

Роль вищерозташованого стимулюючого фактора 2a в регуляції експресії інгібітора активатора плазміногена-1

А. А. Самойленко, У. Рот, К. Юнгерманн, Т. Кітцманн, М. Ю. Оболенська¹

Інститут біохімії і молекулярної біології клітини
Гумбольдталее 23, D-37073 Геттінген, Німеччина

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Експресія інгібітора активатора плазміногена-1 (ІАП-1) стимулюється гіпоксією (8 % O₂). За цю стимуляцію відповідає ділянка в промоторі ІАП-1 (-175/-159), яка містить елемент, що сприймає гіпоксію (ЕСГ-2). З останнім взаємодіє фактор 1, що його стимулює гіпоксія (ФСГ-1). З ділянкою ЕСГ-2 межує ділянка ЕСГ-1, з якою зв'язується раніше не ідентифікований фактор. У даній роботі зроблено спробу ідентифікувати цей фактор і з'ясувати його роль у регуляції експресії ІАП-1. На підставі зсуву специфічної електрофоретичної смуги доведено, що з сайтами ЕСГ, переважно з ЕСГ-1, зв'язується вищерозташований стимулюючий фактор-2a (ВСФ-2a). В первинній культурі гепатоцитів щура надекспресія ВСФ-2a в однаковій мірі пригнічувала експресію ІАП-1-специфічної мРНК та білка ІАП-1 за умов як гіпоксії, так і нормоксії. Первинні гепатоцити щура трансфікували двома рекомбінантними ДНК — конструкцією з геном люциферази під контролем ділянки промотору ІАП-1 довжиною 766 або 276 п. о. і векторами, які експресують ВСФ дикого (ВСФ-2a) або мутантного (Δ ВСФ-2a) типу. Останній не виявляє ДНК-зв'язуючої та димеризуючої активностей. Котранскрипція з вектором, який експресує ВСФ-2a, пригнічувала активність люциферази у 8 разів порівняно з контролем, де білок ВСФ-2a був відсутнім. Котранскрипція з вектором, який експресує Δ ВСФ-2a, не впливала на люциферазну активність. Мутації обох ЕСГ (і в більшій мірі мутація ЕСГ-1) перешкождали пригніченню контрольованої промотором ІАП-1 люциферазної активності. Інгібіторної дії ВСФ-2a, опосередкованої ЕСГ-2, на відміну від ЕСГ-1, не спостерігалося при надекспресії ФСГ-1a. Ці результати свідчать про те, що баланс між двома транскрипційними факторами, ВСФ-2a та ФСГ-1a, що можуть зв'язуватися з суміжними ЕСГ, відіграє певну роль у регуляції експресії ІАП-1 за умов гіпо- та нормоксії.

Скорочення. Активатор плазміногена, АП; арилгідрокарбоний рецептор/арилгідрокарбоний ядерний транслокатор, АГР-АГЯТ; вищерозташований стимулюючий фактор, ВСФ; елемент відповіді на ксенобіотики, ЕВК; елемент, що сприймає гіпоксію, ЕСГ; інгібітор активатора плазміногена, ІАП; основна спіраль—петля—спіраль, оСПС; піруваткіназа типу L, ПК-L; трансактивуючий домен, ТАД; фактор, що його стимулює гіпоксія, ФСГ.

Вступ. Активатори плазміногена (АП), що належать до двох типів — тканинного, тАП (tissue-type, tPA) і урокіназного, уАП (urokinase-type, uPA), є сериновими протеазами, які перетворюють неактивний профермент плазміноген на активну енд-

пептидазу плазмін [1]. Активність тАП та уАП регулюється, зокрема, інгібіторами активаторів плазміногена, ІАП (plasminogen activator inhibitors, PAI) [2]. Ідентифіковано ІАП двох типів (ІАП-1 та ІАП-2), з яких головним фізіологічним інгібітором тАП та уАП є ІАП-1 [3]. ІАП-1 — це глікопротеїн з молекулярною масою 50 кДа з надродина серпінів [4]. Його виробляють тромбоцити, клітини

© А. А. САМОЙЛЕНКО, У. РОТ, К. ЮНГЕРМАНН, Т. КІТЦМАНН,
М. Ю. ОБОЛЕНСЬКА, 2002

судинного ендотелію [5], клітини гладеньких м'язів судин [6] і деякі інші клітини [7, 8], у тому числі гепатоцити [9]. ІАП-1 є також компонентом міжклітинного матриксу [10].

ІАП беруть участь у багатьох фізіологічних та патологічних процесах, таких як фібриноліз, перетворення міжклітинного матриксу, фіброз [11], заживлення ран та утворення ракових метастазів тощо [12, 13]. Певні патофізіологічні процеси, при яких зростає рівень ІАП-1 (наприклад, тромбоемболоутворення), пов'язані з гіпоксією. За підвищення експресії ІАП-1 у первинній культурі гепатоцитів щура при м'якій гіпоксії (8 % O_2) відповідає послідовність -175/-158 у промоторі гена ІАП-1, яка містить два елементи, що сприймають гіпоксію — ЕСГ-1 (hypoxia response element-1, HRE-1) з координатами -175/-168 і ЕСГ-2 (hypoxia response element-2, HRE-2) з координатами -165/-158 [14]. З послідовністю ЕСГ-2 зв'язується фактор, що його стимулює гіпоксія, ФСГ-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1), який зумовлює підвищення експресії ІАП-1 за умов гіпоксії. З ЕСГ-1 зв'язується інший, раніше не ідентифікований фактор. ЕСГ-1 і ЕСГ-2 містять послідовність САСГТГ («Е-бокс»), яку можуть впізнавати фактори транскрипції, що мають домен «основна спіраль—петля—спіраль», оСПС (basic helix-loop-helix, bHLH). ФСГ-1 є гетеродимером двох білків, ФСГ-1 α (HIF-1 α) та ФСГ-1 β (HIF-1 β) [15]. Кожний з цих білків містить домен оСПС-ПАР (ПАР — періодичний/арилгідрокарбоний рецептор/«той, що розмірковує на самоті», PAS-Per-Aryl-Sim, periodic/arylhydrocarbonreceptor/single minded).

Крім ФСГ-1, з «Е-боксом» можуть зв'язуватися також білки, які мають поряд з доменом оСПС лейцинову блискавку, оСПС-блискавка (bHLH-leucine zipper, bHLHzip-proteins). До цих білків належать вищерозташовані стимулюючі фактори, ВСФ (upstream stimulatory factors, USF) [15], і Мус/Мах димери [16, 17].

ВСФ вперше ідентифіковано в клітинах HeLa як білок, що зв'язується з послідовністю САСГТГ, розташованою безпосередньо «вище» від ТАТА-боксу головного пізнього промотору аденовірусу (adenovirus major late promoter), і таким чином активує транскрипцію [18]. Виявлено дві окремі форми ВСФ з різною молекулярною масою, ВСФ-1 та ВСФ-2 (USF-1 та USF-2). Вони експресуються в багатьох тканинах, однак їхній вміст неоднаковий у клітинах різних типів [19, 20]. Представники родини ВСФ значно різняться за своїми N-кінцевими амінокислотними послідовностями, в той час як їхні ДНК-зв'язуючі і димеризуючі домени високогомологічні [19].

Оскільки білки групи оСПС-блискавка можуть зв'язуватися з тими ж послідовностями, що й ФСГ, було висунуте припущення, що представники родини білків оСПС-блискавка зв'язуються з сайтами ЕСГ у промоторі ІАП-1. Таким чином, мета цього дослідження полягала у виявленні транскрипційного фактора, який зв'язується з сайтом ЕСГ-1, та вивченні його ролі в регуляції експресії ІАП-1 на моделі первинної культури гепатоцитів щура. Внаслідок інкубації послідовності промотору ІАП-1 з ядерним екстрактом гепатоцитів виявили зсув в положенні специфічної електрофоретичної смуги і дійшли висновку, що ВСФ зв'язується з сайтами ЕСГ, переважно з ЕСГ-1. Надекспресія ВСФ-2a в однаковій мірі пригнічувала експресію гена ІАП-1 за умов як гіпоксії, так і нормоксії. Мутації обох ЕСГ, і особливо мутація ЕСГ-1, перешкождали пригніченню експресії ІАП-1 у присутності ВСФ-2a. Більше того, ВСФ-2a не пригнічує опосередковану ЕСГ-2 експресію ІАП-1 за умов надекспресії ФСГ-1 α . Отже, ВСФ-2a є модулятором експресії ІАП-1 за умов різної концентрації кисню в гепатоцитах.

Матеріали і методи. Всі реагенти й ферменти мали якість «для аналізу» і були отримані з комерційних джерел. Гепатоцити виділяли з печінки самців щурів лінії Wistar (200—260 г), яких утримували за умов 12-год ритму освітленості з вільним доступом до їжі й води. Перед виділенням гепатоцитів щурам вводили нембутал (60 мг на 1 кг ваги).

Експерименти з культурами клітин. Гепатоцити виділяли стандартним методом за допомогою перфузії печінки *in situ* розчином колагенази. Виділені гепатоцити суспензували в середовищі М 199, що містило 0,5 нМ інсулін, 100 нМ дексаметазон і 4 %-ву зародкову телячу сироватку, і наносили в кількості $1 \cdot 10^6$ клітин на чашку діаметром 6 см. Перші 4 год клітини культивували в атмосфері 16 % O_2 , 79 % N_2 , і 5 % CO_2 (за об'ємом). Протягом наступних 20 год клітини витримували у середовищі, вільному від сироватки, за нормального артеріального вмісту кисню (16 % O_2). Через 24 год після початку культивування середовище було замінене, і клітини дали витримували за умов нормоксії (16 % O_2) чи м'якої гіпоксії (8 % O_2 , 87 % N_2 , 5 % CO_2).

