

ЯДЕРНЫЙ ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ Y (NF-Y) ТОРМОЗИТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ИНГИБИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ФАКТОРА SOX2 В КЛЕТКАХ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ NT2/D1*

© 2015 М. Мойсин**, В. Топалович,
Д. Марьянович Висентич, М. Стеванович

*Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering,
University of Belgrade, 11010 Belgrade, Serbia; fax: +381(11)397-5808,
E-mail: mojsin@imgge.bg.ac.rs, vladankatopalovic@imgge.bg.ac.rs,
jelenamarjanovic@imgge.bg.ac.rs, milenastevanovic@imgge.bg.ac.rs*

Поступила в редакцию 01.08.14
После доработки 22.09.14

Ядерный фактор NF-Y относится к факторам транскрипции эмбриональных стволовых клеток и принимает участие в регуляции клеточной пролиферации. В данной работе исследована роль NF-Y в поддержании полипотентного состояния клеток NT2/D1 – наиболее хорошо изученной линии эмбриональной карциномы человека в культуре. Проведен анализ метода белковой трансдукции и показано, что он является эффективным способом повысить уровень экспрессии А субъединицы NF-Y (NF-YA) в клетках NT2/D1. Осуществлена трансдукция в клетки NT2/D1 гибридного белка GST-TAT-NF-YAs, несущего укороченную форму NF-YA (NF-YAs), и изучено ее влияние на пролиферацию клеток NT2/D1. Установлено, что при повышенной экспрессии NF-YAs пролиферативный потенциал клеток NT2/D1 значительно падал, и это повышение оказывало негативное воздействие на продукцию ими фактора транскрипции SOX2, являющегося специфическим маркером полипотентных стволовых клеток. И наконец, оценка уровня экспрессии белка p53 свидетельствовала, что процесс торможения роста клеток NT2/D1 под действием NF-Y был p53-независимым.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фактор транскрипции NF-Y, клетки линии NT2/D1, SOX2, p53.

Клетки NT2/D1 – это одна из наиболее хорошо охарактеризованных линий клеток эмбриональной карциномы человека, которая широко используется для изучения характерных признаков полипотентных клеток, путей их дальнейшего развития и дифференцировки [1, 2]. Эти клетки похожи на эмбриональные стволовые клетки человека по набору экспрессированных специфических генов и характеру метилирования ДНК [3]. Помимо этого, полипотентные клетки NT2/D1 способны развиваться по нейрональному, мезодермальному и эктодермальному пути [1, 4]. В связи с тем, что использование эмбриональных клеток человека сталкивается с рядом этических и правовых проблем, культура клеток NT2/D1 может служить в качестве адекватной модели для изучения развития эмбрионов человека [5].

Ядерный фактор транскрипции Y (NF-Y) может выступать в качестве как активатора, так и ингибитора транскрипции [6–8]. Он регулирует активность генов-мишеней путем взаимодействия с блоком нуклеотидов ССААТ – широко распространенным контрольным элементом, встречающимся в проксимальных промоторах, тканеспецифических генах-усилителях и в длинных терминальных повторах отдельных подклассов эндогенных ретровирусов человека [7, 9]. NF-Y представляет собой белковый комплекс, состоящий из трех различных субъединиц: NF-YA, NF-YB и NF-YC. Считается, что субъединица NF-YA является в этом комплексе ведущей и необходима как для образования цельного NF-Y, так и для его специфического связывания с ДНК [10]. Обнаружено несколько изоформ NF-YA, образующихся в результате дифференциального сплайсинга. В частности, тканеспецифический альтернативный сплайсинг приводит к образованию двух основных изоформ этого белка: короткой (NF-YAs) и длинной (NF-YA1), которые различаются на 28 аминокислотных остатков

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 14-228, 25.01.2015.

** Адресат для корреспонденции.

(а.о.) в активирующем транскрипцию домене, обогащенным остатками Gln [11]. Ранее было показано, что укороченная изоформа NF-YAs была активна в эмбриональных стволовых клетках мыши, где она активировала клеточную пролиферацию и подавляла дифференцировку [12].

