$ , що бере участь у диференціації еозинофілів [7]. Крім того, було виявлено високі рівні експресії ZXDC у гранулоцитах та у стовбурових клітинах кісткового мозку. Ці факти свідчать про те, що фактор ZXDC може брати участь у транскрипційній регуляції гематопоезу та диференціації клітин-попередників.

Диференціація клітин імунної системи контролюється через посередництво деяких факторів транскрипції, кожний з яких регулює експресію пулу інших регуляторних та структурних генів, що в свою чергу опосередковують запуск та виконання специфічних для даної клітинної субпопуляції програм диференціації [9]. Експресія кожного з цих факторів запускається в певний момент часу і підтримується на певному рівні. Рівень їх експресії в клітині та взаємодія між ними є ключовими чинниками, що визначають майбутнє клітин під час диференціації. Деякі фактори є специфічними лише для певних субпопуляцій клітин і виконують свою функцію лише в певний момент, інші можуть працювати на різних етапах розвитку клітин і рівень їх експресії може змінюватись у широких межах.

Згідно з сучасною моделлю диференціації клітин імунної системи, головними факторами, що опосередковують диференціацію клітин мієлоїдної гілки є PU.1, ССААТ/енхансер зв'язуючі білки С/ЕВР $\alpha$  та С/ЕВР $\epsilon$  і головний фактор гранулопоєзу GF11 [10]. Відомо, що PU.1 є продуктом гена SP11, належить до родини ETS факторів транскрипції та експресується в мієлоїдних попередниках і у зрілих мієлоїдних клітинах [11]. Визначальна роль цього фактора у транскрипційній регуляції диференціації мієлоїдних та лімфоїдних клітин опосередковується наявністю PU.1-зв'язуючих послідовностей у регуляторних ділянках більшості мієлоїд-специфічних та частини лімфоїд-специфічних генів. Рівень експресії PU.1 зростає під час монопоєзу, виходячи на високий рівень у диференційованих моноцитах, і спадає при диференціації у напрямку еритроїдної та Т-клітинної гілки [12]. У мишей, нокаутних по гену PU.1, не розвиваються моноцити та значно знижується рівень нейтрофілів.

Протягом деякого часу вважалось, що PU.1 є головним чинником монопоєзу, стимулюючи диференціацію СМР (загальні мієлоїдні попередники) у GMP (попередники гранулоцитів/моноцитів) та подальшу диференціацію, але останні дані свідчать, що PU.1 також бере участь у регуляції гранулопоєзу, а також на ранніх етапах диференціації мультіпотентних попередників (MPP) у СМР, сприяючи мієлоїдній диференціації і пригнічуючи лімфоїдну. Так, надекспресія PU.1 у плюрипотентних клітинних лініях на низькому рівні призводить до гранулопоєзу, а надекспресія на високому рівні – до монопоєзу [13]. Крім того, встановлено, що надекспресія PU.1 у В та Т клітинах призводить до їх конверсії у макрофаги.

Аналіз генів, що регулюються через посередництво PU.1, показав, що гени EGR1 та EGR2 активуються за допомогою PU.1 і сприяють монопоєзу на пізніх стадіях диференціації гранулоцитів, що утворюють колонії (CFU-M) у моноцити, в той же час пригнічуючи гени, задіяні в гранулопоєзі [14]. EGR фактори містять цинкові пальці, за допомогою яких зв'язуються з промоторами цільових генів. Виключення функції гена EGR2 у мієлоїдних клітинних лініях призводить до індукції генів, специфічних для нейтрофілів, таких як GF11, а також було показано, що EGR2 здатний до репресії промотору GF11, інгібуючи гранулопоєз.

Таким чином, рівень експресії PU.1 і його взаємодія з іншими факторами є визначальним чинником напрямку диференціації мієлоїдних та лімфоїдних попередників.

С/ЕВР $\alpha$  та С/ЕВР $\epsilon$  належать до родини ССААТ/енхансер зв'язуючих білків, Фактори С/ЕВР здатні димеризуватися через посередництво С-кінцевих доменів та зв'язуватися з ДНК промоторних ділянок цільових генів, регулюючи рівень їх транскрипції. С/ЕВР $\alpha$  експресується на ранніх етапах диференціації стовбурових клітин у мієлоїдних попередниках, а під час гранулопоєзу рівень його

експресії суттєво підвищується. Недавно було показано, що у мишей, нокаутних по гену С/ЕВР $\alpha$ , не розвиваються нейтрофіли та еозинофіли і що С/ЕВР $\alpha$  регулює експресію багатьох генів, задіяних у мієлоїдній диференціації, зокрема таких як гени рецепторів М- і G-фактора, що стимулює колонії (M-CSF і G-CSF), фактора GF11 та генів мієлопероксидази і еластази, але останні є специфічними для зрілих клітин, нейтрофілів [15]. С/ЕВР $\alpha$  також активно задіяний у гранулопоєзі на стадії диференціації GMP (16), регулюючи транскрипцію генів miR223 та c-myc.

Разом з фактором PU.1 С/ЕВР $\alpha$  бере участь у виборі між гранулоцитарним та моноцитарним напрямками диференціації. Так, на ранніх стадіях диференціації С/ЕВР $\alpha$  активує промотор PU.1, сприяючи диференціації СМР у GMP попередники [17]. На більш пізніх етапах баланс рівнів експресії PU.1 та С/ЕВР $\alpha$  визначає вибір між моноцитарною та гранулоцитарною диференціацією, оскільки С/ЕВР $\alpha$  здатен зв'язуватися з PU.1 та блокувати його функцію на рівні білок-білкових взаємодій та взаємодій з ДНК [18].