Плазмиди. Плазмиди pG13-ІАП 766, pG13-ІАП 766M1 і pG13-ІАП 766M2, що містять немутовану і мутовані послідовності гена ІАП-1 [21, 22] від -766 до +31 п. о., описано раніше [14]. Плазмиди pG13-ІАП 276, pG13-ІАП 276M1 і pG13-ІАП 276M2 конструювали відповідно на основі плазмід pG13-ІАП 766, pG13-ІАП 766M1 і pG13-ІАП 766M2, вирізаючи

рестриктазою *KpnI* ділянку довжиною 490 п. о. з наступним лігуванням кінців. Вектори, які експресують ВСФ-2а та мутанти ΔВСФ-2а і ΔТАДВ-2а людини, люб'язно надані д-ром А. Каном і д-ром М. Раймондье. Усі вектори описано раніше [14, 23].

Виділення РНК та Нозерн-гібридизація. Виділення нефракціонованої клітинної РНК і Нозерн-аналіз проводили за методами, описаними раніше [14, 23]. Мічені антизмістовні РНК використовували як проби в реакціях гібридизації. Антисмістовні РНК мітили дигоксигеніном у реакції транскрипції *in vitro* за допомогою Т3 РНК-полімерази для плазмиди *pBS-IAP 1* і Т7 РНК-полімерази для плазмиди *pBS-β-актин* у присутності 3,5 мМ 11-дигоксигенін-УТР, 6,5 мМ УТР, 10 мМ GTP, 10 мМ CTP і 10 мМ АТР. Гібридизацію нефракціонованої клітинної РНК з пробами проводили, як описано [24]. Інтенсивність гібридизаційних сигналів на блятах визначали за допомогою відеоденситометра («Biotech Fischer», ФРН).

Вестерн-гібридизація. Вестерн-гібридизацію проводили, як описано [24]. Вміст білка в культуральному середовищі визначали за методом Бредфорда. Первинні антитіла кроля до ІАП-1 щура («American Diagnostics», США) використовували в розведенні 1:200. Вторинні антитіла IgG козла до імуноглобулінів кроля («Santa Cruz Biotechnology», США) використовували в розведенні 1:2000. Для виявлення гібридів використано систему підсиленої хемілюмінесценції (ECL Western blotting system, «Amersham», Велика Британія). На плівці спостерігали дві смуги, що відповідали білку ІАП-1 розміром 49 кДа (основна смуга) і 46 кДа (додаткова смуга) [25].

Трансфекція гепатоцитів і вимірювання люциферазної активності. Свіжоізолювані гепатоцити щура (близько $1 \cdot 10^6$ клітин на чашку діаметром 6 см) трансфікували, як у роботах [26, 27]. Трансфекції проводили 2 мкг плазмідної ДНК з геном люциферази світлячка під контролем промотору ІАП-1 і 500 нг вектора, який експресує одну із форм ВСФ — ВСФ-2а, ΔВСФ-2а або ΔТАДВ-2а. В контрольних експериментах вводили 500 нг експресуючого вектора *pCMV*, що не містить вставки. В експериментах з конкурентного зв'язування клітини трансфікували 2 мкг відповідної ІАП-люциферазної конструкції разом з 500 нг вектора, що експресує ВСФ-2а, і 500 нг вектора, який експресує ФСГ-1α.

У контрольних експериментах з конкурентного зв'язування замість векторів із вставками ВСФ-2а або ФСГ-1α використовували 500 нг плазмиди *pCMV*. Через 5 год після трансфекції середовище

змінювали, клітини культивували протягом наступних 19 год за умов нормоксії. Далі середовище знову змінювали, і клітини витримували протягом 24 год за умов нормоксії чи гіпоксії.

Приготування екстрактів клітинних ядер та метод виявлення зсуву специфічної електрофоретичної смуги. Екстракти ядер гепатоцитів із первинної культури клітин отримували за стандартним протоколом [28, 29] з модифікацією по [14]. Буфери для екстракції білків містили 0,5 мМ дитіотрейтол («Sigma», США), 0,4 мМ феноліметилсульфонілфлюорид («Serva», ФРН), 1 мМ ванадат натрію («Sigma»), 2 мкг/мл лейпептину («Roche», ФРН), 2 мкг/мл пепстатину («Roche») і 2 мкг/мл апротиніну («Bayer», ФРН). Послідовності нуклеотидів у ділянках промотору ІАП-1, які було використано для виявлення зсуву в положенні специфічної електрофоретичної смуги, подано на рис. 1, а.

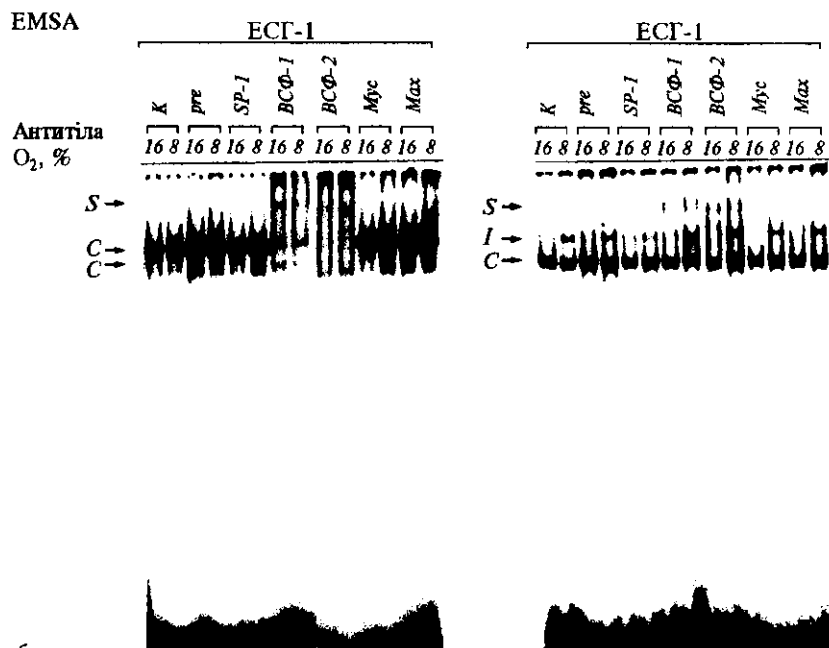
Для реакції відпалу було взято 0,8 нмоль кожного з комплементарних олігонуклеотидів. Олігонуклеотиди мітили за 5'-кінцем [γ - ^{32}P]АТР («Amersham») за допомогою Т4 полінуклеотидкінази (МВІ), очищали з використанням Nucleotide Removal Kit («Quiagen», США). Реакції зв'язування олігонуклеотидів з білками ядерного екстракту проводили в загальному об'ємі 20 мкл, якій містив 50 мМ КСl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 5 %-й гліцерол, 10 мкг білка ядерного екстракту, 250 нг полі(dI-dC) і 5 мМ дитіотрейтол. Після інкубації реакційної суміші протягом 5 хв при $t = 20^\circ\text{C}$ додавали 1 мкл радіоактивно міченої проби олігонуклеотидів (10^4 імп/хв) і інкубацію продовжували ще 10 хв.

Для виявлення можливого «суперзсуву» до складу реакційної суміші додавали 1 мкл антитіл до одного з наведених транскрипційних факторів — ВСФ-1 (С20), ВСФ-2 (N18), Мус (С33), Мах (С17) і SP-1 (PEP2-G) («Santa Cruz Biotechnology») або преімунову сироватку кроля [14]. Інкубацію продовжували протягом 2 год при 4 °С. Електрофорез проводили у 5 %-му неденатуруючому поліакриламідному гелі в буфері TBE (89 мМ трис, 89 мМ борна кислота, 5 мМ EDTA) при напрузі 200 В. Після електрофорезу гелі висушували і експонували з екраном фосфоіміджеру.

Результати. Зв'язування ВСФ-2а з послідовностями ЕСГ у промоторі ІАП-1 щура. Футпринтний аналіз ділянки, що містить перші 764 п. о. промотору ІАП-1, після її взаємодії з ядерним екстрактом гепатоцитів виявив вісім захищених від ДНКазі I сайтів, які позначили А1, А2, В, С, D, Е, F і G [30]. Сайт С містить дві послідовності — Е1 (-175/-170) та Е2 (-165/-160), які схожі на

Е-бокс Консенсус CACGTG CACGTG
 ЕСГ-2 -168/-152 ACACACGTGTCAGCA
 ЕСГ-1 -182/-166 TCTCACACGTCACACA

a



b

«Е-бокс». Обидва «Е-боксы» діють як елементи, що сприймають гіпоксію, і тому їх було названо ЕСГ-1 і ЕСГ-2. Для ЕСГ-2 зв'язування з фактором ФСГ-1 встановлено. Щодо ЕСГ-1, то фактор, який зв'язується з ним, ідентифікований не був [14]. Оскільки всі транскрипційні фактори з родини оСПС і, зокрема, ВСФ [16], впізнають послідовність CACGTG, яка відповідає канонічній послідовності «Е-боксу» CANNTG, то ми висунули припущення про те, що ВСФ може зв'язуватися з одним або двома сайтами ЕСГ. Сайт ЕСГ-1 (5'-CACGTA-3') відповідає консенсусу для зв'язування ВСФ за п'ятьма із шести пар основ. Другий потенційний ВСФ-1-зв'язуючий сайт, ЕСГ-2, містить канонічну для ВСФ послідовність 5'-CACGTG-3' (рис. 1).