Одним из признаков эмбриональных стволовых клеток и индуцированных полипотентных клеток является экспрессия фактора транскрипции SOX2 [13–16]. Его экспрессия строго регулируется в процессе развития клетки, поскольку гомеостаз уровней важнейших факторов транскрипции необходим не только для поддержания полипотентного состояния клеток, но и для торможения их перехода к дифференцировке [17]. Как было отмечено нами ранее, фактор транскрипции NF-Y регулирует экспрессию некоторых генов SOX человека (SOX2, SOX3, SOX14 и SOX18) в клетках линии NT2/D1 [18–22]. Это активирующее воздействие NF-Y обуславливается, по крайней мере, отчасти, его связыванием со специфическим блоком ССААТ в промоторах генов-мишеней и путем взаимодействия с другими факторами, участвующими в регуляции транскрипции генов SOX человека [18–24]. Для выяснения роли NF-Y в поддержании полипотентного состояния клеток эмбриональной карциномы человека, мы изучали характерные фенотипические черты клеток линии NT2/D1, экспрессирующей большое количество белка NF-Y. Используемый нами подход был ранее применен при исследовании человеческих гемопоэтических клеток-предшественников [25] и эмбриональных стволовых клеток мыши [12]. Вместо традиционной трансфекции вектора экспрессии мы прямо вводили в клетки гибридный белок GST-TAT-NF-YAs методом белковой трансдукции (эпитоп TAT способствует быстрому транзиту этого гибридного протеина через клеточную мембрану, GST – глутатион S-трансфераза) [12, 25].

В представленной работе была проведена оценка эффективности использованной нами процедуры белковой трансдукции для повышения уровня экспрессии NF-Y в клетках NT2/D1, выбранных в качестве модели эмбриональных стволовых клеток человека. Кроме того, было изучено проявление некоторых характерных признаков стволовых клеток (пролиферативный потенциал и продукцию специфического маркера SOX2) в культуре NT2/D1 после трансдукции экспрессии изоформы NF-YAs. Установлено, что белковая трансдукция является эффективным методом повышения экспрессии NF-Y в клетках NT2/D1. При изучении влияния NF-YAs на жизнеспособность клеток NT2/D1 было обнаружено значительное снижение их пролиферативного потенциала. Мы отметили

прямую корреляцию между повышением уровня экспрессии NF-YAs и снижением продукции маркерного белка SOX2 в клетках NT2/D1. И наконец, оценка уровней экспрессии белка p53 показала, что она не повышалась после трансдукции в клетки гибридного белка GST-TAT-NF-YAs. Поскольку уже сама процедура трансдукции фрагмента GST-TAT (отрицательный контроль) приводила к увеличению уровня p53, то мы предположили, что ингибирование роста клеток NT2/D1 под действием NF-Y является p53-независимым.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культура клеток и трансдукция белков. Клетки линии NT2/D1, любезно предоставленные проф. П.В. Эндрю (Шеффилдский университет, Англия), выращивали в среде Дульбекко (DMEM) в присутствии 10%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ глутамин, 0,45%-ной глюкозы и пенициллина/стрептомицина («Invitrogen», США) при 37° в атмосфере 10%-ной CO₂ как было описано ранее [2, 26]. Перед трансдукцией клетки высевали в 6-луночные планшеты (0,3 × 10⁶ клеток в лунке).

Гибридные белки GST-TAT-NF-YAs и GST-TAT были любезно предоставлены проф. Р. Мантовани. Трансдукцию белков в клетки NT2/D1 выполняли как было описано ранее [12]: к клеткам добавляли 50 нМ белка и инкубировали в течение 48, 72 или 96 ч со сменой среды каждые 24 ч. Клетки подсчитывали вручную с использованием трипанового синего.

