

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА ZXDC У РЕГУЛЯЦІЇ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ПРОМІЄЛОЦИТІВ

О. Г. МІНЧЕНКО¹, О. В. ГАЛКІН², Д. О. МІНЧЕНКО^{1,3}

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

²Університет медичного центру Канзасу, США

³Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Отримано 03.10.2011

В огляді здійснено аналіз даних стосовно ролі транскрипційного фактора ZDXC (zinc finger X-linked duplicated family member C) у регуляції експресії генів, зокрема таких, що задіяні в регуляції процесів диференціювання промієлоцитів. Із великої кількості генів, експресія яких істотно змінюється за умов посиленої експресії транскрипційного фактора ZDXC в ембріональних клітинах нирки людини HEK293 та в клітинах промієлоцитів людини HL60, більш детально досліджено та проаналізовано лише частину генів (ERG2, PU.1, C/EBP α , C/EBP ϵ , GFI1 та LRG1). На прикладі гена EGR2, що кодує синтез важливого транскрипційного фактора регуляції диференціювання, розглянуто молекулярні механізми регуляції експресії EGR2 транскрипційним фактором ZDXC шляхом його зв'язування з промотором цього гена. Проаналізовано також механізми регуляції транскрипції гена ZDXC залежними від нього транскрипційними факторами: надекспресія ключових факторів мієлоїдного диференціювання C/EBP α , C/EBP ϵ та PU.1 у клітинах HL60 призводить до зниження рівня експресії ендогенної мРНК транскрипційного фактора ZXDC, а за надекспресії фактора GFI1 спостерігалось навіть повне виключення експресії мРНК ZXDC. Наведені дані свідчать про важливу роль транскрипційного фактора ZDXC у регуляції процесів диференціювання промієлоцитів.

Ключові слова: транскрипційний фактор ZDXC, регуляція транскрипції, фактори диференціювання, EGR2, клітини HEK293 та HL60.

Регуляція експресії генів на рівні транскрипції є вкрай важливим етапом у підтриманні процесів метаболізму в різних організмів, а також в адаптації клітин чи організму до змін навколишнього середовища та дії різних чинників. Більш того, зміни в експресії певних генів можуть бути причиною виникнення чи ускладнення перебігу різноманітних захворювань. Більшість метаболічних процесів у клітинах контролюються регуляторними генами, асоційованими з каскадами факторів транскрипції (сигнальними шляхами). Вони забезпечують чіткий контроль експресії генів, за якого у відповідних тканинах та органах у певний момент часу відбуваються певні зміни метаболічних процесів, необхідних для нормального розвитку та життєдіяльності організмів. Ембріональний розвиток організму

також є яскравим прикладом постадійної активації груп регуляторних генів, які впливають на ріст, диференціацію, рух та функції клітин. Надзвичайно важливими регуляторними генами є гени біологічного годинника, які контролюють циклічний характер перебігу більшості метаболічних процесів в організмі, основні регуляторні системи та поведінку організмів [1–4]. Основну частину молекулярних компонентів біологічного годинника становлять ключові транскрипційні фактори, пов'язані із сигнальними шляхами, через які відбувається зміна експресії великої групи генів та регуляція метаболічних шляхів [5–9]. Порушення циркадіального ритму призводить до виникнення різних захворювань, включаючи метаболічний синдром, ожиріння, цукровий діабет та злоякісні пухлини [10–12].

Останнім часом дедалі більше уваги приділяють вивченню ролі транскрипційних факторів у різних метаболічних процесах, а також в ембріональному розвитку, контролі росту, поділу та диференціювання клітин як у нормі, так і за різних патологічних станів. Мутації генів чи їх виключення можуть спричинити глибокі порушення функціонування відповідних клітинних механізмів та розвиток різноманітних патологій, у тому числі й онкологічних захворювань, оскільки часто один фактор може впливати на експресію цілої групи генів як член сигнальної мережі [13–19]. У багатьох випадках пухлинна трансформація клітин відбувається через активацію онкогенів, зумовлену порушенням функціонування транскрипційних факторів, які контролюють їх експресію. Не менш важливим чинником, що лежить в основі виникнення онкологічних захворювань, є порушення нормального диференціювання клітин. Неспецифічна активація факторів транскрипції, які контролюють цей процес, може призводити до переходу клітини у стадію безконтрольного росту і втрати ознак, характерних для диференційованих клітин, зокрема гемопоетичних [20–22].

Транскрипційний фактор ZXDC, структурна організація, експресія та функціональне значення

Відкриття нових факторів транскрипції, виявлення їхніх генів-мішеней, особливостей їх регуляції та ролі у клітинних процесах є вкрай важливим для глибокого розуміння нормальних та патологічних процесів у клітинах. Нещодавно було відкрито транскрипційний фактор ZXDC (zinc finger X-linked duplicated family member C) і встановлено, що він бере участь у регуляції експресії генів MHC1 і MHC2, а також контролює процеси росту та поділу клітин [23, 24]. Фактор ZXDC належить до родини ZXD-протеїнів, яка включає також і недавно виявлену ізоформу протеїну ZXDC — ZXDC2 [24]. На рис. 1 наведено схематичне зображення структури різних представників родини ZXD-протеїнів, показано основні функціональні домени та ступінь їх гомології. Найбільш консервативною є ділянка цинкових пальців. Відомо, що ZXDC експресується на високому рівні у низці тканин та органів людини, а саме в серці, нирках і печінці, на середньому рівні — у тимусі, лімфатичних вузлах, мозку та шлунку і на низькому рівні — у кістковому мозку, селезінці та легенях. Також значні рівні його