Зв'язування ядерних білків з олігонуклеотидами, які містять послідовності промотору ІАП-1 щура ЕСГ-1 й ЕСГ-2, виявляли за положенням специфічної електрофоретичної смуги. Зсув у положенні електрофоретичної смуги олігонуклеотиду -182/-166, що містить ЕСГ-1, був чітко виражений незалежно від того, при якій концентрації O₂ культивували клітини, з яких походив ядерний екстракт (рис. 1, б, ліворуч). На відміну від цього,

олігонуклеотид -168/-152, що містить ЕСГ-2, крім конститутивного комплексу, зв'язував також комплекс, індукований за умов гіпоксії (рис. 1, б, праворуч).

Як показано раніше, цей індукований гіпоксією ДНК-білковий комплекс містить ФСГ-1 [14]. Коли в сайти ЕСГ-1 та ЕСГ-2 ввели мутацію, що утворення специфічних комплексів — як конститутивного, так і індукованого гіпоксією, більше не спостерігалось [14].

Щоб дослідити, чи присутній ВСФ в утворених комплексах, до реакції зв'язування ядерного екстракту з олігонуклеотидом додавали антитіла до ВСФ-1 і ВСФ-2. Антитіла до ВСФ-1 є специфічними до С-кінцевого поліпептиду (18 амінокислотних залишків) ВСФ-1 людини, а антитіла до ВСФ-2 — до N-кінцевого поліпептиду (18 амінокислотних залишків) ВСФ-2 миші. Наявність у реакційній суміші антитіл до ВСФ-1 й ВСФ-2 призводила до зменшення інтенсивності смуги, що відповідала за комплекс білка з ЕСГ-1 у реакції без антитіл, і до появи «надзсуву». Присутність антитіл до ВСФ-1 у реакції з ЕСГ-2 спричинювала формування слабковираженого «надзсуву», який був дещо

Рис. 1. Зв'язування ВСФ-2а з послідовностями ЕСГ у промоторі ІАП-1 щура: а — олігонуклеотиди (зображено консенсусну послідовність «Е-бокса» і послідовності нуклеотидів у промоторі ІАП-1 щура з сайтами ЕСГ-1 і ЕСГ-2; основи, які відповідають консенсусу, підкреслено); б — зсув специфічної електрофоретичної смуги. Радиоактивно мічені ³²P олігонуклеотиди, що містять сайти ЕСГ-1 (-182/-166) (ліворуч) і ЕСГ-2 (-168/-152) (праворуч), інкубували з ядерними екстрактами гепатоцитів, які культивували за умов нормоксії (16 % O₂) або гіпоксії (8 % O₂) (див. «Матеріали і методи»). Для виявлення специфічності зв'язування білків ядерного екстракту з сайтами ЕСГ перед додаванням міченої проби ядерні екстракти інкубували протягом 2 год при 4 °C з 1 мкл розчину одного з видів антитіл — до ВСФ-1, ВСФ-2, Myc, Max, SP-1 або з преімунною сироваткою. Зв'язування ДНК з білками аналізували електрофорезом у 5 %-му поліакриламідному гелі. С — конститутивний комплекс; І — індукований комплекс ФСГ—олігонуклеотид; S — надзсув внаслідок утворення комплексу олігонуклеотид—ВСФ—антитіла проти ВСФ

вираженішим при наявності антитіл до ВСФ-2. Більше того, додавання антитіл до ВСФ-1 і до ВСФ-2 викликало значне посилення зв'язування ЕСГ-2 з ФСГ-1 (рис. 1, б, праворуч: смуга 1, яка відповідає комплексу ЕСГ-2 з білком із гепатоцитів, культивованих в умовах м'якої гіпоксії, 8 % O₂).

Щоб підтвердити специфічність «надзсувів», які спостерігали за наявності антитіл до ВСФ, реакції між олігонуклеотидом і ядерним екстрактом проводили також у присутності преїмунної сироватки кроля і антитіл до транскрипційного фактора SP-1, який зв'язується з GC-боксом. Ані преїмунна сироватка, ані антитіла до SP-1 не впливали на утворення білкових комплексів з ЕСГ-1 і ЕСГ-2. Щоб перевірити наявність в утворених комплексах інших транскрипційних факторів з родини оСПС, до реакційних сумішей додавали антитіла до транскрипційних факторів Мус і Мах. Присутність цих антитіл не змінювала положення електрофоретичних смуг у реакціях з ЕСГ-1 і ЕСГ-2 та не призводила до формування «надзсуву» (рис. 1, б). Таким чином, вищенаведені результати дозволяють зробити висновок, що саме ВСФ є фактором, який зв'язується в промоторі ІАП-1 щура з послідовностями ЕСГ, але переважно з послідовністю ЕСГ-1.

Пригнічення експресії ІАП-1 при надекспресії ВСФ-2а за умов як нормоксії, так і м'якої гіпоксії. Для дослідження ролі ВСФ-2а в регуляції експресії ІАП-1 гепатоцити первинної культури трансфікували векторами, що експресують ВСФ-2а дикого типу або мутантний білок ΔВСФ-2а, у якого відсутня друга спіраль домену оСПС і який не здатний зв'язуватися з ДНК і утворювати димери [23]. У відповідності з попередніми дослідженнями [14], гепатоцити, трансфіковані контрольним вектором *pCMV*, які витримували в умовах м'якої гіпоксії, мали вдвічі вищий рівень експресії ІАП-1-специфічної мРНК.

У клітинах, які трансфікували вектором із вставкою для ВСФ-2а і інкубували за нормоксії, експресія ІАП-1-специфічної мРНК була знижена на 70 % в порівнянні з контролем (рис. 2). Трансфекція вектором для ВСФ-2а пригнічувала викликану гіпоксією індукцію ІАП-1-специфічної мРНК на 60 %. Проте рівні мРНК були все ще приблизно вдвічі вищими, ніж у гепатоцитах, які трансфікували ВСФ-2а і витримували при нормоксії. Пригнічення експресії ІАП-1-специфічної мРНК в умовах гіпоксії не спостерігали в разі трансфекції гепатоцитів вектором, який експресував ΔВСФ-2а (рис. 2).

Зменшення рівня ІАП-1-специфічної мРНК

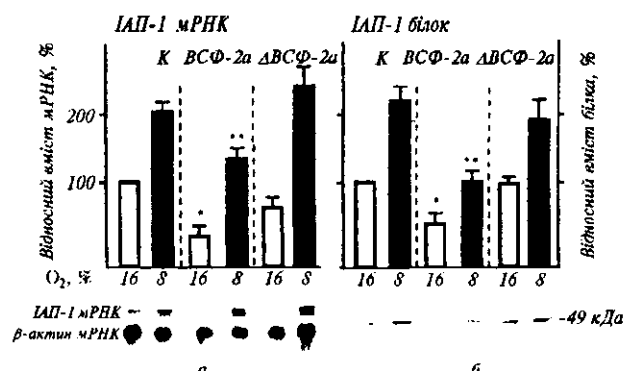


Рис. 2. Пригнічення експресії ІАП-1-специфічної мРНК і білка ІАП-1 при надекспресії ВСФ-2а за умов нормоксії і гіпоксії (гепатоцити, трансфіковані 8 мкг векторів, які експресують одну з форм ВСФ — ВСФ-2а або ΔВСФ-2а чи контрольним вектором *pCMV*, витримували 24 год за артеріального тиску O₂, змінювали культуральне середовище і інкубували наступні 24 год за умов нормоксії (16 % O₂) або гіпоксії (8 % O₂): а — відносний вміст ІАП-1-специфічної мРНК, визначений Нозерн-гібридизацією (15 мкг нефракціонованої клітинної РНК первинних гепатоцитів гібридизували з ІАП-1- і β-актинспецифічною антизмстовною РНК, міченими дигоксигеніном (див. «Матеріали і методи»); відносний вміст мРНК за нормоксії (16 % O₂) прийнято за 100 %; б — відносний вміст білка ІАП-1, визначений Вестерн-гібридизацією (50 мкг білка культурального середовища було взято для зв'язування з антитілами до ІАП-1 щура (див. «Матеріали і методи»); відносний вміст білка за нормоксії (16 % O₂) прийнято за 100 %. Результати наведено як середні значення ± похибка середнього значення принаймні трьох незалежних експериментів. Різницю між середніми значеннями оцінювали за *t*-критерієм Ст'юдента. * і ** відповідно різниці значень люциферазної активності при 16 % O₂ + ВСФ-2а проти значення при 16 % O₂ + *pCMV* (контроль) та при 8 % O₂ + ВСФ-2а проти значення при 8 % O₂ + *pCMV* (контроль) вірогідні з $p \leq 0,05$; ΔВСФ-2а — мутантна форма ВСФ-2а, яка не має другої петлі домену оСПС

при надекспресії ВСФ-2а супроводжувалося зменшенням рівня білка ІАП-1. Встановлено, що гепатоцити, які трансфікували ВСФ-2а і витримували в умовах як нормоксії, так і гіпоксії, секретували приблизно вдвічі менше білка ІАП-1, ніж контрольні гепатоцити, за таких саме умов, але без надекспресії ВСФ-2а (рис. 2). Проте, як і з мРНК, кількість білка ІАП-1, секретованого клітинами, трансфікованими ВСФ-2а і культивованими за умов гіпоксії, була вдвічі більшою, ніж кількість ІАП-1, секретованого клітинами при нормоксії. Рівень білка ІАП-1 у культуральному середовищі гепатоцитів, трансфікованих ΔВСФ-2а, не відрізнявся від контрольного.