Відомо, що С/ЕВР $\epsilon$  експресується у гранулоцитах на пізніх стадіях диференціації, рівень його експресії є визначальним для диференціації еозинофілів [19].

Транскрипційний регулятор GF11 є одним із найважливіших факторів мієлоїдної диференціації, оскільки він здатний до репресії транскрипції цілого ряду генів, включаючи EGR2, PU.1 та С/ЕВР $\alpha$  [14]. Він експресується у мієлоїдних попередниках, нейтрофілах та ранніх Т і В клітинах і відсутній у гранулоцитарних клітинах. У мишей, нокаутних по гену GF11, не виявляються нейтрофіли і спостерігаються аномально високі рівні експресії моноцитарних генів у інших мієлоїдних попередниках [20]. Транскрипційний фактор GF11 відіграє важливу роль у підтриманні гранулоцитарного напрямку диференціації CFU-G, репресуючи гени, задіяні у монопоєзу, у попередниках гранулоцитів/моноцитів.

Метою даного дослідження було встановити, чи може транскрипційний фактор ZXDC приймати участь у регуляції гематопоєзу у клітинах промієлоцитів лінії HL60 з надекспресією ZXDC на рівні експресії генів, що контролюють протікання гематопоєзу, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу, вимірюючи рівень експресії генів, що задіяні на різних етапах і ключових напрямках диференціації мієлоїдних клітин (GF11, PU.1, С/ЕВР $\alpha$  і С/ЕВР $\epsilon$ ), та маркерних генів, що експресуються у диференційованих клітинах (CD11b, CD14, LRG1 і MBP).

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

**Клітини.** В роботі було використано клітини промієлоцитів лінії HL60.

**Плазміди.** Для трансфекції клітин промієлоцитів HL60 було використано плазміди pcDNA3.1-ZXDC та pCMV-SPORT6- $\beta$ -gal, описані раніше [1].

Плазмиди pcDNA3.1-6xHis-C/EBP $\alpha$  та pcDNA3.1-6xHis-C/EBP $\epsilon$  було отримано шляхом клонування кДНК С/EBP $\alpha$  та С/EBP $\epsilon$  у плазмиду pcDNA3.1-6xHis, що була раніше створена у лабораторії Dr. Fontes. кДНК С/EBP $\alpha$  було отримано за допомогою полімеразної ланцюгової реакції кДНК клітин лінії HL60 з використанням праймерів 5'-AAAAGAATTCATGCCGGGAGAАСТСТААСТС -3' та 5'-AAAАТСТАGACTCGCACGGCTCGGCAAG -3', проведено рестрикцію продукту полімеразної ланцюгової реакції і вектора по сайтам рестрикції EcoRI та XbaI, продукти рестрикції було виділено та проведено лігазну реакцію. кДНК С/EBP $\epsilon$  було отримано з використанням праймерів 5'-AAAAGGATCCCATGTCCCACGGGACСТААСТАСТС -3' А та 5'-AAAAGAATTCGTGCCСАСААТССАССАGССАGССТС -3', проведено рестрикцію продукту полімеразної ланцюгової реакції і вектора по сайтам рестрикції EcoRI та BamHI, продукти рестрикції було виділено та проведено лігазну реакцію.

Плазмиди pcDNA3.1-Myc-GFI1 та pcDNA3.1-Myc-PU.1 були створені раніше у лабораторії Dr. Fontes.

Плазмиду рGL-C/EBP $\alpha$ -r $\gamma$  було отримано шляхом клонування промоторної ділянки гена С/EBP $\alpha$  -263:-2 у репортерну плазмиду рGL3basic. Промоторну ділянку було ампліфіковано з допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів 5'-AAAAGCTAGCCGCTGGTTCCGCGCCССАТ -3' та 5'-AAAAAAGCTTGGGAGTTAGAGTTCTCCCG -3', проведено рестрикцію продукту полімеразної ланцюгової реакції і вектора по сайтам рестрикції NheI та HindIII, продукти рестрикції було виділено та проведено лігазну реакцію.

**Трансфекція.** Клітини промієлоцитів лінії HL60 було посяяно у 10 см плашку у кількості  $0.25 \times 10^6$  на лунку у 10 мл поживного середовища RPMI-1640 (Cellgro) з додаванням 4 мМ глутаміну та 10% бичачої сироватки. Культуру клітин інкубували при 37 °C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> протягом 48 годин. Далі клітини центрифугували, рахували та ресуспендували у поживному середовищі до щільності  $1 \times 10^7$ /мл. 0.5 мл клітинної суспензії переносили в кювети для електропорації, додавали 40  $\mu$ г плазмідної ДНК pcDNA3.1-ZXDC чи рCMV-SPORT6- $\beta$ -gal. Електропорацію проводили за допомогою електропоратора BioRad при характеристиках імпульсу 240 В, 960 мкФ. Трансфеговані клітини інкубували при 4 °C протягом 30 хв, переносили в поживне середовище RPMI-1640 з додаванням 4 мМ глутаміну та 20% бичачої сироватки та інкубували при 37 °C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> протягом 48 годин.

**Виділення РНК.** Тотальну РНК з клітин виділяли за допомогою реагенту Trizol (Invitrogen). Культури клітин осаджували центрифугуванням, клітинний осад розчиняли у 1 мл Trizol, додавали 200 мл хлороформу, перемішували та центрифугували при 16600 g та +4 °C протягом 15 хв. Відбирали 350 мл супернатанту, змішували з 350 мл ізопропанолу,

додавали 5 мг лінійного акриламиду, інкубували протягом 20 хв. при -20 °C та центрифугували при 16600 g та +4 °C протягом 20 хв. До отриманого осаду РНК приливали 600 мл 70% етанолу для відмивки залишків ізопропанолу та центрифугували при 16600 g та +4 °C протягом 5 хв. Далі видаляли супернатант, інкубували пробірки відкритими при кімнатній температурі протягом 2 хв., та розчиняли висушений осад РНК у стерильній воді, вільній від домішок нуклеїнових кислот та нуклеаз (BioRad).

**Зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу.** Виділену тотальну РНК було використано для реакції зворотної транскрипції за допомогою Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Німеччина), відповідно протоколу виробника, використовуючи оліго-dT праймер. Для реакції зворотної транскрипції брали 1 мг РНК.

Далі кДНК (чи ДНК, отримана після хроматин-імунопреципітації) була ампліфікована у полімеразній ланцюговій реакції. Для реакції брали 8.2 мл води, вільної від нуклеаз, 1 мл кДНК, 0.8 мл 10 мМ суміші праймерів та 10 мл двократної реакційної суміші для полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (Fermentas).

Послідовності праймерів, що було використано для полімеразної ланцюгової реакції:

Для детекції кДНК С/EBP $\alpha$ : прямий 5'-СААГААGTCGGTGGACAAGAACA -3'; зворотний 5'-СТGGCTCGCACGGCTCGGGCAAG -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 2.

Для детекції кДНК С/EBP $\epsilon$ : прямий 5'-АТСТСТТТGCCGTGAAGCCAG -3'; зворотний 5'-GCCGAAGGTATGTGGAGGGTA -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 2.

Для детекції кДНК CD11b: прямий 5'-GATAGTGACATTCCTTCTTGATTGAT -3'; зворотний 5'-AGACAAACTCCTTCATCCGCCGAAAGT -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 1.94.

Для детекції кДНК CD14: прямий 5'-TCGTGGGCGACAGGGCGT -3'; зворотний 5'-GGAАСТTGTGGGGACAGAGAG -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 2.

Для детекції кДНК GAPDH: прямий 5'-АТСАСТGCCACCCAGAAGACT -3'; зворотний 5'-GATGACCTTGCCACAGCCTT -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 1.91.

Для детекції кДНК GFI1: прямий 5'-TGGGCGGGCTCСТААAGTG -3'; зворотний 5'-GGCTTGTGCTGCTCCAGGCTC -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 2.

Для детекції кДНК LRG1: прямий 5'-CCTCTTGGAGCAGACAGCGAC -3'; зворотний 5'-CCTCTTGGAGCAGACAGCGAC -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 1.95.

Для детекції кДНК MBP: прямий 5'-СТСССТТАСТТСТGGCTCTCTA -3'; зворотний 5'-СТСТGGTGTCTCCTCATCCTCA -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 1.89.

Для детекції кДНК PU.1: прямий 5'-AGGTGTCTGACGGCGAGGCGGATG -3'; зворотний 5'-GCGGAGCAGGTCCAACAGGAAGT -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 1.85.

Для детекції кДНК ZXDC: прямий 5'-CAGCAAGAAGTATTACCGAGC -3'; зворотний 5'-GCATGGAAATGGGGAGGACTCA -3'. Ефективність для даної пари праймерів становила 1.84.

Ампліфікацію проводили у наступних умовах: 94 °C - 15 с; 60 °C - 20 с; 72 °C - 20 с; 45 циклів. Для праймерів до кДНК PU.1 та GF11 гібридизацію проводили при 67 °C, для C/EBP $\alpha$  - при 65 °C, для C/EBP $\epsilon$  - при 63 °C.

Реакцію проводили за допомогою ампліфікатора Iq5 (BioRad), результати обробляли за допомогою програмного забезпечення фірми-виробника. Обчислення проводили за методом Delta-delta C(t) [8].

**Люциферазний аналіз.** Клітини HEK293 було посіяно в 24-лункову плашку у кількості  $1 \times 10^5$  на лунку у 1 мл поживного середовища RPMI-1640 (Cellgro) з 4 mM глутаміну та 10% бичачої сироватки. Культури клітин інкубували при 37 °C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> протягом 24 годин. Використовуючи стерильні полістиренові пробірки, до 400 мл середовища OptiMem (Gibco) додавали 1 мг ДНК та 2 мл TurboFect, інкубували протягом 20 хв. при кімнатній температурі та додавали до культури клітин.

Для трансфекції було використано суміш плазмід:

1) pRLdCMV (0.025  $\mu$ g), pGL-C/EBP $\alpha$ -pr (0.2  $\mu$ g) та pCMV-SPORT6-b-gal (0.8  $\mu$ g)

2) pRLdCMV (0.025  $\mu$ g), pGL-C/EBP $\alpha$ -pr (0.2  $\mu$ g), pcDNA3.1-ZXDC (0.3  $\mu$ g) та pCMV-SPORT6-b-gal (0.5  $\mu$ g)

3) pRLdCMV (0.025  $\mu$ g), pGL3basic (0.2  $\mu$ g) та pCMV-SPORT6-b-gal (0.8  $\mu$ g)

4) pRLdCMV (0.025  $\mu$ g), pGL3basic (0.2  $\mu$ g), pcDNA3.1-ZXDC (0.3  $\mu$ g) та pCMV-SPORT6-b-gal (0.5  $\mu$ g)

Трансфеговані клітини інкубували протягом 48 годин при 37 °C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>. Далі проводили люциферазний аналіз з використанням Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, США) відповідно до протоколу виробника. Для вимірювання люциферазної активності Renilla та Firefly брали 5 мл лізату, вимірювання проводили за допомогою люменометра моделі 20/20 виробництва Turner Biosystems. Сигнал вираховували як відношення активності люциферазної активності Renilla до Firefly.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оскільки отримані раніше дані свідчать про те, що транскрипційний фактор ZXDC може впливати на рівень експресії генів EGR2 та IL5R $\alpha$ , що беруть

участь у процесах диференціації, нашою метою було встановити чи надекспресія ZXDC також може впливати на рівень експресії головних регуляторів диференціації, а саме генів PU.1, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  та GF11. Щоб оцінити загальний вплив надекспресії ZXDC на клітини HL60, визначали також зміни експресії маркерів диференціації, характерних для зрілих та спеціалізованих клітин, а саме CD11b, загального маркера мієлоїдних клітин, CD14 специфічного для моноцитів та макрофагів, LRG, специфічного для нейтрофілів, та MBP1, маркера еозинофілів.