експресії було виявлено в плюрипотентних гемопоетичних стовбурових клітинах, гранулоцитарно-моноцитарних попередниках та в зрілих гранулоцитах. Ген ZXDC складається з 10 екзонів, тоді як гомологічні до нього гени ZXDA та ZXDB мають у своєму складі лише один екзон. Із гена ZXDC синтезується не лише мРНК ZXDC, а й ZXDC2, але з альтернативного промотору [25]. Молекула фактора ZXDC містить 4 домени. Функцію N-кінцевого домену досі не встановлено, а центральна її частина містить домен із 10 цинковими пальцями, який задіяний у зв'язуванні транскрипційного фактора ZXDC з ДНК. Амінокислотна послідовність 578-688 у складі ZXDC становить траснактивувальний домен, амінокислотна послідовність від 689 до 858 являє собою C-кінцевий домен, що містить лейцинбагаті ділянки і бере участь у протеїн-протеїнових взаємодіях з транскрипційним фактором СІТА [25].

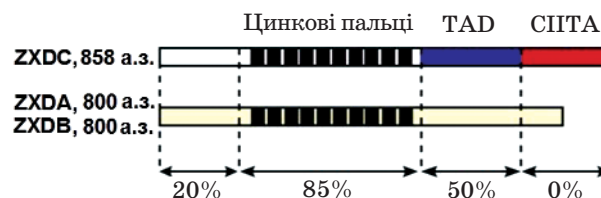


Рис. 1. Схематичне зображення різних представників родини транскрипційних факторів ZXDC, їхні функціональні домени та рівень гомології ділянок між різними ZXDC: а. з. — амінокислотні залишки

ZXDC2 має у своєму складі лише сім цинкових пальців, оскільки перші три з них відсутні. Хоча цинкові пальці в основному відповідають за зв'язування з ДНК, є дані, що свідчать про участь їх у протеїн-протеїнових взаємодіях та зв'язуванні РНК. Відомо, що ZXDC здатен утворювати функціональний димер із ZXDA, причому було показано, що домени із цинковими пальцями у складі обох протеїнів опосередковують їх взаємодію. Було встановлено, що фактор ZXDC2 може зв'язуватись як із ZXDA, так і з ZXDC [25].

Функціональний комплекс ZXDC із ZXDA взаємодіє з фактором СІТА і входить до складу МНСІІ-енхансеосоми, яка зв'язується з промотором МНСІІ й активує транскрипцію цього гена, причому ZXDC у даному разі підсилює активаційний ефект СІТА [24]. Більш того, було показано, що пригнічення експресії ендogenous ZXDC у клітинах HeLa призводить до зниження СІТА-опосередкованої активації експресії мРНК МНСІІ. Транскрипційний фактор ZXDC може

також вступати у протеїн-протеїнові взаємодії з двома іншими компонентами МНСП-енхансосоми, а саме RFX5 та RFX-ANK, і таким чином відіграє важливу роль у транскрипційній регуляції експресії гена МНСП [24].

Відомо також, що транскрипційний фактор ZXDC вступає у протеїн-протеїнові взаємодії з двома мієлоїдспецифічними факторами транскрипції — PU.1 та GFI1, що є ключовими факторами, які опосередковують контроль мієлоїдного диференціювання, причому взаємодія ZXDC із фактором PU.1 підвищує стабільність та час напівжиття останнього. Було також встановлено, що в клітинах промієлоцитів HL60 фактор ZXDC зв'язаний з промотором гена MYC, який перебуває під транскрипційним контролем фактора GFI1. Ці результати свідчать, що транскрипційний фактор ZXDC, можливо, бере участь і в контролі мієлоїдного диференціювання, оскільки може впливати на функціональну активність факторів GFI1 та PU.1.

Зміни в експресії генів за надекспресії ZXDC

Оскільки ZXDC експресується в багатьох тканинах та органах людини, можна припустити, що його функції як фактора транскрипції не обмежуються клітинами імунної системи і що він, імовірно, може виступати в ролі як загального, так і тканинно-специфічного фактора транскрипції. Нещодавно було виявлено, що посилена експресія фактора ZXDC в ембріональних клітинах нирки людини призводить до підвищення рівня експресії мРНК понад 600 генів. Серед них — гени, що мають стосунок до диференціювання та функціонування клітин імунної системи і рівень експресії яких підвищувався більш ніж утричі: IL5R A — альфа рецептор інтерлейкіну 5 (interleukin 5 receptor, α), IL9R — рецептор інтерлейкіну 9 (interleukin 9 receptor) та EGR2 — фактор 2 ранніх змін росту (early growth response 2) [26]. Наведені вище дані переконливо свідчать про ширшу біологічну роль цих генів, зокрема в ембріональних клітинах нирки. Значні зміни (у 3–8 разів) рівня експресії виявлено також в ембріональних клітинах нирки для генів, що контролюють перебіг клітинного циклу: посилення експресії показано для CDC14A — гомолога A CDC14 (CDC14 homolog A), RSPO3 — R-спондин 3 (R-spondin 3), FGF18 — попередника фактора росту фібробластів 18 (fibroblast growth — factor 18 precursor), CCNA1 — цикліну A1 (cyclin A1), FGFR3 — рецептора

3 фактора росту фібробластів (fibroblast growth factor receptor 3) та CDKN1C — інгібітора 1C циклінзалежної кінзи (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C) і зниження експресії для MAPK1 — активованої мітогеном протеїнкінази 1 (mitogen-activated protein kinase 1) та CDK10 — циклінзалежної кінзи 10 (cyclin-dependent kinase 10) [26].