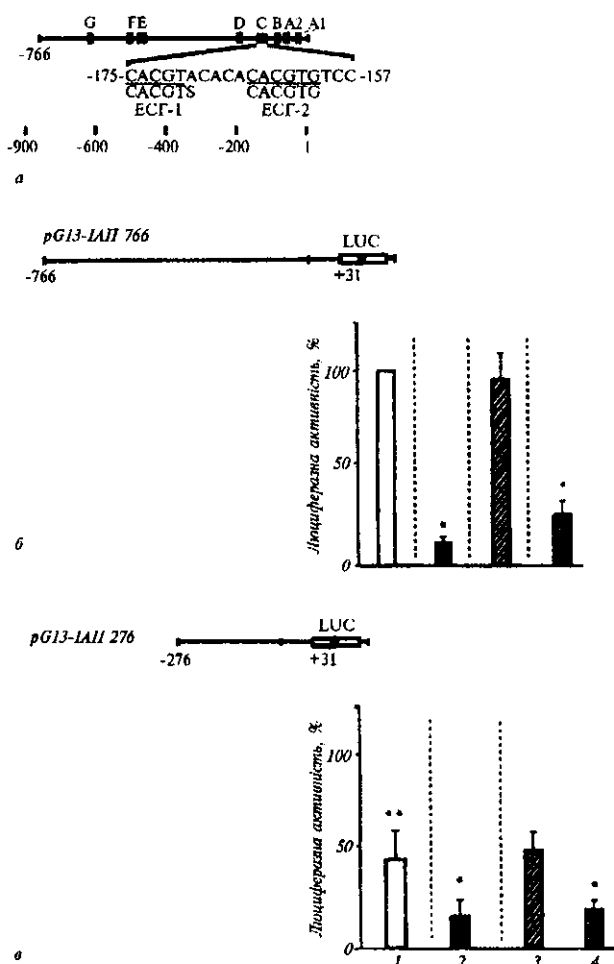


Рис. 3. Пригнічення ВСФ-2а люциферазної активності, контрольованої промотором ІАП-1, у первинних гепатоцитах щура: а — ділянка промотору гена ІАП-1 щура з позначеними за даними футпринтного аналізу сайтами А—Г, які захищені від дії ДНКазі І (у сайті С підкреслено послідовності, що відповідають консенсусу «Е-бокс»; літерою S у сайті ЕГС-1 позначено нуклеотид, який не відповідає консенсусу); б, в — гепатоцити котрансфікували одним із векторів, які експресують ВСФ-2а (2), ΔВСФ-2а (3) чи ΔТАДВ-2а (4), і конструкцією з геном люциферази під контролем ділянки промотору гена ІАП-1 щура довжиною 766 п. о., *pGL3-IAP 766* (б) або 276 п. о., *pGL3-IAP 276* (в). У контрольних експериментах (1) люциферазні конструкції котрансфікували з плазмідом *pCMV*. У кожному експерименті активність люциферази визначали в процентах від значення активності в гепатоцитах, трансфікованих *pGL3-IAP 766* і *pCMV*. Всі результати наведено як середні значення ± похибка середнього значення принаймні трьох незалежних експериментів. Різниця значень люциферазної активності при варіантах котрансфекції конструкціями вірогідні з $p \leq 0,05$; **pGL3-IAP 766* + ВСФ-2а проти *pGL3-IAP 766* + *pCMV* (контроль); *pGL3-IAP 766* + ΔТАДВ-2а проти *pGL3-IAP 766* + *pCMV* (контроль); *pGL3-IAP 276* + ВСФ-2а проти *pGL3-IAP 766* + *pCMV* (контроль) і *pGL3-IAP 276* + ΔТАДВ-2а проти *pGL3-IAP 766* + *pCMV* (контроль); **при котрансфекції *pGL3-IAP 276* + *pCMV* проти *pGL3-IAP 766* + *pCMV*

Пригнічення експресії люциферази, контрольованої промотором ІАП-1, при надекспресії ВСФ-2а. Щоб з'ясувати, чи регулює ВСФ-2а експресію ІАП-1 через зв'язування з ЕСГ, а також щоб визначити, які домени білка ВСФ-2а можуть брати участь у цій регуляції, провели експерименти з трансфекції гепатоцитів первинної культури конструкцією ІАП-1 дикого типу, *pGL3-IAP 766*, і векторами, які експресували один з трьох варіантів транскрипційних факторів — ВСФ-2а, ΔВСФ-2а і ΔТАДВ-2а [14].

У гепатоцитах, трансфікованих одночасно плазмідом *pGL3-IAP 766* і вектором, який експресує ВСФ-2а, люциферазна активність була пригнічена приблизно у 8 разів порівняно з активністю, яку спостерігали в клітинах, трансфікованих тільки плазмідом *pGL3-IAP 766* (рис. 3). Люциферазна активність у гепатоцитах, трансфікованих *pGL3-IAP 766* і вектором, який експресує мутантний білок ΔВСФ-2а, не відрізнялася суттєво від контрольних значень. У гепатоцитах, трансфікованих *pGL3-IAP 766* і вектором, що експресує мутантний білок ΔТАДВ-2а, який позбавлений перших 198 амінокислотних залишків трансактивуючого домену, але містить інтактний ДНК-зв'язуючий домен [23], люциферазна активність пригнічена приблизно у 5 разів (рис. 3). Ці результати вказують на те, що лише домен оСПС-блискавка, а не N-кінцевий домен ТАД є необхідним для ВСФ-2а-залежного пригнічення експресії ІАП-1 у первинних гепатоцитах щура.

Котрансфекція плазмиди *pGL3-IAP 276*, яка містить перед геном люциферази перші 276 п. о. промотору ІАП-1, разом з вектором, який експресує ВСФ-2а, пригнічувала люциферазну активність подібно до того, що спостерігалось при трансфекції *pGL3-IAP 766* (рис. 3). Цього пригнічення не відбувалось, коли плазмідом *pGL3-IAP 276* трансфікували разом з вектором для експресії ΔВСФ-2а. Наведені результати вказують на те, що делеція приблизно 490 п. о. промотору ІАП-1 не усувала інгібіторного ефекту ВСФ-2а на експресію ІАП-1. Це не протирічить припущенню, що пригнічуючий ефект, можливо, опосередкований ЕСГ-1 і ЕСГ-2, координати яких -175/-168 та -165/-158 відповідно.

Усунення пригнічення люциферазної активності, опосередкованого ВСФ-2а, внаслідок мутацій послідовностей ЕСГ промотору ІАП-1 у конструкціях з геном люциферази. Для дослідження ролі послідовностей ЕСГ-1 і ЕСГ-2 в пригніченні експресії ІАП-1, опосередкованого ВСФ-2а, окрім конструкції, яка містила промотор ІАП-276 дикого типу і ген люциферази, зробили ще дві, які вміщували мутантні послідовності ЕСГ-1 або ЕСГ-

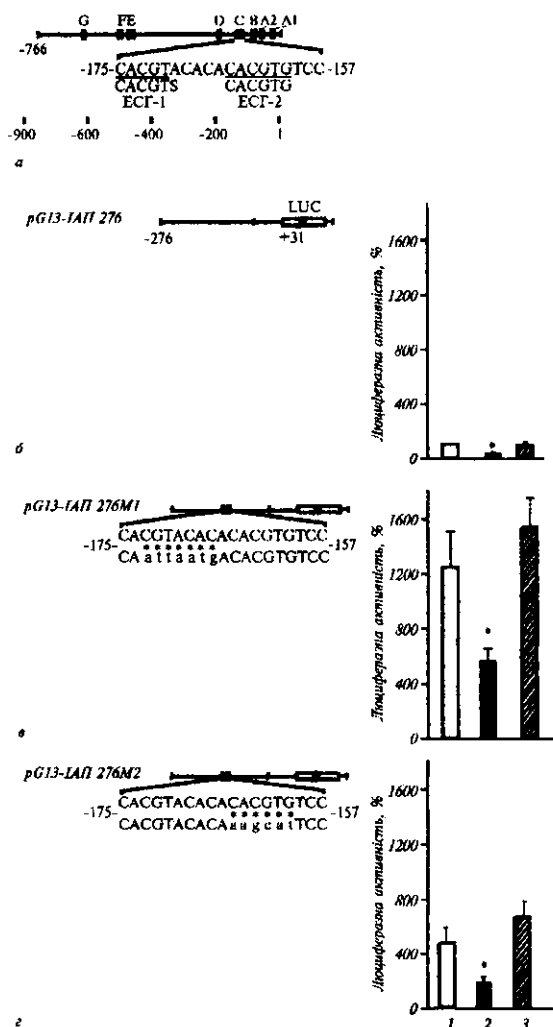


Рис. 4. Усунення пригнічуючого ефекту ВСФ-2а на люциферазну активність за рахунок мутації послідовностей ЕСГ в люциферазних конструкціях з промотором ІАП-1: а — див. рис. 3; гепатоцити котрансфікували одним із векторів, які експресують ВСФ-2а (2) або ΔВСФ-2а (3), і однією з конструкцій з геном люциферази під контролем немутованої (*pGI3-IAP 276*) (б), або мутованої в сайті ЕСГ-1 (*pGI3-IAP 276M1*) (в), або в сайті ЕСГ-2 (*pGI3-IAP 276M2*) (г) ділянки промотору гена ІАП-1 шуга довжиною 276 п. о. В контрольних експериментах (1) люциферазні конструкції котрансфікували разом з плазмідною *pCMV*. У кожному експерименті активність люциферази визначали в процентах від значення активності в гепатоцитах, котрансфікованих *pGI3-IAP 276* і *pCMV*. У конструкціях *pGI3-IAP 276M1* і *pGI3-IAP 276M2* мутовані нуклеотиди позначено зірочкою. Для порівняння над послідовністю з мутованими нуклеотидами наведено немутовану послідовність промотору гена ІАП-1. Всі результати наведено як середні значення \pm похибка середнього значення принаймні трьох незалежних експериментів. Різниця значень люциферазної активності при варіантах котрансфекції конструкціями вірогідні з $p \leq 0,05$; **pGI3-IAP 276* + ВСФ-2а проти *pGI3-IAP 276* + *pCMV* (контроль); *pGI3-IAP 276M1* + ВСФ-2а проти *pGI3-IAP 276M1* + *pCMV* (контроль); *pGI3-IAP 276M2* + ВСФ-2а проти *pGI3-IAP 276M2* + *pCMV* (контроль)