### Надекспресія ZXDC в клітинах HL60 призводить до підвищення рівня експресії генів C/EBP $\alpha$ , CD14, CD11b, LRG1.

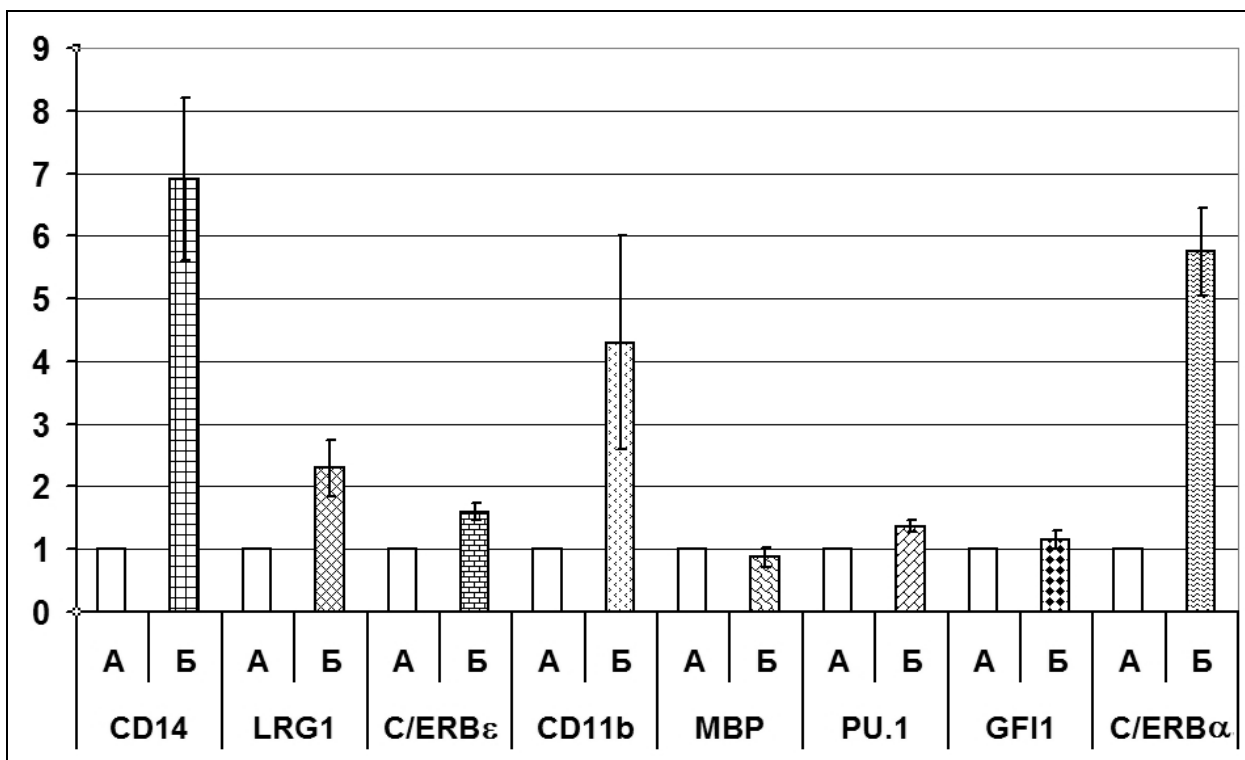
Для експерименту було використано промієлоїдну лінію клітин HL60. Клітини HL60 було трансфеговано плазмідною pCMV-SPORT6- $\beta$ -gal, що містить заклоновану  $\alpha$ -субодиницю  $\beta$ -галактозидази, чи плазмідною pcDNA-3.1-ZXDC. Надекспресію фактора ZXDC у клітинах було перевірено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Для визначення зміни рівня експресії цільових генів було використано дані трьох незалежних експериментів.

Згідно з отриманими даними, рівень експресії C/EBP $\alpha$  зріс у 5.74 разів, CD11b – у 4.33 разів, CD14 – у 6.9 разів, LRG1 – у 2.3 разів (рис. 1). Рівень експресії інших генів суттєвим чином не змінювався.