Надекспресія гена ZXDC також істотно активувала експресію генів, що мають відношення до міжклітинних взаємодій і взаємодій клітин із міжклітинним матриксом: MMP15 — металопротеїназу матриксу 15 (matrix metalloproteinase 15) та ICAM4 — внутрішньоклітинну молекулу адгезії 4 (intercellular adhesion molecule 4) і функціонування нервової тканини: BDNF — нейротропного фактора, отриманого з мозку (brain-derived neurotrophic factor), GABRG3 — A-гамма-3 рецептора гамма-аміномасляної кислоти (γ -amino butyric acid A receptor, γ 3) та CHRNA3 — альфа-3 поліпептиду холінергічного рецептора нікотинного типу (cholinergic receptor, nicotinic, α -polypeptide 3) [26].

Таким чином, гени, експресія яких змінилась в ембріональних клітинах нирки під впливом надекспресії транскрипційного фактора ZXDC, належать до різних функціональних груп і беруть участь у різноманітних клітинних процесах та механізмах регуляції. Частина з них задіяна в регуляції внутрішньоклітинних процесів, включаючи регуляцію клітинного циклу (CDC14, CCNA1, MAPK1, CDK10, CDKN1C, MAP3K6), сигнальну трансдукцію (RSPO3, FZD1, FGFR3), проліферацію та диференціацію клітин (FGF18, FGFR3, DLL1), а інша група генів — у регуляції диференціювання і проліферації нейронів (BDNF) та в механізмах синаптичної передачі (GABRG3, CHRNA3) [26].

Експресія гена EGR2 регулюється транскрипційним фактором ZXDC

Головну увагу в цій роботі зосереджено на факторах, що беруть участь у диференціюванні клітин імунної системи, зокрема на транскрипційному факторі EGR2, що пригнічує експресію генів, відповідальних за диференціацію нейтрофілів, та активує експресію генів, відповідальних за диференціацію макрофагів, опосередковуючи таким чином вибір напрямку диференціювання мієлоїдних клітин-попередників. Транскрипційний фактор EGR2 є членом родини EGR-протеїнів із цинковими пальцями типу Cys2His2, експресія яких індукується факторами росту, зокрема фактором росту нервів та епідер-

мальним фактором росту. Трансактиваційна активність транскрипційних факторів родини EGR модулюється коактиваторами та ко-репресорами, унаслідок чого ці фактори можуть активувати або репресувати процес транскрипції [27]. Відомо, що транскрипційні фактори родини EGR беруть участь у регуляції проліферації клітин і їх виключення в клітинах пухлин різних типів призводить до підвищення проліферації, оскільки EGR2 є асоційованим із супресором пухлин PTEN і контролює його активність [28]. Також було показано, що у мишей, нокаутних за геном EGR2, спостерігаються порушення розвитку середнього мозку та мієлінізації периферійних нервів, що є свідченням його ролі в регулюванні росту та диференціювання шваннівських клітин [29].

Транскрипційні фактори EGR1 та EGR2 відіграють важливу роль і в регуляції диференціювання мієлоїдних клітин, сприяючи моноцитарному диференціюванню та пригнічуючи гранулоцитарне, а в комплексі з фактором NAB2 пригнічують гранулопоез [30]. Показано, що в мієлоїдних клітинних лініях пригнічення експресії EGR2 призводить до індукції нейтрофілспецифічних генів і активації макрофагспецифічних, а надекспресія EGR2 спричинює репресію промотору гена GFI1, що містить сайт зв'язування EGR2 [31, 32]. GFI1, у свою чергу, репресує промотори EGR2 та PU.1, конкуруючи з ними за напрямок диференціювання [33]. Транскрипційний фактор EGR2 є важливим також для індукції експресії гена BCL-2 [34].

Експресія EGR2 перебуває під контролем PU.1 — головного фактора диференціювання моноцитів. Промотор гена EGR2 містить також елемент CArG1, що активує експресію мРНК EGR2 під впливом факторів сироватки та 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетату, а нокаут гена EGR2 у мишей призводить до дефектів у MCSF-залежному диференціюванні мієлоїдних попередників у макрофаги [35]. Відомо, що EGR2 в комплексі з фактором PU.1 зв'язується з промотором гена *c-fms*, одного з головних факторів регуляції моноцитів, і зумовлює його індукцію [36]. Загалом EGR2 відіграє важливу роль у виборі напрямку диференціювання мієлоїдних попередників, спонукаючи їх до диференціювання у моноцити [37].