2. Здійснили трансфекцію гепатоцитів первинної культури однією з цих трьох конструкцій разом з одним із векторів, що експресували ВСФ-2а або ΔВСФ-2а, або контрольною плазмідною *pCMV* (рис. 4). Мутація в сайті ЕСГ-1 (плазмідна *pGI3-IAP 276M1*) призводила до сильної (приблизно 12-разової) індукції люциферазної активності порівняно з люциферазною активністю при трансфекції плазмідною *pGI3-IAP 276* з немутованим сайтом ЕСГ-1. ВСФ-2а в експериментах з котрансфекції діяв як інгібітор і пригнічував люциферазну активність приблизно у 7 разів порівняно з активністю, яку визначали за відсутності ВСФ-2а, але в той же час люциферазна активність залишалась у 5 разів вищою, ніж при котрансфекції плазмідною *pGI3-IAP 276* з ЕСГ-1 дикого типу і вектором, що експресує ВСФ-2а. Максимальна (15-разова) індукція люциферазної активності мала місце в гепатоцитах, трансфікованих *pGI3-IAP 276M1* і ΔВСФ-2а (рис. 4).

Мутація в ділянці -165/-160 промотору ІАП-1, яка відповідає сайту ЕСГ-2 (плазмідна *pGI3-IAP 276M2*), спричинювали підвищення люциферазної активності, але це зростання було меншим за те, яке зумовлювала мутація в сайті ЕСГ-1 (трансфекція плазмідною *pGI3-IAP 276M1*) (рис. 4). Люциферазна активність у гепатоцитах, трансфікованих *pGI3-IAP 276M2*, була приблизно в 4,5 разу вищою, ніж у гепатоцитах, трансфікованих *pGI3-IAP 276*. Котрансфекція ВСФ-2а призводила до пригнічення люциферазної активності у 2,5 разу, але ця активність все ще була приблизно у 1,8 разу більшою порівняно з такою при трансфекції плазмідною дикого типу *pGI3-IAP 276*. Трансфекція *pGI3-IAP 276M2* разом з ΔВСФ-2а викликала приблизно 6-разову індукцію люциферазної активності. Ці дані узгоджуються з припущенням, що обидва сайти ЕСГ у промоторі ІАП-1 відіграють певну роль у ВСФ-2а-залежному пригніченні експресії гена ІАП-1, а також що основним сайтом зв'язування ВСФ-2а є сайт ЕСГ-1.

Конкуренція ФСГ-1а з ВСФ-2а за зв'язування з сайтом ЕСГ-2 у промоторі ІАП-1. Результати дослідження положення специфічної електрофоретичної смуги і люциферазної активності після котрансфекції дають можливість зробити припущення, що в первинних гепатоцитах шуга має місце конкуренція між двома факторами транскрипції, ВСФ-2а і ФСГ-1, за зв'язування з сайтом ЕСГ-2 в промоторі ІАП-1. Щоб встановити, чи перешкоджає ФСГ-1 залежному від ВСФ-2а пригніченню експресії ІАП-1, первинні гепатоцити шуга трансфікували векторами, які експресують ВСФ-2а і ФСГ-1а, разом з однією з конструкцій, які містять

ген люциферази, — *pGl3-ІАП 766*, *pGl3-ІАП 766M1* та *pGl3-ІАП 766M2*.

Котрансфекція *pGl3-ІАП 766* і вектора, який експресує ВСФ-2a, пригнічувала активність люциферази у 8 разів, у той час як котрансфекція *pGl3-ІАП 766* і вектора, який експресує ФСГ-1a стимулювала люциферазну активність у 4 рази. Коли гепатоцити котрансфікували векторами, що експресують і ВСФ-2a, і ФСГ-1a, а також конструкцією *pGl3-ІАП 766*, ми не спостерігали ані індукції, ані пригнічення активності люциферази порівняно з контролем (рис. 5). Котрансфекція плазмиди *pGl3-ІАП 766M1*, у якій мutowано сайт ЕСГ-1, і вектора, який експресує ВСФ-2a, пригнічувала люциферазну активність приблизно в 4 рази порівняно з трансфекцією тільки плазмідною *pGl3-ІАП 766M1*. Коли разом з плазмідною *pGl3-ІАП 766M1* гепатоцити трансфікували вектором, який експресує ФСГ-1a, люциферазна активність була приблизно вдвічі вищою, ніж при трансфекції тільки плазмідною *pGl3-ІАП 766M1*, як і в попередньому дослідженні [14]. Після котрансфекції гепатоцитів обома векторами, які експресують ВСФ-2a і ФСГ-1a, пригнічуючий ефект ВСФ-2a знову був усунутий завдяки надекспресії ФСГ-1a; люциферазна активність була приблизно вдвічі вищою, ніж при котрансфекції з вектором, який експресував ВСФ-2a (рис. 5).

У гепатоцитах, трансфікованих люциферазною конструкцією *pGl3-ІАП 766M2* і вектором, який експресує ВСФ-2a, активність люциферази була пригніченою приблизно у 4 рази. Як показано раніше [14], котрансфекція гепатоцитів плазмідною *pGl3-ІАП 766M2* та вектором, який експресує ФСГ-1a, не змінювала активності люциферази; вона також не перешкождала пригніченню активності люциферази, опосередкованому ВСФ-2a (рис. 5). Ці результати підтримують висновок, що з сайтом ЕСГ-2 зв'язуються як ВСФ, так і ФСГ-1, і що сайт може бути причетним до тонкої регуляції експресії гена ІАП-1.

Обговорення. В даному дослідженні продемонстровано, що фактор транскрипції ВСФ-2a зв'язується з неканонічною послідовністю типу «Е-бокс» у сайті ЕСГ-1 у промоторі гена ІАП-1 щура і може виступати в ролі інгібітора експресії цього гена. ВСФ-2a виявляє пригнічуючий ефект навіть і за відсутності трансактивуючого домену, але при наявності інтактного ДНК-зв'язуючого домену. В промоторі ІАП-1 сайт ЕСГ-1 відокремлений лише 4 п. о. від іншої послідовності типу «Е-бокс» сайту ЕСГ-2, з яким зв'язується ФСГ-1 і індуктує експресію ІАП-1 за умов м'якої гіпоксії. Надекспресія ВСФ-2a загалом пригнічує експресію ІАП-1, але