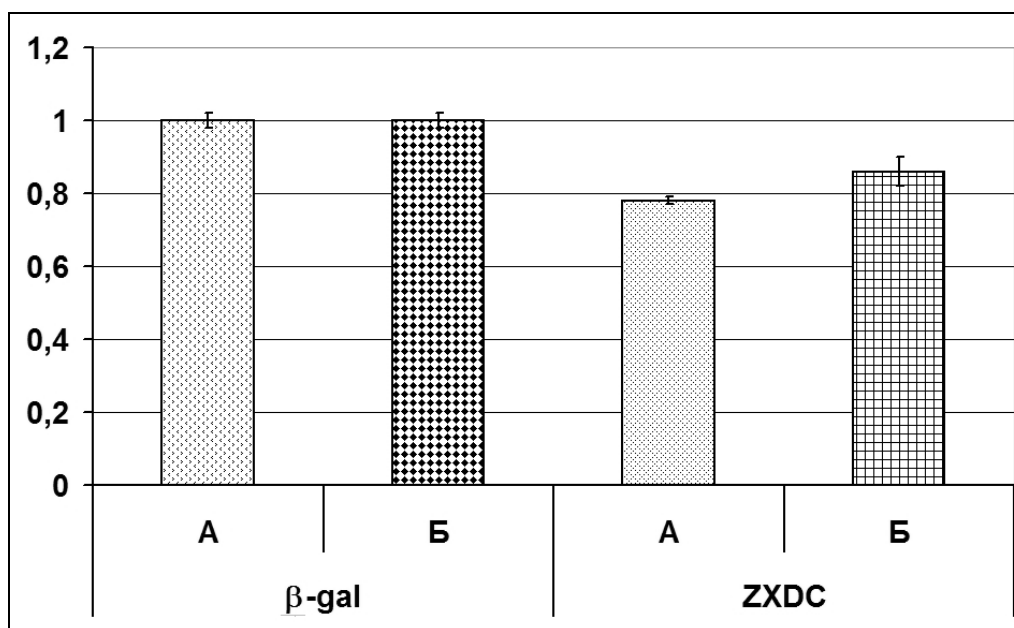
Підвищення рівня експресії CD11b є загальним свідченням того, що надекспресія фактора ZXDC активувала програми диференціації, характерні для мієлоїдних клітин, причому рівень CD11b підвищується при диференціації клітин HL60 як у гранулоцити, так і у моноцити.

Підвищення рівня експресії маркерних генів C/EBP $\alpha$  та LRG1 відповідає зміні загального профілю експресії генів у напрямку гранулоцитарної диференціації. З іншої сторони, підвищення рівня CD14 та, як було показано раніше, EGR2, свідчить про те, що клітини після надекспресії ZXDC набули ознак, характерних для моноцитів.

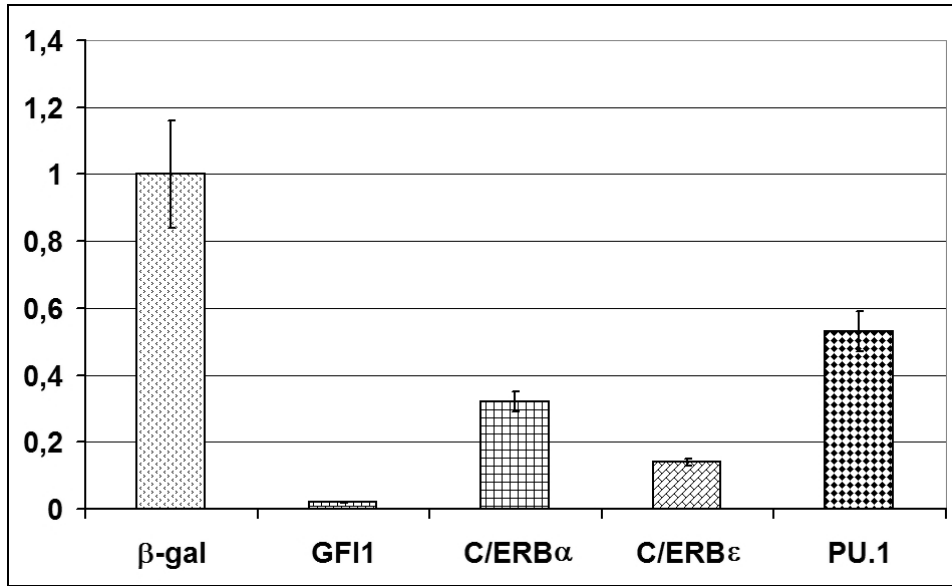
Таким чином, зміни профілю експресії генів у клітинах HL60 після надекспресії транскрипційного фактора ZXDC безумовно свідчать про його участь у генній регуляції диференціації клітин мієлоїдної гілки. Фактор C/EBP $\alpha$  задіяний на різних етапах гематопоезу, включаючи самооновлення стовбурових клітин, диференціацію GMP, CFU-G та CFU-M, так що для встановлення функціонального значення впливу фактора ZXDC на експресію гена C/EBP $\alpha$  необхідні додаткові експерименти на клітинних лініях, що моделюють кожний етап диференціації окремо.