Нещодавно на ембріональних клітинах нирки людини лінії HEK293 та промієлоцитах лінії HL60 було продемонстровано участь транскрипційного фактора ZXDC у регуляції експресії мРНК гена EGR2 [38]. Ця регуляція може відбуватись як прямим способом шляхом зв'язування фактора ZXDC

із промотором EGR2 та активації його експресії, так і опосередковано, через вплив ZXDC на експресію інших факторів транскрипції, що, у свою чергу, можуть змінювати експресію мРНК EGR2. Було показано, що надекспресія транскрипційного фактора ZXDC призводила до значно більшого підвищення рівня експресії EGR2 у клітинах HL60 (майже у сім разів) порівняно з клітинами HEK293 (у 2,3 раза) [38]. Ці результати переконливо свідчать про індукцію експресії мРНК EGR2 за умов підвищення рівня внутрішньоклітинної експресії транскрипційного фактора ZXDC, причому індукція експресії мРНК EGR2 спостерігається як у лінії ембріональних клітин нирки людини HEK293, так і в промієлоцитних клітинах HL60, хоча в клітинах HL60 вона є більш вираженою. Оскільки фактор ZXDC індукує експресію EGR2, то таким чином він може впливати і на клітинні функції, що контролюються транскрипційним фактором EGR2.

Було встановлено, що індукція промотору гена EGR2 в ембріональних клітинах нирки людини HEK293 та в мієлоїдних клітинах HL60 відбувається шляхом зв'язування ZXDC із ділянкою промотору з координатами від -55 до -29 відносно старту транскрипції та прямої транскрипційної активації, опосередкованої активаційним доменом ZXDC [38]. Більш того, присутність ZXDC на промоторі гена EGR2 було продемонстровано в недиференційованих мієлоїдних клітинах HL60.

У зв'язку з цим для підтвердження можливості зв'язування ендогенного ZXDC із промотором EGR2 в умовах, близьких до тих, у яких він є функціональним *in vivo*, було застосовано метод імунопреципітації хроматину мієлоїдних клітин HL60.

Раніше було показано, що надекспресія транскрипційного фактора PU.1 у різних клітинних лініях призводить до підвищення рівня експресії мРНК EGR2 [37], що може бути свідченням транскрипційного контролю гена EGR2 з боку фактора PU.1. І хоча біоінформатичний аналіз нуклеотидної послідовності промоторної ділянки гена EGR2 виявив два можливих сайти зв'язування транскрипційного фактора PU.1 (послідовність GAGGAA некодувального ланцюга) у позиціях від -339 до -333 та від -79 до -73 н. з. відносно точки старту транскрипції, експериментально було показано, що в регуляції промотору гена EGR2 бере участь лише проксимальний сайт зв'язування PU.1 (від -79 до -73 відносно точки транскрипційного старту) [38].

Оскільки EGR2 є ключовим транскрипційним фактором, який опосередковує ди-

ференціацію гранулоцитарно-моноцитарних попередників у моноцити, роль ZXDC у процесах моноцитарного та гранулоцитарного диференціювання з'ясовували на промієлоцитних клітинах HL60, що здатні диференціюватись у моноцити та нейтрофіли під впливом агентів диференціювання, використовуваних для дослідження як моноцитарного, так і гранулоцитарного диференціювання.

Процеси диференціювання супроводжуються підвищенням рівнів експресії мРНК певних транскрипційних факторів та низки регуляторних і структурних генів. Зміни експресії є маркерною характеристикою активізації відповідних клітинних механізмів, причому кожен проміжний стан, який проходить клітина, характеризується певним профілем експресії відповідних маркерних генів, і за ними можна визначити стадію диференціювання клітини. Такими маркерами є гени LRG1 та EGR2: LRG1 — маркер раннього диференціювання нейтрофілів, EGR2 — маркер диференціювання моноцитів та макрофагів. Окрім того, ключову роль у моноцитарному та гранулоцитарному диференціюванні відіграють транскрипційні фактори C/EBP α , C/EBP ϵ , GFI і PU,1 [35, 37, 39].

Нещодавно було встановлено, що за умов гранулоцитарного диференціювання клітин HL60 експресія мРНК маркерного гена LRG1 збільшилась у 21 раз, мРНК транскрипційного фактора C/EBP ϵ — у 2,2 раза, а експресія мРНК C/EBP α зменшилась у 3,3 раза. Після диференціювання клітин HL60 у моноцити зросли рівні експресії ключових транскрипційних факторів моноцитарного диференціювання (EGR2 — у 1320 разів, PU.1 — у 2 рази), а експресія мРНК гранулоцитарного фактора C/EBP ϵ зменшилась у 5 разів, хоча експресія мРНК PU.1 за диференціювання цих клітин в обох напрямках суттєво не змінилась [40]. Утім, є дані про підвищення рівня експресії мРНК фактора PU.1 у клітинах HL60, диференційованих у моноцити [41].