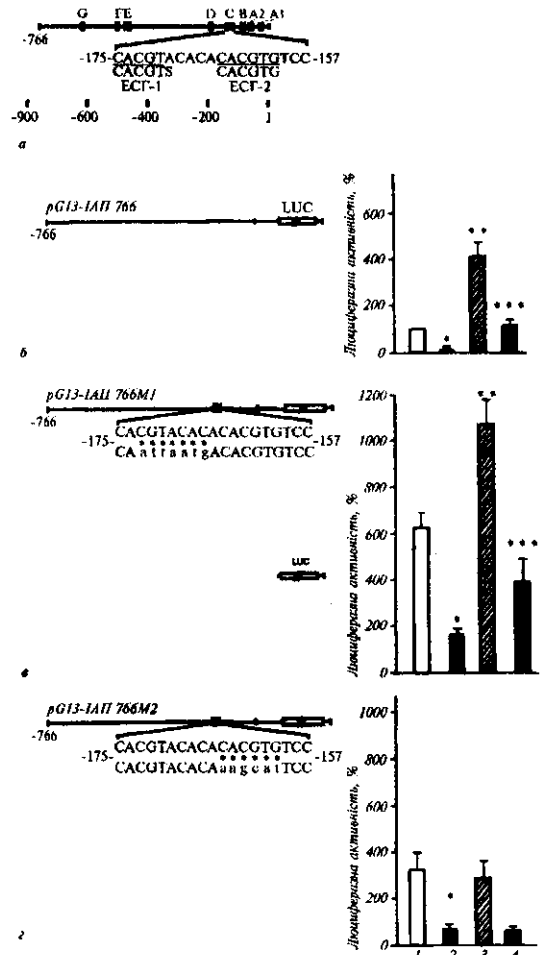


Рис. 5. Конкуренція ФСГ-1α з ВСФ-2a за зв'язування з сайтом ЕСГ-2 у промоторі ІАП-1 щура: а — див. рис. 3. Гепатоцити трансфікували векторами, які експресують ВСФ-2a (2) і ФСГ-1α (3) (або обома разом (4)) і конструкціями з геном люциферази під контролем немutowаної (*pGl3-ІАП 766*) (б) або мutowаної в сайті ЕСГ-1 (*pGl3-ІАП 766M1*) (г), або ЕСГ-2 (*pGl3-ІАП 766M2*) (з) ділянки промотору ІАП-1 щура довжиною 766 п. о. В контрольних експериментах (1) люциферазні конструкції трансфікували разом з плазмідною *pCMV*. У кожному експерименті активність люциферази визначали в процентах від значення активності в гепатоцитах, які було трансфіковано *pGl3-ІАП 766* і *pCMV*. У конструкціях *pGl3-ІАП 766M1* і *pGl3-ІАП 766M2* мutowані нуклеотиди позначено зірочкою. Для порівняння над послідовністю з мutowаними нуклеотидами наведено немutowану послідовність промотору гена ІАП-1 щура. Всі результати наведено як середні значення \pm похибка середнього значення принаймні трьох незалежних експериментів. Різниця значень люциферазної активності при варіантах котрансфекції конструкціями вірогідні з $p \leq 0,05$: **pGl3-ІАП 766* + ВСФ-2a проти *pGl3PAI-766* + *pCMV* (контроль), *pGl3-ІАП 766M1* + ВСФ-2a проти *pGl3PAI-766M1* + *pCMV* (контроль); *pGl3-ІАП 766M2* + ВСФ-2a проти *pGl3-ІАП 766M2* + *pCMV* (контроль); ***pGl3-ІАП 766* + ФСГ-1α проти *pGl3-ІАП 766* + *pCMV* (контроль), *pGl3-ІАП 766M1* + ФСГ-1α проти *pGl3-ІАП 766M1* + *pCMV* (контроль); ****pGl3-ІАП 766* + ВСФ-2a + ФСГ-1α проти *pGl3-ІАП 766* + ВСФ-2a; *pGl3-ІАП 766M1* + ВСФ-2a + ФСГ-1α проти *pGl3-ІАП 766M1* + ВСФ-2a

сама по собі не перешкоджає індукції ІАП-1 за умов гіпоксії.

ВСФ як інгібітор і активатор транскрипції. З першого погляду пригнічуючий ефект ВСФ на експресію ІАП-1 у первинних гепатоцитах щура є несподіваним, оскільки ВСФ, що вперше був ідентифікований як активатор головного пізнього промотору аденовірусу в клітинах HeLa, переважно індукуює транскрипцію [16]. Проте відомі випадки, коли ВСФ діє як інгібітор транскрипції, переважно конкуруючи з якимось транскрипційним фактором за зв'язування з «Е-боксом». Показано, що с-Мус і ВСФ конкурентно зв'язуються з одним і тим самим «Е-боксом» у промоторі карбамоїлфосфатсинтази/аспартат-карбамоїлтрансферази/дигідрооротази (carbamoyl-phosphate synthase/aspartate carbamoyl-transferase/dihydroorotase) в клітинах B5-4 [31, 32]. Конкуренція між ВСФ і транскрипційним фактором Е3 за зв'язування з боксом μ Е3 в енхансері важкого ланцюга імуноглобуліну призводить до пригнічення енхансерної активності в клітинах NIH 3T3 [33]. Більше того, відомо, що в клітинах RK13 ВСФ конкурує з гетеродимером арилгідрокарбонного рецептора-арилгідрокарбонного ядерного транслокатора (АГР-АГЯТ; arylhydrocarbon receptor-arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, AHR-ARNT) за зв'язування з елементом відповіді на ксенобіотики, ЕВК (xenobiotic-responsive element, XRE), в гені цитохрому CYP1A1 кроля і пригнічує опосередковану АГР-АГЯТ активацію люциферазної конструкції, контрольованої ЕВК [34]. ВСФ також пригнічує зв'язування ХМуоD з промотором ХмуоDa, перешкоджаючи самоактивації ХМуоDa в клітинах 10T [1/2] [36]. Таким чином, у нашому дослідженні показано ще один приклад того, коли ВСФ виступає в ролі активатора експресії.

Хоча ВСФ переважно існує *in vivo* у формі гетеродимерів ВСФ-1/ВСФ-2 [19], гомодимери, сформовані після надекспресії ВСФ-1 або ВСФ-2 в клітинах HeLa або гепатоми, активують експресію промотору, що містить чотири копії «Е-боксу», а також експресію гена люциферази під контролем 183 п. о. промотору піруваткінази типу L, ПК-L (L-type pyruvate kinase, PK_L) [20]. Крім того, відомо, що гомо- та гетеродимери ВСФ активують експресію таких генів, як p53 [36], циклін В1 [37], TGF β 2 [38], синтетаза жирних кислот [39] і ПК-L [23, 40]. Таким чином, надекспресія ВСФ-2 спричинює пригнічення експресії внаслідок будь-яких неспецифічних ефектів.

ЕСГ промотору ІАП-1 як сайти зв'язування для ВСФ: конкуренція між ВСФ і ФСГ. Раніше продемонстровано, що ділянка -177/-152 промото-

ру ІАП-1 містить дві послідовності «Е-бокса», а саме — 5'-CACGTA-3' (-175/-170) і 5'-CACGTG-3' (-165/-160), що були названі ЕСГ-1 і ЕСГ-2 відповідно. Стимуляція експресії ІАП-1 за умов гіпоксії залежить як від ЕСГ-1, так і від ЕСГ-2. Наші дослідження показали, що з сайтом ЕСГ-2 зв'язується транскрипційний фактор ФСГ-1. На відміну від цього, олігонуклеотид, який містить ЕСГ-1, утворює комплекс незалежно від концентрації O₂ [14]. Тому було зроблено припущення, що інші представники родини оСПС, зокрема, транскрипційні фактори ВСФ чи Мус, можуть зв'язуватися з елементом ЕСГ-1 промотору ІАП-1. Дійсно, в даному дослідженні показано, що ВСФ-1 і ВСФ-2 зв'язуються з обома елементами ЕСГ промотору ІАП-1. В експериментах з ядерним екстрактом із епітелію нирок (NRK-52E, клон ЕС-1) ВСФ-1, як і в цій роботі, зв'язувався з сайтом ЕСГ-2 промотору ІАП-1 щура. Інкубування в присутності антитіл до факторів Мус і Мах не призводило до формування «надзсуву» з олігонуклеотидом ЕСГ-2 [41].

Оскільки консенсусною послідовністю для зв'язування ВСФ є 5'-CACGTG-3' [16, 42], можна було очікувати, що головним сайтом зв'язування ВСФ є сайт ЕСГ-2 в промоторі ІАП-1. Дійсно, результати експериментів з котрансфекції люциферазної конструкції *pGl3-ІАП 276M1* з інтактним сайтом ЕСГ-2 і промтованим сайтом ЕСГ-1 та вектора, який експресує ВСФ-2а, свідчать про те, що з сайтом ЕСГ-2 може зв'язуватися ВСФ (рис. 4). Проте пригнічуючий ефект ВСФ виражений слабше, ніж при котрансфекції з конструкцією дикого типу *pGl3-ІАП 276* або з конструкцією *pGl3-ІАП 276M2*, яка містить інтактний ЕСГ-1. Цей результат вказує на те, що основним сайтом відповіді на дію ВСФ є сайт ЕСГ-1. Те, що ВСФ може взаємодіяти з «Е-боксом» 5'-CACGTA-3', який відрізняється від консенсусної послідовності, не протирічить іншим дослідженням. Раніше показано зв'язування ВСФ з такими неконсенсусними «Е-боксами», як 5'-CCCGTG-3' в промоторі γ -фібриногену щура [43], 5'-CCCGTG-3' в промоторі металотіонеїну I миші [44] і 5'-CACCTG-3' в промоторі аполіпротеїну А-II людини [45].

В експериментах з котрансфекції з векторами, які експресують мутантні форми ВСФ, що позбавлені або ДНК-зв'язуючої активності (Δ ВСФ-2а), або трансактивуючого домену (Δ ТАДВ-2а), показано, що для пригнічення експресії ІАП-1 достатньо наявності ДНК-зв'язуючого домену ВСФ-2а (рис. 3). Ці результати знаходяться у відповідності з даними, які свідчать про те, що пригнічення транскрипції рибосомної РНК у клітинах CHO [46]

і пригнічення залежної від *gas* трансформації клітин FR3T3 і 293 опосередковуються ДНК-зв'язуючим доменом ВСФ-2 [47].

Пригнічуючий ефект ВСФ-2 на експресію гена ІАП-1 може мати значення для регуляції експресії ІАП-1 у відповідь на дію численних стимулів. Оскільки з сайтом ЕСГ-2 зв'язуються як ВСФ, так і ФСГ-1, то, можливо, ці два транскрипційні фактори конкурують між собою за сайт ЕСГ-2. Конкуренцію між ними дійсно продемонстровано в експериментах з котрансфекції векторів, які експресують ВСФ-2a і ФСГ-1a разом з однією з люциферазних конструкцій *pGl3-ІАП 766*, *pGl3-ІАП 766M1* і *pGl3-ІАП 766M2* (рис. 5). В експериментах з котрансфекції ФСГ-1a разом з конструкцією, яка містила промотор ІАП-1 «дикого типу» або промотор, в якому було мутовано ЕСГ-1, надекспресія ФСГ-1a пом'якшувала пригнічуючий ефект ВСФ-2a. На відміну від цього, в гепатоцитах, трансфікованих конструкцією, в якій було мутовано ЕСГ-2, надекспресія ФСГ-1a не мала ніякого ефекту на активність люциферази. Можна зробити припущення, що за умов нормоксії послідовності ЕСГ промотору ІАП-1 зв'язують ВСФ, що спричинює низький рівень експресії ІАП-1. За умов гіпоксії білок ФСГ-1a стабілізується [48] і транспортується в ядро [49], що веде за собою накопичення активних гетеродимерів ФСГ-1a/ФСГ-1b. Активний ФСГ-1 далі конкурує з ВСФ за зв'язування з сайтами ЕСГ і викликає індукцію експресії ІАП-1.