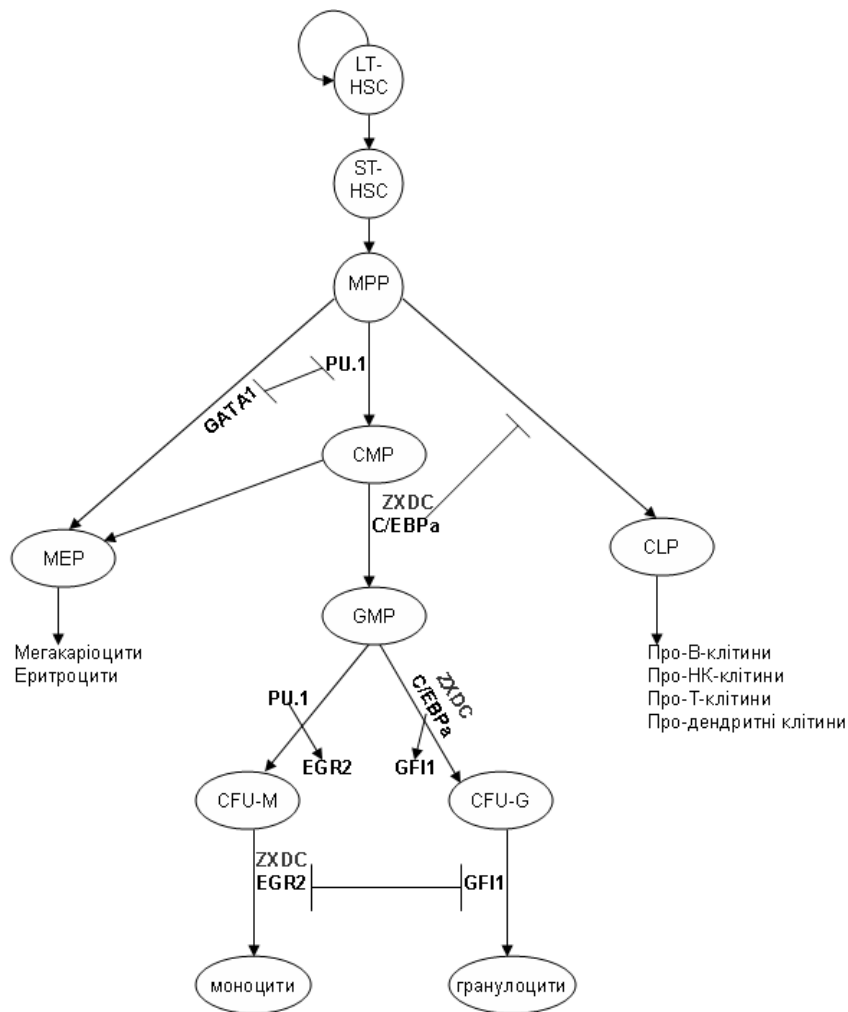
**Рис. 1.** Рівень експресії мРНК C/EBPα, C/EBPε, CD14, CD11b, LRG1, MBP, PU.1, GFI1 (A) в клітинах HL60 з надекспресією ZXDC за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Клітини HL60 було трансфоровано плазмідною рсDNA3.1-ZXDC або контрольною плазмідною рCMV-SPORT6-β-gal, що містить кДНК ZXDC або бета-галактозидази під контролем промотору CMV.



**Рис. 2.** Вплив ZXDC на активність промотору C/EBPα у люциферазній репортерній системі в клітинах HL60, які було трансфоровано плазмідною з промотором гена C/EBPα (pGL-C/EBPα-pr) та геном люциферази Renilla або контрольною плазмідною рGL3basic з геном люциферази Renilla без промотору. Клітини HL60 було трансфоровано також плазмідною рсDNA3.1-ZXDC або контрольною плазмідною рCMV-SPORT6-β-gal, що містить кДНК ZXDC або бета-галактозидази під контролем промотору CMV, а також плазмідною рRL-dCMV, що містить кДНК люциферази Firefly без промотору. Показники люциферазної активності Renilla нормалізували по даним люциферазної активності Firefly.



**Рис. 3.** Вплив надекспресії факторів GF11, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$ , PU1 в клітинах HL60, трансфєкованих плазмїдами рсDNA3.1-Мус-GF11, рсDNA3.1-Мус-PU.1, рсDNA3.1-6His-C/EBP $\alpha$ , рсDNA3.1-6His-C/EBP $\epsilon$  та рCMV-SPORT6- $\beta$ -gal (контроль), на рївень експресї ZXDC за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.



**Рис. 4.** Схема транскрипційної регуляції гематопоєзу з урахуванням можливої участі ZXDC. Позначення: LT-HSC – довго живучі попередники гематопоєтичних стовбурових клїтин, ST-HSC – коротко живучі попередники гематопоєтичних стовбурових клїтин, MPP – мультипотентні попередники, MEP – мегакарїоцито-еритроїдні попередники, CLP – спільні лїмфоїдні попередники, GMP – попередники гранулоцитів/моноцитів, CFU-M - макрофаги, що утворюють колонїї, CFU-G - гранулоцити, що утворюють колонїї.

При надекспресії транскрипційного фактора ZXDC спостерігається підвищення експресії регуляторних та структурних генів, що експресуються як гранулоцитами, так і моноцитами у процесі їх диференціації. Можливо, що фактор ZXDC може брати участь в обох процесах і його надекспресія призводить до одночасної часткової активації обох програм диференціації GMP.

**ZXDC не здатний до прямої регуляції клонованого промотору C/EBP $\alpha$  у люциферазній репортерній системі.**

Підвищення рівня експресії гена C/EBP $\alpha$  може свідчити про те, що фактор ZXDC регулює його експресію прямо, зв'язуючись з його промотором, або опосередковано, через посередництво інших факторів. C/EBP $\alpha$  відіграє неоднозначну роль у диференціації мієлоїдних клітин, будучи залученим і у моноцитарній, і у гранулоцитарній диференціації а також на більш ранніх стадіях. Якщо фактор ZXDC здатний до регуляції рівня експресії C/EBP $\alpha$ , то можливо він може бути залучений також до регуляції процесів, що опосередковуються цим фактором, таких як регуляція диференціації попередників гематопоетичних стовбурових клітин (HSC), CMP та GMP.

Нами було поставлено завдання з'ясувати чи активує транскрипційний фактор ZXDC експресію C/EBP $\alpha$  прямо, зв'язуючись з промотором гена, чи опосередковано, через посередництво інших факторів транскрипції. Для цього промоторну ділянку гена C/EBP $\alpha$  -263:-2 було проклоновано у репортерну плазмиду pGL3basic. Клітини HEK293 було трансфектовано плазмидами pGL3basic, pGL-C/EBP $\alpha$ -pr та pDNA3.1-ZXDC. Після трансфекції вимірювали люциферазну активність репортерних плазмід. Згідно з отриманими даними, надекспресія ZXDC не викликала істотних змін люциферазної активності плазмиди pGL-C/EBP $\alpha$ -pr, що свідчить про відсутність у транскрипційного фактора ZXDC здатності до активації промотору гена C/EBP $\alpha$  у модельній репортерній системі (рис. 2). Таким чином, активація експресії C/EBP $\alpha$  при надекспресії фактора ZXDC відбувається непрямим шляхом. Можливо, що фактор ZXDC активує інші гени, продукти експресії яких беруть участь у регуляції експресії C/EBP $\alpha$ , або вступає у білок-білкові взаємодії з іншими факторами транскрипції і лише у комплексі з ними може зв'язуватися з промотором C/EBP $\alpha$ .