У клітинах промієлоцитів HL60 за умов надекспресії транскрипційного фактора ZXDC експресія мРНК як гранулоцитарного маркера диференціювання EGR2, так і моноцитарного — LRG1 також підвищилась (у 9,3 та 2,3 раза, відповідно), що може вказувати на участь ZXDC в обох процесах диференціювання [41]. Аналіз експресії генів PU.1, C/EBP α , C/EBP ϵ і GFI1, що є головними регуляторами диференціювання мієлоїдних клітин, та маркерів диференціювання CD11b (універсальний маркер мієлоїдних клітин), CD14 (експресується в зрілих моноцитах та макрофагах) і MBP1 (маркер еози-

нофілів) у клітинах HL60 за надекспресії ZXDC свідчить про значне збільшення рівня експресії мРНК C/EBP α , C/EBP ϵ , CD11b та CD14 без суттєвих змін в експресії інших досліджуваних генів [41]. Дослідження ролі транскрипційного фактора ZXDC у диференціюванні еритроїдних клітин продемонстрували збільшення рівня експресії мРНК транскрипційного фактора GATA1 та маркера диференціювання еритроїдних клітин CD36. Отже, за умов надекспресії фактора ZXDC у клітинах HL60 підвищується рівень експресії мРНК маркерних генів як гранулоцитарної (LRG), так і моноцитарної (CD14) та еритроїдної (GATA1, CD36) гілок диференціювання, а також транскрипційного фактора гранулоцитарного диференціювання C/EBP α і загального маркера мієлоїдних клітин CD11b.

Дослідження механізмів збільшення експресії гена C/EBP α показало, що транскрипційний фактор ZXDC не активує експресію промотору цього гена в репортерній конструкції у клітинах HL60 і не зв'язується з його промотором [41]. Таким чином, індукція експресії мРНК C/EBP α за надекспресії ZXDC відбувається шляхом ZXDC-опосередкованої індукції експресії інших факторів транскрипції, хоча не виключається наявність зв'язувальної ділянки гена C/EBP α поза межами використаної для репортерної конструкції ділянки гена (район інтрона чи 3'-ділянки).

Наведені вище дані свідчать про можливу участь транскрипційного фактора ZXDC у різних етапах гемопоезу, підвищуючи експресію фактора GATA1, головного чинника диференціювання еритроїдних клітин, фактора C/EBP α , що бере участь у ранньому гранулоцитарному та пізньому моноцитарному диференціюванні, а також EGR2, маркера диференціювання моноцитів і макрофагів. Очевидно, кожен із цих етапів регулюється сукупністю регуляторних та транскрипційних факторів за участю ZXDC, і співвідношення їх має вирішальний вплив на вибір клітиною напрямку диференціювання. Відомо, що кожен з трьох вищезазначених гемопоетичних факторів за умов надекспресії у гемопоетичних попередниках здатен диференціювати їх у клітини відповідної гілки [42]. Проте за надекспресії фактора ZXDC у клітинах HL60 не спостерігалось суттєвих морфологічних змін, характерних для гранулоцитів та моноцитів. Отже, надекспресії ZXDC та підвищення рівня експресії факторів GATA1, C/EBP α та EGR2 недостатньо для здійснення повної програми диференціювання. Можна припустити, що транскрипційний фактор ZXDC

здійснює переважно регуляторну та ампліфікувальну функції у процесах регуляції гемопоетичного диференціювання і тому його надекспресія спричинює часткову активацію різних програм диференціювання.

Нещодавно було встановлено, що надекспресія ключових факторів мієлоїдного диференціювання C/EBP α , C/EBP ϵ та PU.1 у клітинах HL60 призводить до зниження рівня експресії ендогенної мРНК ZXDC, а за надекспресії фактора GFI1 спостерігалось навіть повне виключення експресії транскрипційного фактора ZXDC [41]. Ці дані свідчать про його участь у складних каскадах взаємодій між гемопоетичними факторами. Таким чином, транскрипційний фактор ZXDC регулює експресію факторів C/EBP α , EGR2 та GATA1, взаємодіє з PU.1 та GFI1, і, у свою чергу, його експресія регулюється за участю GFI1, C/EBP α , C/EBP ϵ та PU.1, що підкреслює складність та багатоплановість взаємозв'язків між факторами гемопоетичного диференціювання та безумовно підтверджує інтегрованість ZXDC у систему їх взаємодій.

Аналізуючи наведені вище дані, можна припустити, що транскрипційний фактор ZXDC здебільшого задіяний у мієлоїдній гілці гемопоезу, адже більшість генів, які він регулює, експресуються саме в мієлоїдних попередниках, і рівень його експресії є високим саме у зрілих мієлоїдних клітинах. Оскільки транскрипційний фактор ZXDC експресується на ранніх стадіях диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин, причому в усіх органах кровотворення, а не лише у кістковому мозку, то можна вважати, що він бере участь у ключових точках вибору гемопоетичними попередниками між різними гілками диференціювання, але основну роль відіграє у моноцитарному диференціюванні разом з факторами EGR2 та GFI1. На рис. 2 наведено схему транскрипційної регуляції гемопоезу з урахуванням участі ZXDC та його функціональних взаємодій з основними гемопоетичними факторами транскрипції.

Окрім того, транскрипційний фактор ZXDC може бути частиною клітинних механізмів протипухлинного захисту, на що вказують дані про знижений рівень базальної експресії фактора EGR2 у клітинах HL60, які було отримано від пацієнтів, хворих на гостру мієлоїдну лейкемію, порівняно з ембріональними клітинами нирки HEK293 [38]. Відомо, що під час гранулоцитарного диференціювання мієлоїдних попередників у репресії гена EGR2 задіяний транскрипційний фактор GFI1 [35]. Можливо, цей механізм репресії також є і в клітинах HL60, і

таким чином зберігається біполярність лінії і не допускається її спонтанна диференціація у моноцити. На користь цього припущення свідчить те, що за гострої мієлоїдної лейкемії рівень експресії EGR2, що має протипухлинний ефект, знижений [43], рівень GFI1, що сприяє розвитку гострої мієлоїдної лейкемії, — підвищений, а рівень PU.1, функціонального антагоніста GFI1, — знижений [35, 44, 45]. Більш того, відомо, що мутантний алель гена GFI1 бере участь у розвитку гострої мієлоїдної лейкемії [46].