Роль пригнічення експресії ІАП-1 під дією ВСФ у процесах росту і карциногенезу. Пригнічення експресії ІАП-1 під дією ВСФ може відігравати певну роль у процесах росту і регенерації. Висловлювалося припущення, що при переході клітин із стану спокою в проліферативному відношенні до клітинного циклу гетеродимер транскрипційних факторів Мус/Мах конкурує з ВСФ за зв'язування з «Е-боксом» [31]. Відповідно ВСФ-1 і ВСФ-2 виявляють антипроліферативні властивості. Наприклад, коли вони надекспресовані в клітинах REF, то пригнічують викликану трансформацію клітин, яка зумовлена дією с-Мус [50]. Клітинна трансформація, спричинена фактором Мус, пригнічується лише в разі надекспресії ВСФ-1 і ВСФ-2 «дикого типу» або їхніх мутантних форм, позбавлених трансактивуючого домену. Мутанти ВСФ-1 і ВСФ-2, які не мають ДНК-зв'язуючої активності, не впливають на Мус-залежну трансформацію клітин REF [50].

У нашому дослідженні також для прояву пригнічуючого ефекту ВСФ-2a було достатньо наявності ДНК-зв'язуючого домену. З одного боку, є

дані, які свідчать про те, що дія ВСФ2 не залежить від типу клітин [50], проте в інших дослідженнях показано, що ВСФ, наявний в клітинах остеосаркоми Saos-2, не впливає на клітинну проліферацію, що свідчить на користь існування деякого коактиватора, який присутній не в усіх типах клітин [51].

Антипроліферативні властивості ВСФ дають підстави для припущення, що втрата активності ВСФ може сприяти карциногенезу. Дійсно, в деяких клітинних лініях, отриманих з пухлин, ВСФ повністю втрачає активність [52]. Тому відсутність функціонального сайту зв'язування для ВСФ у промоторі ІАП-1 може відігравати певну роль у надекспресії ІАП-1, яка має місце в деяких клітинних лініях, отриманих з пухлин [53]. Можливо, ІАП-1 сприяє формуванню метастазів, як це було показано в клітинах раку легень [54]. Більш того, численні дослідження свідчать, що високі рівні ІАП-1 є показником несприятливого прогнозу при багатьох формах раку [55–57].

Автори вдячні д-ру А. Кану і д-ру М. Раймондье (Інститут молекулярної генетики Університету Рене Декарта, Франція) за надання векторів, які експресують ВСФ-2a, ΔВСФ-2a і ΔТАДВ-2a людини, а також д-ру Т. Д. Гелерту (Відділення генетики людини, Мічиганський медичний університет, США) — за надання кДНК ІАП-1 щура.

Дослідження фінансоване Дослідницьким товариством Німеччини, проект SFB402, частина А1.

A. A. Samoylenko, U. Roth, K. Jungermann, Th. Kietzmann, M. Yu. Obolenska

A role of upstream stimulatory factor-2a in regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression

Summary

The plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression is induced by mild hypoxia (8 % O₂) via the PAI-1 promoter region -175/-159 containing a hypoxia response element (HRE-2) binding the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and an adjacent response element (HRE-1) binding a so far unknown factor. The aim of the present study was to identify this factor and to investigate its role in the regulation of PAI-1 expression. It was found by supershift assays that the upstream stimulatory factor-2a (USF-2a) is bound mainly to HRE-1 of the PAI-1 promoter and to a lesser extent to HRE-2. The USF-2a overexpression inhibited both PAI-1 mRNA and protein expression in primary cultured rat hepatocytes under normoxia and hypoxia. The Luciferase (Luc) reporter gene constructions driven by 766 and 276 bp of the 5'-flanking region of the rat PAI-1 gene were transiently transfected into primary rat hepatocytes together with the expression vectors encoding a wild type USF-2a and a USF-2a mutant lacking DNA-binding and dimerization activity (ΔHU2a). The cotransfection of the wild type USF-2a vector reduced the Luc activity by about 8 fold, whereas the cotransfection of ΔHU2a did not influence this activity. Mutation of the HRE-1 (-175/-168) in the rat PAI-1 promoter Luc cons-

tructions decreased the USF-dependent inhibition of the Luc activity. Mutation of the HRE-2 (-165/-158) was less effective. These results indicated that the balance between two transcriptional factors, HIF-1 and USF-2a, which could bind adjacent the HRE sites, appeared to be involved in the regulation of the PAI-1 expression under many clinical conditions.

А. А. Самойленко, У. Рот, К. Юнгерманн, Т. Китцманн,
М. Ю. Оболенская

Роль вышерасположенного стимулирующего фактора-2а в регуляции экспрессии ингибитора активатора плазминогена-1

Резюме

Экспрессия ингибитора активатора плазминогена-1 (ИАП-1) стимулируется гипоксией (8 % O₂). За эту стимуляцию отвечает участок в промоторе ИАП-1 (-175/-159), содержащий элемент, воспринимающий гипоксию (ЭВГ-2). С последним взаимодействует фактор 1, стимулируемый гипоксией (ФСГ-1). С участком ЭВГ-2 граничит область ЭВГ-1, с которой связывается ранее не идентифицированный фактор. В данной работе осуществлена попытка идентифицировать этот фактор и выяснить его роль в регуляции экспрессии ИАП-1. На основании сдвига специфической электрофоретической полосы доказано, что с сайтами ЭВГ, преимущественно с ЭВГ-1, связывается вышерасположенный стимулирующий фактор-2а, ВСФ-2а. В первичной культуре гепатоцитов крысы суперэкспрессия ВСФ-2а в одинаковой мере угнетала экспрессию ИАП-1-специфической мРНК и белка ИАП-1 в условиях как гипоксии, так и нормоксии. Первичные гепатоциты крысы трансфицировали двумя рекомбинантными ДНК — конструкцией с геном люциферазы под контролем участка промотора ИАП-1 длиной 766 или 276 п. о. и векторами, экспрессирующими ВСФ дикого (ВСФ-2а) или мутантного (ΔВСФ-2а) типа. Последний не выявляет ДНК-связывающей и димеризационной активностей. Котрансфекция с вектором, экспрессирующим ВСФ-2а, угнетала активность люциферазы в 8 раз по отношению к контролю, где белок ВСФ-2а отсутствовал. Котрансфекция с вектором, экспрессирующим ΔВСФ-2а, не влияла на люциферазную активность. Мутации обеих ЭВГ и в большей мере мутация ЭВГ-1 препятствовали угнетению контролируемой промотором ИАП-1 люциферазной активности. Ингибиторного действия ВСФ-2а, опосредованного ЭВГ-2, в отличие от ЭВГ-1, не наблюдалось при суперэкспрессии ФСГ-1а. Эти результаты свидетельствуют о том, что баланс между двумя транскрипционными факторами, ВСФ-2а и ФСГ-1а, способными связываться со смежными ЭВГ, играет определенную роль в регуляции экспрессии ИАП-1 в условиях гипо- и нормоксии.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Lijnen H. R., Collen D. Mechanisms of plasminogen activation by mammalian plasminogen activators // *Enzyme*.—1988.—40, N 2—3.—P. 90—96.
- Kruihof E. K., Vassalli J. D., Schleuning W. D., Mattaliano R. J., Bachmann F. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937 // *J. Biol. Chem.*—1986.—261, N 24.—P. 11207—11213.
- Fearns C., Loskutoff D. J. Induction of plasminogen activator inhibitor 1 gene expression in murine liver by lipopolysaccharide. Cellular localization and role of endogenous tumor necrosis factor-alpha // *Amer. J. Pathol.*—1997.—150, N 2.—P. 579—590.
- Van M. J., Lawrence D. A., Loskutoff D. J. Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiplasminogen) synthesized by endothelial cells // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 23.—P. 14914—14921.
- Erickson L. A., Hekman C. M., Loskutoff D. J. The primary plasminogen-activator inhibitors in endothelial cells, platelets, serum, and plasma are immunologically related // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1985.—82, N 24.—P. 8710—8714.
- Reilly C. F., McFall R. C. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta regulate plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in vascular smooth muscle cells // *J. Biol. Chem.*—1991.—266, N 15.—P. 9419—9427.
- Busso N., Nicodeme E., Chesne C., Guillouzo A., Belin D., Hyafil F. Urokinase and type I plasminogen activator inhibitor production by normal human hepatocytes: modulation by inflammatory agents // *Hepatology*.—1994.—20, N 1, pt 1.—P. 186—190.
- Le-Magueresse B. B., Pernod G., Kolodie L., Morera A. M., Benahmed M. Tumor necrosis factor-alpha regulates plasminogen activator inhibitor-1 in rat testicular peritubular cells // *Endocrinology*.—1997.—138, N 3.—P. 1097—1105.
- Heaton J. H., Nebes V. L., O'Dell L. G., Morris-SM J., Gelehrter T. D. Glucocorticoid and cyclic nucleotide regulation of plasminogen activator and plasminogen activator-inhibitor gene expression in primary cultures of rat hepatocytes // *Mol. Endocrinol.*—1989.—3, N 1.—P. 185—192.
- Podor T. J., Loskutoff D. J. Immunoelectron microscopic localization of type 1 plasminogen activator inhibitor in the extracellular matrix of transforming growth factor-beta-activated endothelial cells // *Ann. New York Acad. Sci.*—1992.—667, N 12.—P. 46—49.
- Andreasen P. A., Georg B., Lund L. R., Riccio A., Stacey S. N. Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins // *Mol. Cell. Endocrinol.*—1990.—68, N 1.—P. 1—19.
- Carmeliet P., Stassen J. M., Schoonjans L., Ream B., De M. M., Mulligan R. C., Collen D. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis // *J. Clin. Invest.*—1993.—92, N 6.—P. 2756—2760.
- Eitzman D. T., McCoy R. D., Zheng X., Fay W. P., Shen T., Ginsburg D., Simon R. H. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene // *J. Clin. Invest.*—1996.—97, N 1.—P. 232—237.
- Kietzmann T., Roth U., Jungermann K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes // *Blood*.—1999.—94, N 12.—P. 4177—4185.
- Wang G. L., Semenza G. L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 3.—P. 1230—1237.
- Sawadogo M., Roeder R. G. Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region // *Cell*.—1985.—43, N 1.—P. 165—175.
- Murre C., McCaw P. S., Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins // *Cell*.—1989.—56, N 5.—P. 777—783.
- Pognonec P., Roeder R. G. Recombinant 43-kDa USF binds to DNA and activates transcription in a manner indistinguishable from that of natural 43/44-kDa USF // *Mol. Cell. Biol.*—1991.—11, N 10.—P. 5125—5136.
- Sirito M., Lin Q., Maity T., Sawadogo M. Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 3.—P. 427—433.