Вестерн-блоттинг. Клетки лизировали в 20 мМ Tris-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 5 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 1%-ный NP-40, 10%-ный глицерин и коктейль из ингибиторов протеаз («Roche Diagnostics GmbH», Швейцария). Для иммуноблоттинга использованы анти-NF-YA Mab1a (любезно предоставлены проф. Р. Мантовани), анти-SOX2 антитела («R&D Systems», США), анти-p53 антитела DO1 («GeneSpin», Италия), антитела против α-тубулина DM1A («Calbiochem», Германия) и анти-GAPDH антитела AM20337PU-S («Acris Antibodies, Inc.», Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка эффективности трансдукции белка GST-TAT-NF-YAs в клетки NT2/D1. Для оценки эффективности метода белковой трансдукции была использована процедура, использованная

ранее Мантовани и соавт. [12] при трансдукции GST-TAT-NF-YAs в эмбриональные стволовые клетки мыши. Клетки NT2/D1 инкубировали с белком GST-TAT-NF-YAs или GST-TAT (отрицательный контроль) в концентрации 50 нМ в течение 48, 72 или 96 ч. После этого клетки лизировали, и белки клеточных лизатов анализировали методом Вестерн-блоттинга. Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствовали, что транслокация GST-TAT-NF-YAs в клетки происходила уже на 48 ч инкубации, и через 72 ч концентрация этого белка в клеточных лизатах достигала очень высоких значений. Дальнейшая инкубация (96 ч) ни только не приводила к увеличению уровня экспрессии GST-TAT-NF-YAs, но даже сопровождалась его снижением. Таким образом, было показано, что белковая трансдукция является очень эффективным методом введения GST-TAT-NF-YAs в клетки NT2/D1, и что максимальное количество белка накапливалось к клеткам через 72 ч после начала трансдукции.

Воздействие трансдуцированного белка GST-TAT-NF-YAs на жизнеспособность клеток NT2/D1. Ранее было установлено, что при экспрессии укороченной изоформы субъединицы NF-YA (белок NF-YAs) наблюдалась стимуляция роста эмбриональных стволовых клеток человека и гемопоэтических клеток-предшественников человека [12, 25]. Для проверки воздействия GST-TAT-NF-YAs на клетки NT2/D1 мы осуществляли его трансдукцию в течение 48 и 72 ч, а затем подсчитывали количество живых клеток с использованием трипанового синего. Как следует из рис. 2, экспрессия GST-TAT-NF-YAs в клетках NT2/D1 приводила к снижению скорости клеточной пролиферации на 50% – через 48 ч и на 60% – через 72 ч. Используемый в качестве отрицательного контроля белок GST-TAT не оказывал ингибирующего воздействия на рост клеток. Полученные результаты совпадали с наблюдениями Гатнера и соавт. [27], которые показали, что NF- Υ индуцировал E2F1- и p53-зависимый апоптоз в эмбриональных фибробластах мыши и клетках человека. Напротив, экспрессия NF- Υ в эмбриональных стволовых клетках мыши и гемопоэтических клетках человека приводила к активации пролиферации и поддержанию статуса стволовых клеток [12, 25].

Для объяснения этого парадокса и выяснения механизма антипролиферативного действия NF- Υ на клетки NT2/D1 определяли уровни экспрессии SOX2 и p53 после трансдукции в них белка GST-TAT-NF-YAs.

Влияние трансдуцированного белка GST-TAT-NF-YAs на экспрессию SOX2 и p53 в клетках NT2/D1. Воздействие фактора NF- Υ на рост клеток предполагало его участие в регуляции кле-