Нещодавно було встановлено, що транскрипційний фактор ZXDC присутній на промоторі EGR2 у недиференційованих клітинах HL60, а за їх диференціювання як у гранулоцити, так і в моноцити, він вивільнює промотор, що було показано методом імунопреципітації хроматину, хоча за диференціювання HL60 у моноцити рівень експресії EGR2 збільшується, а за диференціювання у гранулоцити залишається практично незмінним [38].

Таким чином, транскрипційні фактори, що є компонентами сигнальних систем у різних клітинах, відіграють важливу роль в регуляції перебігу більшості метаболічних процесів в організмі, ембріонального розвитку, в контролі росту, поділу та диференціювання клітин як у нормі, так і за різних патологій (рис. 2). Мутації чи виключення генів, що кодують синтез транскрипційних факторів, можуть спричинювати глибокі порушення функціонування відповідних клітинних механізмів та розвиток різноманітних патологій, у тому числі й онкологічних захворювань. Транскрипційний фактор ZXDC є важливою складовою цих регуляторних механізмів, бере участь у регуляції експресії великої кількості генів, що задіяні в різноманітних внутрішньоклітинних процесах різних типів клітин, включаючи клітинний цикл, сигнальну трансдукцію, проліферацію і диференціацію, міжклітинні взаємодії та взаємодію клітин з міжклітинним матриксом, ангиогенез, еритропоез, але найбільший інтерес викликає його роль в диференціюванні клітин імунної системи.

Транскрипційний фактор ZXDC контролює експресію важливих факторів регуляції диференціювання мієлоїдних клітин, бере участь переважно у мієлоїдній гілці гемопоезу, ключових точках вибору гемопоетичними попередниками між різними гілками диференціювання, проте основну роль відіграє у моноцитарному диференціюванні разом з факторами EGR2 та GFI1. Фактор ZXDC є інтегральною частиною цієї регуляції і його

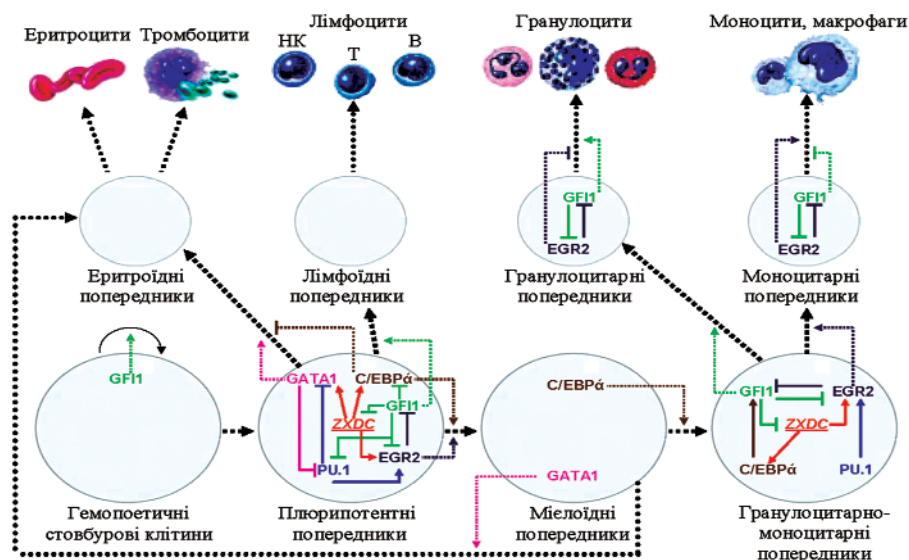


Рис. 2. Схема транскрипційної регуляції гемопоєзу транскрипційним фактором ZKDC та його функціональні взаємодії з основними гемопоетичними факторами транскрипції

го експресія у промієлоцитах також перебуває під контролем ключових факторів мієлоїдного диференціювання C/EBP α , C/EBP ϵ та PU.1, а особливо транскрипційного фактора GF11. Не менш важливою є участь фактора ZKDC у механізмах протипухлинного захисту, зокрема в контролі експресії гена EGR2, який має протипухлинний ефект, що