**Вплив надекспресії факторів GF11, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  та PU.1 на рівень експресії транскрипційного фактора ZXDC.**

Отримані нами дані свідчать про те, що ZXDC може брати участь у мієлоїдній диференціації, модулюючи активність ключових генів диференціації, таких як C/EBP $\alpha$  та EGR2. Кожен із цих генів диференціації в свою чергу є членом регуляторного каскаду і його рівень експресії контролюється іншими генами. Таким чином, якщо фактор ZXDC задіяний у

процесах диференціації, то можливо що рівень його експресії також може прямо чи опосередковано регулюватися іншими факторами диференціації. Щоб визначити, як надекспресія головних факторів мієлоїдної диференціації впливає на рівень експресії транскрипційного фактора ZXDC у клітинах HL60, було проведено трансфекцію цих клітин плазмидами pDNA3.1-Myc-GF11, pDNA3.1-Myc-PU.1, pDNA3.1-6His-C/EBP $\alpha$ , pDNA3.1-6His-C/EBP $\epsilon$  та контрольною плазмидою pCMV-SPORT6- $\beta$ -gal для надекспресії в них факторів GF11, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  та PU.1. Рівень експресії цільових генів у клітинах HL60 було перевірено за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (рис. 3). Для визначення зміни рівня експресії генів було використано дані трьох незалежних експериментів.

Згідно з отриманими даними, надекспресія PU.1 привела до часткового (0.52) зниження рівня експресії фактора ZXDC. При надекспресії C/EBP $\alpha$  та C/EBP $\epsilon$  спостерігали більш сильне зниження рівня експресії ZXDC (0.31 та 0.14 відповідно), тоді як надекспресія GF11 повністю блокувала його експресію.

Таким чином, головні фактори мієлоїдної диференціації у свою чергу можуть модулювати експресію транскрипційного фактора ZXDC, а це є свідченням того, що рівень експресії ZXDC під час процесів диференціації має важливе значення і строго регулюється прямо чи опосередковано факторами C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  та GF11. Так як жодний з цих факторів не викликав підвищення експресії ZXDC, то можливо, що опосередкована ними регуляція рівня експресії транскрипційного фактора ZXDC носить характер зворотного зв'язку.

Оскільки головний фактор гранулопоезу GF11 повністю репресує транскрипцію фактора ZXDC, то це може вказувати на те, що транскрипційний фактор ZXDC задіяний на етапі вибору клітинами GMP гранулоцитарного чи моноцитарного напрямку диференціації, тобто при переході GMP у CFU-G, але не на більш пізніх стадіях диференціації (CFU-G у зрілі гранулоцити). У зв'язку з тим, що транскрипційний фактор ZXDC здатний активувати експресію C/EBP $\alpha$  та EGR2 і вступати у білок-білкові взаємодії з GF11 та PU.1 (неопубліковані дані Fontes lab), то можливо, що він бере участь в обох напрямках диференціації, модулюючи функцію вищезгаданих факторів.

Таким чином, нами було показано, що при надекспресії ZXDC підвищується рівень експресії генів C/EBP $\alpha$ , CD11b, CD14 та LRG1, а рівень експресії генів MBP, GF11, PU.1 та C/EBP $\epsilon$  залишається незмінним і що ZXDC не здатний до прямої активації промотору гена C/EBP $\alpha$  і очевидно його вплив на рівень експресії гена C/EBP $\alpha$  є опосередкованим та здійснюється шляхом взаємодії з іншими транскрипційними факторами, причому фактор ZXDC може регулювати рівень експресії генів C/EBP $\alpha$  та LRG1, задіяних на різних стадіях регуляції

диференціації гематопоетичних клітин, і в свою чергу рівень експресії ZXDC регулюється факторами GF11, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  та PU.1. За умов надекспресії фактора ZXDC у клітинах HL60, в них експресуються гени, характерні як для гранулоцитів, так і для моноцитів, що свідчить про участь ZXDC у виборі напрямку диференціації клітин GMP. Беручи до уваги дані про те, що фактори PU.1 та C/EBP $\alpha$  також задіяні на більш ранніх стадіях диференціації гематопоетичних клітин-попередників, то можна припустити, що і транскрипційний фактор ZXDC також може приймати участь у регуляції диференціації і на цих етапах, що заслуговує на подальше дослідження.

### ВИСНОВКИ

1. За допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції було показано, що надекспресія транскрипційного фактора ZXDC у клітинах HL60 призводить до підвищення рівня експресії генів C/EBP $\alpha$ , CD14, CD11b та LRG1, внаслідок чого клітини набувають ознак, характерних як для гранулоцитарної, так і для моноцитарної диференціації.
2. З використанням люциферазного аналізу з репортерною плазмідною, що містить клонований промотор гена C/EBP $\alpha$ , було показано, що фактор ZXDC не здатен до прямої транскрипційної активації ізолюваного промотору C/EBP $\alpha$ .
3. Надекспресія факторів GF11, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  та PU1 в клітинах HL60 призводила до часткової чи повної транскрипційної репресії гена ZXDC.
4. Результати даної роботи свідчать про те, що транскрипційний фактор ZXDC здатний непрямым шляхом регулювати рівень транскрипції гена C/EBP $\alpha$ , задіяного у гранулоцитарній диференціації мієлоїдних попередників, і в свою чергу, ZXDC знаходиться під транскрипційним контролем інших факторів мієлоїдної диференціації як GF11, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  та PU1 і може брати участь у регуляції процесів диференціації, що опосередковується цими факторами.