точного цикла эмбриональных стволовых клеток мыши и человека [12, 28]. Этот фактор играет важную роль в поддержании полипотентного состояния клеток мыши путем прямой активации соответствующих генов-мишеней, в частности, гена *sox2* [12]. Ранее изучение экспрессии белка SOX2 в клетках NT2/D1, кратковременно трансфицированных субъединицей NF-YAs, показало умеренное увеличение уровня экспрессии SOX2 [21]. Такая кратковременная трансформация клеток не позволяла длительное время поддерживать достаточно высокий уровень экспрессии NF-YA, что обусловлено коротким периодом его жизни. Поэтому в этой работе мы использовали метод белковой трансдукции для достижения высокой внутриклеточной концентрации GST-TAT-NF-YAs и исследовали экспрессию SOX2 в клетках NT2/D1 (рис. 3, а). Как видно из рис. 3 (ср. дорожки 2 и 3), через 48 ч с начала трансдукции GST-TAT-NF-YAs уровень SOX2 слегка возрастал, что соответствовало полученным нами ранее данным [21]. Напротив, через 72 ч с начала трансдукции уровень SOX2 становился более низким, чем в контрольных клетках, трансдуцированных белком GST-TAT (ср. дорожки 5 и 6). Это снижение уровня экспрессии белка SOX2 коррелировало с увеличением во времени внутриклеточной концентрации GST-TAT-NF-YAs (рис. 1). Ранее было установлено, что при увеличении продукции SOX2 наблюдалось снижение транскрипционной экспрессии генов, ответственных за торможение клеточного цикла (cycle arrest) и апоптоз в эмбриональных стволовых клетках человека и клетках человеческой эмбриональной карциномы [29]. Таким образом, поскольку SOX2 явля-

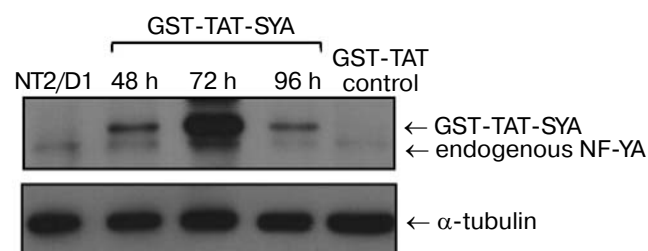


Рис. 1. Определение уровня экспрессии NF-YA в клетках NT2/D1, обработанных GST-TAT-NF-YAs. Клетки инкубировали в присутствии или в отсутствие 50 нМ GST-TAT-NF-YAs в течение 48, 72 и 96 ч и определяли количество этого белка в клеточных лизатах методом иммуноблоттинга с использованием NF-YA-специфичных антител Mab1a. В контрольных экспериментах проводили трансдукцию GST-TAT (негативный контроль) в течение 72 ч, а также определяли уровень экспрессии α -тубулина, использованного в качестве внутреннего контроля

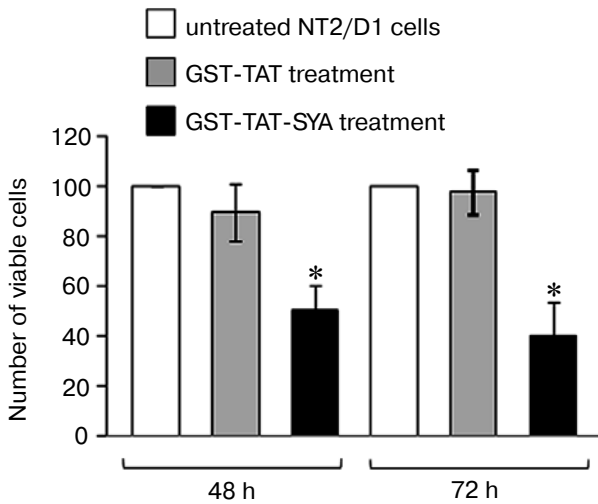


Рис. 2. Изучение роста клеток NT2/D1, обработанных GST-TAT-NF-YAs. Клетки инкубировали в среде, содержащей 50 мМ GST-TAT-NF-YAs или GST-TAT (негативный контроль) в течение 48 или 72 ч, а затем подсчитывали количество живых клеток с помощью трипанового синего. Данные выражали в процентах по отношению к необработанной культуре. Все данные представлены как средние значения \pm s.d. по трем независимым экспериментам. $P < 0,05$

ется одним из главных регуляторов роста и дифференцировки полипотентных клетках, то можно предположить, что влияние NF-YA на экспрессию белка SOX2 и объясняет его ингибирующее воздействие на скорость пролиферации клеток NT2/D1 (рис. 2).