може бути основою для розроблення нових протипухлинних препаратів. Оскільки фактор ZKDC бере участь у регуляції досить великої кількості генів, для можливого практичного використання цих даних потрібні подальші детальні дослідження взаємозв'язків ZKDC у сигнальних системах різних за функцією клітин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gonze D., Goldbeter A. Circadian rhythms and molecular noise // *Chaos*. — 2006. — V. 16, N 2. — P. 026110 (1–11).
2. Hastings M. H., Maywood E. S., Reddy A. B. Two decades of circadian time // *J. Neuroendocrinol.* — 2008. — V. 20, N 6. — P. 812–819.
3. Kovac J., Husse J., Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock // *Mol. Cells*. — 2009. — V. 28, N 2. — P. 75–80.
4. Pfeffer M., Muller C. M., Mordel J. et al. The mammalian molecular clockwork controls rhythmic expression of its own input pathway components // *J. Neurosci.* — 2009. — V. 29, N 19. — P. 6114–6123.
5. Карбовський Л. Л., Мінченко Д. О., Гармаш Я. А., Мінченко О. Г. Молекулярні механізми функціонування циркадального годинника // *Укр. біохім. журн.* — 2011. — Т. 83, № 3. — С. 5–25.
6. Rudic R. D., McNamara P., Curtis A. M. et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis // *PLoS Biol.* — 2004. — V. 2, N 11. — P. E377.
7. Sasaki M., Yoshitane H., Du N. H. et al. Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription // *J. Biol. Chem.* — 2009. — V. 284, N 37. — P. 25149–25159.
8. Im J. S., Jung B. H., Kim S. E. et al. Per3, a circadian gene, is required for Chk2 activation in human cells // *FEBS Lett.* — 2010. — V. 84, N 23. — P. 4731–4734.
9. Lee H., Chen R., Lee Y. et al. Essential roles of CKI δ and CKI ϵ in the mammalian circadian clock // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2009. — V. 106. — P. 21359–21364.
10. Turek F. W., Joshu C., Kohsaka A. et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice // *Science*. — 2005. — V. 308, N 5724. — P. 1043–1045.
11. Cretenet G., Le Clech M., Gachon F. Circadian clock-coordinated 12 hr period rhythmic activation of the IRE1 α pathway controls lipid metabolism in mouse liver // *Cell Metab.* — 2010. — V. 11, N 1. — P. 47–57.
12. Climent J., Perez-Losada J., Quigley D. A. et al. Deletion of the PER3 gene on chromosome 1p36 in recurrent ER-positive breast cancer // *J. Clin. Oncol.* — 2010. — V. 28, N 23. — P. 3770–3778.
13. Mueller B. U., Pabst T., Osato M. et al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia // *Blood*. — 2002. — V. 100. — P. 998–1007.

14. *Mueller B. U., Pabst T., Fos J. et al.* ATRA resolves the differentiation block in the acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression // *Ibid.* — 2005. — V. 107. — P. 3330–3338.
15. *Pabst T., Mueller B. U., Zhang P. et al.* Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α), in acute myeloid leukemia // *Nat. Genet.* — 2001. — V. 27. — P. 263–270.
16. *Leroy H., Roumier C., Huyghe P. et al.* CEBPA point mutations in hematological malignancies // *Leukemia.* — 2005. — V. 19. — P. 329–334.
17. *Khandanpour C., Thiede C., Valk P. J.* A variant allele of Growth Factor Independence 1 (GFI1) is associated with acute myeloid leukemia // *Blood.* — 2010. — V. 115, N 12. — P. 2462–2472.
18. *Khanna-Gupta A., Sun H., Zibello T. et al.* Growth factor independence-1 (Gfi-1) plays a role in mediating specific granule deficiency (SGD) in a patient lacking a gene-inactivating mutation in the C/EBP ϵ gene // *Ibid.* — 2007. — V. 109. — P. 4181–4190.
19. *Tenen D. G.* Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way // *Nat. Rev. Cancer.* — 2003. — V. 3. — P. 89–101.
20. *Christensen J. L., Weissman I. L.* Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — V. 98. — P. 14541–14546.
21. *Galloway J. L., Wingert R. A., Thisse C. et al.* Loss of gata1 but not gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos // *Dev. Cell.* — 2005. — V. 8, N 1. — P. 109–116.
22. *Person R. E., Li F. Q., Duan Z. et al.* Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2 // *Nat. Genet.* — 2003. — V. 34. — P. 308–312.
23. *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.
24. *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.
25. *Aleksandrova A., Galkin O., Koneni R., Fontes J. D.* 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.
26. *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.
27. *Gillian A. L., Svaren J.* The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20 // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279. — P. 9056–9063.
28. *Unoki M., Nakamura Y.* Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway // *Oncogene.* — 2001. — V. 20. — P. 4457–4465.
29. *Parkinson D. B., Bhaskaran A., Droggiti A. et al.* Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death // *J. Cell. Biol.* — 2004. — V. 164. — P. 385–394.
30. *Krishnaraju K., Hoffman B., Liebermann D. A.* Early growth factor response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages // *Blood.* — 2001. — V. 97. — P. 298–305.
31. *Hock H., Orkin S. H.* Zinc-finger transcription factor Gfi-1: versatile regulator of lymphocytes, neutrophils and hematopoietic stem cells // *Curr. Opin. Hematol.* — 2006. — V. 13. — P. 1–6.
32. *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.
33. *Dahl R., Iyer S. R., Owens K. S. et al.* The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282. — P. 6473–6483.
34. *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.
35. *Laslo P., Spooner C. J., Warmflash A. et al.* Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates // *Cell.* — 2006. — V. 126. — P. 755–766.
36. *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, N 3. — P. 878–887.
37. *Friedman A.* Transcriptional control of granulocyte and monocyte development // *Oncogene.* — 2007. — V. 26. — P. 6816–6828.
38. *Галкін О. В., Мінченко О. Г.* Активація транскрипції гена EGR2 в генетично модифікованих клітинах з надекспресією транскрипційного фактора ZXDC // *Біотехнологія.* — 2010. — № 5. — С. 57–65.
39. *Kummalue T., Friedman A. D.* Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBP α binds and activates the promoter of the PU.1 gene // *J. Leuk. Biol.* — 2003. — V. 72. — P. 464–470.
40. *Pass M. B., Borregaard N., Cowland J. B.* Derangement of transcription factor profiles during in vitro differentiation of HL60 and NB4 cells // *Leukocyte Res.* — 2007. — V. 31, N 6. — P. 827–837.