### Література

1. Al-Kandari W., Jambunathan S., Navalgund V., Koneni R., Freer M., Parimi N., Mudhasani R., Fontes J. ZXDC, a novel zinc finger protein that binds C/EBP $\alpha$  and activates MHC gene transcription // *Mol. Immunol.* – 2007. – Vol. 44, N4. – P. 311-321.
2. Al-Kandari W., Koneni R., Navalgund V., Aleksandrova A., Jambunathan S., Fontes J. The zinc finger proteins ZXDA and ZXDC form a complex that binds C/EBP $\alpha$  and regulates MHC II gene transcription // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 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. – Vol. 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. ж.* – 2010. – Vol. 82, N 1. – С. 100-107.
  5. Галкін О.В., Мінченко О.Г. Активация транскрипції гена EGR2 в генетично модифікованих клітинах з над експресією транскрипційного фактора ZXDC // *Біотехнологія.* – 2010. – № 5. – С. 57-65.
  6. Laslo P., Spooner C., Warmflash A., Lancki D., Lee H., Sciammas R., Gantner B., Dinner A., Singh H. // Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates // *Cell.* – 2006. – Vol. 126. – P. 755-766.
  7. Plaetinck G., Van der Heyden J., Tavernier J. et al. // *J. Exp. Med.* – 1990. – Vol. 172, N 3. – P. 683-691.
  8. Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucl. Acid. Res.* – 2001. – Vol. 29. – P. E45.
  9. Friedman A. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development // *Oncogene.* – 2007. – Vol. 26. – P. 6816-6828.
  10. Rosenbauer F., Tenen D. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 105-117.
  11. Klemsz M., McKercher S., Celada A., et al. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene // *Cell.* – 1990. – Vol. 61. – P. 113-124.
  12. Anderson M., Weiss A., Hernandez-Hoyos G., et al. Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage // *Immunity.* – 2002. – Vol. 16. – P. 285-296.
  13. Dahl R., Walsh J., Lancki D., et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP $\alpha$  ratio and granulocyte colony-stimulating factor // *Nat. Immunol.* – 2003. – Vol. 4. – P. 1029-1036.
  14. Laslo P., Spooner C., Warmflash A., et al. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates // *Cell.* 2006. – Vol. 126. – P. 755-766.
  15. Zhang D., Zhang P., Wang N. et al. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ -deficient mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 94. – P. 569-574.
  16. Friedman A. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21. – P. 3377-3390.
  17. Kummalue T., Friedman A. Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBP $\alpha$  binds and activates the promoter of the PU.1 gene // *J. Leuk. Biol.* – 2003. – Vol. 72. – P. 464-470.
  18. Reddy V., Iwama A., Iotzova G. Granulocyte inducer C/EBP $\alpha$  inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions // *Blood.* – 2002. – Vol. 100. – P. 483-490.
  19. Yamanaka R., Barlow C., Lekstrom-Himes J., et al. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein  $\epsilon$ -deficient mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 13187-13192.
  20. Hock H., Hamblen M., Rooke H., et al. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation // *Immunity.* – 2003. – Vol. 18. – P. 109-120.



---

**ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР ZXDC УЧАСТВУЕТ В ГЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ МИЕЛОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ****Галкин А. В., Минченко А. Г.**

Транскрипционный фактор эукариот ZXDC принимает участие в регуляции экспрессии генов MHCII, BDNF, CDKN1C и IL5R $\alpha$ , а также контролирует транскрипцию гена EGR2, связываясь с его промотором. В данном исследовании установлено, что надэкспрессия транскрипционного фактора ZXDC в клетках промиелоцитов HL60 приводит к повышению уровня экспрессии генов C/EBP $\alpha$ , CD14, CD11b и LRG1, но ZXDC не активирует промотор гена C/EBP $\alpha$  в составе люциферазной репортерной плазмиды. При надэкспрессии факторов GFI1, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  и PU.1 в клетках HL60 наблюдалась транскрипционная репрессия гена ZXDC. Полученные данные свидетельствуют о том, что фактор ZXDC может брать участие в регуляции дифференциации гематопоетических клеток, регулируя экспрессию других факторов дифференциации.

**Ключевые слова:** ZXDC, C/EBP $\alpha$ , HL60, HEK293, регуляция транскрипции.

**TRANSCRIPTION FACTOR ZXDC IS INVOLVED IN TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF MYELOID DIFFERENTIATION****Galkin O.V., Minchenko O.H.**

Eukaryotic transcription factor ZXDC participates in the regulation of MHCII, BDNF, CDKN1C and IL5R $\alpha$  gene expression. It also controls the transcription of EGR2 gene via interaction with its promoter region. In this investigation was shown that overexpression of transcription factor ZXDC in pro-myelocytes cell line HL60 leads to increase of C/EBP $\alpha$ , CD14, CD11b and LRG1 gene expression levels, but ZXDC could not activate C/EBP $\alpha$  promoter in luciferase reporter plasmids. Transcription repression of ZXDC gene was observed in HL60 cells at overexpression of GFI1, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$  and PU.1 factors. Results of this study demonstrated that ZXDC can participate in the regulation of hematopoietic cells differentiation via control of other differentiation factors expression.

**Key words:** ZXDC, C/EBP $\alpha$ , HL60, HEK293, regulation of transcription

---