Как было отмечено ранее, одним из дополнительных механизмов антипролиферативного воздействия субъединицы NF-YA может являться ее влияние на p53-зависимый клеточный апоптоз [27]. Поскольку клетки NT2/D1 несут ген белка p53 «дикого» типа, мы определили уровень его транскрипционной экспрессии в этих клетках после трансдукции в них белка GST-TAT-NF-YAs (рис. 3, б). Анализ, выполненный методом Вестерн-блоттинга, показал, что повышение уровня белка GST-TAT-NF-YAs не оказывало существенного влияния на продукцию p53 ни за 48, ни за 72 ч после начала трансдукции (ср. дорожки 2 и 3 и дорожки 5 и 6 соответственно). Трансдукция GST-TAT-NF-YAs приводила к незначительному повышению уровня p53 (сравни между собой дорожки 1 и 2 и дорожки 4 и 5), однако такой же эффект наблюдался и в контрольном эксперименте при трансдукции GST-TAT (ср. между собой дорожки 1 и 3 и дорожки 4 и 6). Полученные результаты свидетельствовали о том, что возрастание уровня p53 не является результатом повышенной экспрессии

NF-Y, а скорее всего, следствием трансдукции гибридного белка GST-TAT или же самой процедуры трансдукции. Вместе с тем трансдукция контрольного белка GST-TAT не влияла на жизнеспособность и рост клеток NT2/D1 (рис. 2). Таким образом, ингибирование роста клеток, экспрессирующих повышенное количество NF-Y, происходит либо независимо от белка p53, либо для этого требовалось одновременное повышение экспрессии обоих этих белков. Известно, что NF-Y и p53 могут функционировать как партнеры в процессе регуляции клеточной пролиферации (цитировано по работе Имбриано [30]). Обычно белок p53 регулирует транскрипцию генов-мишеней путем связывания со специфической ДНК-последовательностью p53RE (p53-чувствительный элемент) [31–37]. Показано также, что при отсутствии в генах элемента

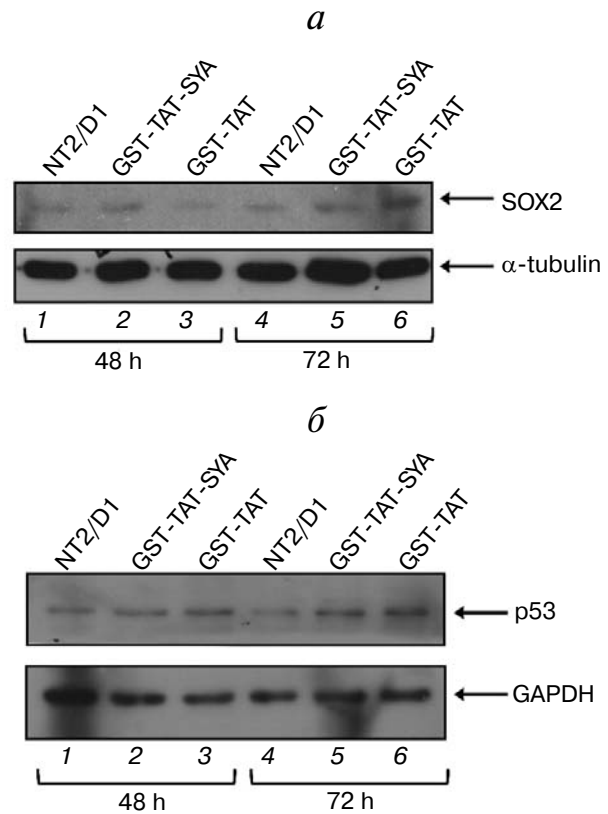


Рис. 3. Определение уровней экспрессии SOX2 (а) и p53 (б) в клетках NT2/D1, обработанных GST-TAT-NF-YAs. Клетки инкубировали в присутствии или в отсутствие 50 нМ GST-TAT-NF-YAs или GST-TAT (негативный контроль) в течение 48 или 72 ч и анализировали белки клеточных лизатов методом иммуноблоттинга с помощью соответствующих антител. В качестве внутренних контролей были использованы GAPDH (глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа) и α -тубулин

p53RE, p53 ассоциируется с фактором NF-Y на нуклеотидном блоке ССААТ и может регулировать транскрипцию генов, отвечающих за апоптоз [38].