41. Галкин О. В., Минченко О. Г. Транскрипційний фактор ZXDC приймає участь у регуляції процесів міелоїдної диференціації // Фізика живого. — 2010. — Т. 18, № 1. — С. 95–103.
42. Friedman A. D., Keefer J. R., Kummalue T. et al. Regulation of granulocyte and monocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein alpha // Blood Cells. Mol. Dis. — 2003. — V. 31, N 3. — P. 338–341.
43. Wu Q., Jin H., Yang Z., Luo G. et al. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2 // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2010. — V. 392, N 3. — P. 340–345.
44. Huang M., Hu Z., Chang W., Ou D. et al. The growth factor independence-1 (Gfi1) is overexpressed in chronic myelogenous leukemia // Acta Haematol. — 2010. — V. 123, N 1. — P. 1–5.
45. Rosenbauer F., Wagner K., Kutok J. L. et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1 // Nat. Genet. — 2004. — V. 36. — P. 624–630.
46. Unoki M., Nakamura Y. EGR2 induces apoptosis in various cancer cell lines by direct transactivation of BNIP3L and BAK // Oncogene. — 2003. — V. 22. — P. 2172–2185.

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА ZXDC В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПРОМИЕЛОЦИТОВ

А. Г. Минченко¹, А. В. Галкин², Д. А. Минченко^{1,3}

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

²Университет медицинского центра Канзаса, США

³Национальный медицинский университет
им. А. А. Богомольца, Киев

E-mail: ominchenko@yahoo.com

В обзоре осуществлен анализ данных о роли транскрипционного фактора ZDXC в регуляции экспрессии генов, в частности таких, которые принимают участие в регуляции процессов дифференцировки промиелоцитов. Из большого количества генов, экспрессия которых существенно изменяется при усилении экспрессии транскрипционного фактора ZDXC в эмбриональных клетках почки человека HEK293 и в клетках промиелоцитов человека HL60, более детально исследована только часть генов (ERG2, PU.1, C/EBP α , C/EBP ϵ , GFI и LRG1). На примере гена EGR2, кодирующего синтез важного транскрипционного фактора регуляции дифференцировки, подробно рассмотрены молекулярные механизмы его регуляции транскрипционным фактором ZDXC путем связывания с промотором гена EGR2. Проанализированы также механизмы регуляции транскрипции гена ZDXC зависимыми от него транскрипционными факторами: сверхэкспрессия ключевых факторов миелоидной дифференцировки C/EBP α , C/EBP ϵ и PU.1 в клетках HL60 приводит к снижению уровня экспрессии эндогенной мРНК транскрипционного фактора ZXDC, а при сверхэкспрессии фактора GFI1 отмечалось даже полное выключение экспрессии мРНК ZXDC. Приведенные в обзоре данные свидетельствуют о важной роли транскрипционного фактора ZDXC в регуляции процессов дифференцировки промиелоцитов.

Ключевые слова: транскрипционный фактор ZDXC, регуляция транскрипции, факторы дифференцировки, EGR2, клетки HEK293 и HL60.

THE ROLE OF TRANSCRIPTION FACTOR ZXDC IN THE REGULATION OF PROMYELOCYTES DIFFERENTIATION

O. H. Minchenko¹, O. V. Galkin², D. O. Minchenko^{1,3}

¹Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²University of Kansas Medical Center, USA

³Bohomoletz National Medical University, Kyiv

E-mail: ominchenko@yahoo.com

In the review the data concerning role of ZDXC transcription factor in the regulation of gene expression, especially genes participated in regulation of cell differentiation, was analyzed. Of the large number of genes whose expression changed significantly when expression of ZDXC transcription factor enhanced in human embryonic kidney cells HEK293 and in human promyelocytes HL60, only some genes (ERG2, PU.1, C/EBP α , C/EBP ϵ , GFI and LRG1) were studied in detail and analyzed. Using EGR2 gene, encoding synthesis of an important transcription factor regulating differentiation, the molecular mechanisms of its regulation under ZDXC transcription factor were considered in detail by binding the EGR2 gene to the promoter. The mechanisms regulating ZDXC gene transcription were analyzed with the following transcription factors dependent on it: overexpression of the key factors of myeloid differentiation (C/EBP α , C/EBP ϵ and PU.1) in HL60 cells led to decreasing of expression level of endogenous mRNA of ZXDC transcription factor. Moreover, overexpression of GFI1 factor even blocked completely ZXDC mRNA expression. Data of the review clearly demonstrated the important role of ZDXC transcription factor in regulation of promyelocytes differentiation processes.

Key words: ZDXC transcription factor, transcription regulation, differentiation factors, EGR2, HEK293 cells, HL60 cells.