20. Viollet B., Lefrancois M. A., Henrion A., Kahn A., Raymondjean M., Martinez A. Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 3.—P. 1405—1415.
21. Bruzdinski C. J., Riordan J. M., Nordby E. C., Suter S. M., Gelehrter T. D. Isolation and characterization of the rat plasminogen activator inhibitor-1 gene // *J. Biol. Chem.*—1990.—265, N 4.—P. 2078—2085.
22. Bruzdinski C. J., Johnson M. R., Goble C. A., Winograd S. S., Gelehrter T. D. Mechanism of glucocorticoid induction of the rat plasminogen activator inhibitor-1 gene in HTC rat hepatoma cells: identification of cis-acting regulatory elements // *Mol. Endocrinol.*—1993.—9, N 9.—P. 1169—1177.
23. Lefrancois M. A., Martinez A., Antoine B., Raymondjean M., Kahn A. Upstream stimulatory factor proteins are major components of the glucose response complex of the L-type pyruvate kinase gene promoter // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 6.—P. 2640—2643.
24. Kietzmann T., Roth U., Freimann S., Jungermann K. Arterial oxygen partial pressures reduce the insulin-dependent induction of the perivenously located glucokinase in rat hepatocyte cultures: mimicry of arterial oxygen pressures by H₂O₂ // *Biochem. J.*—1997.—321, pt 1.—P. 17—20.
25. Zeheb R., Rafferty U. M., Rodriguez M. A., Andreasen P., Gelehrter T. D. Immunoaffinity purification of HTC rat hepatoma cell plasminogen activator-inhibitor-1 // *Thromb. Haemost.*—1987.—58, N 5.—P. 1017—1023.
26. Immenschuh S., Hinke V., Ohlmann A., Gifhorn K. S., Katz N., Jungermann K., Kietzmann T. Transcriptional activation of the haem oxygenase-1 gene by cGMP via a cAMP response element/activator protein-1 element in primary cultures of rat hepatocytes // *Biochem. J.*—1998.—334, pt 1.—P. 141—146.
27. Immenschuh S., Nagae Y., Satoh H., Baumann H., Muller-Eberhard U. The rat and human hemopexin genes contain an identical interleukin-6 response element that is not a target of CAAT enhancer-binding protein isoforms // *J. Biol. Chem.*—1994.—269, 17.—P. 12654—12661.
28. Dignam J. D., Lebovitz R. M., Roeder R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11, N 5.—P. 1475—1489.
29. Semenza G. L., Wang G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation // *Mol. Cell. Biol.*—1992.—12, N 12.—P. 5447—5454.
30. Johnson M. R., Bruzdinski C. J., Winograd S. S., Gelehrter T. D. Regulatory sequences and protein-binding sites involved in the expression of the rat plasminogen activator inhibitor-1 gene // *J. Biol. Chem.*—1992.—267, N 17.—P. 12202—12210.
31. Boyd K. E., Farnham P. J. Myc versus USF: discrimination at the *cad* gene is determined by core promoter elements // *Mol. Cell. Biol.*—1997.—17, N 5.—P. 2529—2537.
32. Boyd K. E., Farnham P. J. Coexamination of site-specific transcription factor binding and promoter activity in living cells // *Mol. Cell. Biol.*—1999.—19, N 12.—P. 8393—8399.
33. Carter R. S., Ordentlich P., Kadesch T. Selective utilization of basic helix-loop-helix-leucine zipper proteins at the immunoglobulin heavy-chain enhancer // *Mol. Cell. Biol.*—1997.—17, N 1.—P. 18—23.
34. Takahashi Y., Nakayama K., Itoh S., Fujii K. Y., Kamataki T. Inhibition of the transcription of CYP1A1 gene by the upstream stimulatory factor 1 in rabbits. Competitive binding of USF1 with AhR.Arm complex // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 48.—P. 30025—30031.
35. Lun Y., Sawadogo M., Perry M. Autoactivation of Xenopus MyoD transcription and its inhibition by USF // *Cell Growth Differ.*—1997.—8, N 3.—P. 275—282.
36. Reisman D., Rotter V. The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21, N 2.—P. 345—350.
37. Cogswell J. P., Godlevski M. M., Bonham M., Bisi J., Babiss L. Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter // *Mol. Cell. Biol.*—1995.—15, N 5.—P. 2782—2790.
38. Scholtz B., Kingsley K. M., Rizzino A. Transcription of the transforming growth factor-beta2 gene is dependent on an E-box located between an essential cAMP response element/activating transcription factor motif and the TATA box of the gene // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 50.—P. 32375—32380.
39. Wang D., Sul H. S. Upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthase promoter. USF1 is regulated // *J. Biol. Chem.*—270, N 48.—P. 28716—28722.
40. Vallet V. S., Casado M., Henrion A. A., Bucchini D., Raymondjean M., Kahn A., Vaulont S. Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose // *J. Biol. Chem.*—1998.—273, N 32.—P. 20175—20179.
41. White L. A., Bruzdinski C. J., Kutz S. M., Gelehrter T. D., Higgins P. J. Growth state-dependent binding of USF-1 to a proximal promoter E box element in the rat plasminogen activator inhibitor type 1 gene // *Exp. Cell Res.*—2000.—260, N 1.—P. 127—135.
42. Bendall A. J., Molloy P. L. Base preferences for DNA binding by the bHLH-Zip protein USF: effects of MgCl₂ on specificity and comparison with binding of Myc family members // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 14.—P. 2801—2810.
43. Chodosh L. A., Carthew R. W., Morgan J. G. The adenovirus major late transcription factor activates the rat gamma-fibrinogen promoter // *Science.*—1987.—238, N 4827.—P. 684—688.
44. Carthew R. W., Chodosh L. A., Sharp P. A. The major late transcription factor binds to and activates the mouse metallothionein I promoter // *Genes Dev.*—1987.—1, N 9.—P. 973—980.
45. Ribeiro A., Pastier D., Kardassis D., Chambaz J., Cardot P. Cooperative binding of upstream stimulatory factor and hepatic nuclear factor 4 drives the transcription of the human apolipoprotein A-II gene // *J. Biol. Chem.*—1999.—274, N 3.—P. 1216—1225.
46. Ghosh A. K., Datta P. K., Jacob S. T. The dual role of helix-loop-helix-zipper protein USF in ribosomal RNA gene transcription *in vivo* // *Oncogene.*—1997.—14, N 5.—P. 589—594.
47. Aperlo C., Boulukos K. E., Pognonec P. The basic region/helix-loop-helix/leucine repeat transcription factor USF interferes with Ras transformation // *Eur. J. Biochem.*—1996.—241, N 1.—P. 249—253.
48. Huang L. E., Arany Z., Livingston D. M., Bunn H. F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 50.—P. 32253—32259.
49. Kallio P. J., Okamoto K., O'Brien S., Carrero P., Makino Y., Tanaka H., Poellinger L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBF/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha // *EMBO J.*—1998.—17, N 22.—P. 6573—6586.
50. Luo X., Sawadogo M. Antiproliferative properties of the USF

- family of helix-loop-helix transcription factors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93, N 3.—P. 1308—1313.
51. Qyang Y., Luo X., Lu T., Ismail P. M., Krylov D., Vinson C., Sawadogo M. Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation // *Mol. Cell. Biol.*—1999.—19, N 2.—P. 1508—1517.
52. Ismail P. M., Lu T., Sawadogo M. Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines // *Oncogene.*—1999.—18, N 50.—P. 5582—5591.
53. Reilly D., Andreassen P., Duffy M. J. Studies on plasminogen activator inhibitor 1 levels in human breast cancer // *Biochem. Soc. Trans.*—1990.—18, N 2.—P. 354—355.
54. Liu G., Shuman M. A., Cohen R. L. Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells // *Int. J. Cancer.*—1995.—60, N 4.—P. 501—506.
55. Pedersen H., Brunner N., Francis D., Osterlind K., Ronne E., Hansen H. H., Dano K., Grondahl H. J. Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue // *Cancer Res.*—1994.—54, N 17.—P. 4671—4675.
56. Grondahl H. J., Christensen I. J., Rosenquist C., Brunner N., Mouridsen H. T., Dano K., Blichert T. M. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis // *Cancer Res.*—1993.—53, N 11.—P. 2513—2521.
57. Kuhn W., Pache L., Schmalfeldt B., Dettmar P., Schmitt M., Janicke F., Graeff H. Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy // *Gynecol. Oncol.*—1994.—55, N 3, pt 1.—P. 401—409.

УДК 577.218

Надійшла до редакції 30.10.01