Таким образом, было установлено, что трансдукция гибридного белка GST-TAT-NF-YAs в клетки эмбриональной карциномы человека линии NT2/D1 приводила к ингибированию пролиферации по механизму, связанному со снижением продукции фактора транскрипции стволовых клеток SOX2. Результаты данной работы противоречили данным, полученным с использованием эмбриональных стволовых клеток мыши и человеческих гемопоэтических клеток-предшественников [12, 25]. Подобные различия могли бы отражать типоспецифическое действие NF-Y и его связь со степенью развитости клеток. Такая специфичность действия фактора NF-Y обуславливается различными регуляторными механизмами: связыванием NF-YA с особым блоком нуклеотидов ССААТ [7], воздействием на него различных тканеспецифических кофакторов или непосредственным взаимодействием NF-Y с другими факторами транскрипции [39]. Помимо этого, обладая гистонподобными свойствами, NF-Y может действовать и как активатор, и как репрессор транскрипции [6].

Посттрансляционная модификация NF-Y может добавлять сложности в его действие, поскольку контролирует количество этого фактора в клетке [27]. Предполагается, что общий уровень NF-Y в клетке определяет путь ее дальнейшего развития: пролиферация, торможение клеточного цикла или гибель [27]. Фактор NF-Y играет центральную роль в регуляции транскрипции генов, обеспечивающих прохождение клеточного цикла и кодирующих циклины А, -В1 и -В2, cdc25A и -25C, cdk1, E2F1 [40–47]. Степень активности этих генов определяет судьбоносные для клетки процессы: пролиферацию или гибель. Уровни экспрессии этих регуляторных белков находятся в зависимости от типа клеток (тканей), генетического фона организма и клеточного окружения [48].

Поскольку роль фактора NF-Y в каскаде реакций, приводящих к апоптозу, не очень понятна, то механизмы, лежащие в основе его антипролиферативного действия, требуют дальнейшего изучения.

Авторы выражают благодарность проф. Паулю Эндрю за предоставление клеток NT2/D1.

Авторы признательны проф. Роберто Мантовани за антитела против белка p53 фирмы «GeneSpin» (Италия) и его ценный вклад в данную работу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andrews, P.W. (2002) From teratocarcinomas to embryonic stem cells, *Philos. Trans. R. Soc. London Biol. Sci.*, **357**, 405–417.
- Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C., and Fogh, J. (1984) Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation *in vivo* and *in vitro*, *Lab. Invest.*, **50**, 147–162.
- Bocker, M.T., Tuorto, F., Raddatz, G., Musch, T., Yang, F.C., Xu, M., Lyko, F., and Breiling, A. (2012) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET2 maintains the active state of the mammalian HOXA cluster, *Nature Commun.*, **3**, 818.
- Pal, R., and Ravindran, G. (2006) Assessment of pluripotency and multilineage differentiation potential of NTERA-2 cells as a model for studying human embryonic stem cells, *Cell Prolif.*, **39**, 585–598.
- Przyborski, S.A., Christie, V.B., Hayman, M.W., Stewart, R., and Horrocks, G.M. (2004) Human embryonal carcinoma stem cells: models of embryonic development in humans, *Stem Cells Dev.*, **13**, 400–408.
- Ceribelli, M., Dolfini, D., Merico, D., Gatta, R., Vigano, A.M., Pavesi, G., and Mantovani, R. (2008) The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor, *Mol. Cell Biol.*, **28**, 2047–2058.
- Dolfini, D., Zambelli, F., Pavesi, G., and Mantovani, R. (2009) A perspective of promoter architecture from the CCAAT box, *Cell Cycle*, **8**, 4127–4137.
- Peng, Y., and Jahroudi, N. (2002) The NF-Y transcription factor functions as a repressor and activator of the von Willebrand factor promoter, *Blood*, **99**, 2408–2417.
- Fleming, J.D., Pavesi, G., Benatti, P., Imbriano, C., Mantovani, R., and Struhl, K. (2013) NF-Y coassociates with FOS at promoters, enhancers, repetitive elements, and inactive chromatin regions, and is stereo-positioned with growth-controlling transcription factors, *Genome Res.*, **23**, 1195–1209.
- Romier, C., Cocchiarella, F., Mantovani, R., and Moras, D. (2003) The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y, *J. Biol. Chem.*, **278**, 1336–1345.
- Li, X.Y., Hooft van Huijsduijnen, R., Mantovani, R., Benoist, C., and Mathis, D. (1992) Intron-exon organization of the NF-Y genes. Tissue-specific splicing modifies an activation domain, *J. Biol. Chem.*, **267**, 8984–8990.
- Dolfini, D., Minuzzo, M., Pavesi, G., and Mantovani, R. (2012) The short isoform of NF-YA belongs to the embryonic stem cell transcription factor circuitry, *Stem Cells*, **30**, 2450–2459.
- Sekido, R., and Lovell-Badge, R. (2009) Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.*, **25**, 19–29.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861–872.

15. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663–676.
16. Wegner, M. (2010) All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**, 381–390.
17. Rizzino, A. (2013) Concise review: The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels, *Stem Cells*, **31**, 1033–1039.
18. Djurovic, J., and Stevanovic, M. (2004) Structural and functional characterization of the human SOX14 promoter, *Biochim. Biophys. Acta*, **1680**, 53–59.
19. Kovacevic-Grujicic, N., Mojsin, M., Krstic, A., and Stevanovic, M. (2005) Functional characterization of the human SOX3 promoter: identification of transcription factors implicated in basal promoter activity, *Gene*, **344**, 287–297.
20. Krstic, A., Mojsin, M., and Stevanovic, M. (2007) Regulation of SOX3 gene expression is driven by multiple NF-Y binding elements, *Arch. Biochem. Biophys.*, **467**, 163–173.
21. Milivojevic, M., Nikecic, G., Kovacevic-Grujicic, N., Krstic, A., Mojsin, M., Drakulic, D., and Stevanovic, M. (2010) Involvement of ubiquitous and TALE transcription factors, as well as liganded RXRA in the regulation of human SOX2 gene expression in NT2/D1 embryonal carcinoma cell line, *Arch. Biol. Sci.*, **62**, 199–210.
22. Petrovic, I., Kovacevic-Grujicic, N., and Stevanovic, M. (2009) ZBP-89 and Sp3 down-regulate while NF-Y up-regulates SOX18 promoter activity in HeLa cells, *Mol. Biol. Rep.*, **36**, 993–1000.
23. Kovacevic-Grujicic, N., Yokoyama, K., and Stevanovic, M. (2008) Trans-activation of the human SOX3 promoter by MAZ in NT2/D1 cells, *Arch. Biol. Sci.*, **60**, 379–387.
24. Petrovic, I., Kovacevic-Grujicic, N., Popovic, J., Krstic, A., Milivojevic, M., and Stevanovic, M. (2011) Members of the CREB/ATF and AP1 family of transcription factors are involved in the regulation of SOX18 gene expression, *Arch. Biol. Sci.*, **63**, 517–525.
25. Domashenko, A.D., Danet-Desnoyers, G., Aron, A., Carroll, M.P., and Emerson, S.G. (2010) TAT-mediated transduction of NF-Ya peptide induces the *ex vivo* proliferation and engraftment potential of human hematopoietic progenitor cells, *Blood*, **116**, 2676–2683.
26. Andrews, P.W. (1998) Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article, *APMIS*, **106**, 158–167.
27. Gurtner, A., Fuschi, P., Martelli, F., Manni, I., Artuso, S., Simonte, G., Ambrosino, V., Antonini, A., Folgiero, V., Falcioni, R., Sacchi, A., and Piaggio, G. (2010) Transcription factor NF-Y induces apoptosis in cells expressing wild-type p53 through E2F1 upregulation and p53 activation, *Cancer Res.*, **70**, 9711–9720.
28. Grskovic, M., Chaivorapol, C., Gaspar-Maia, A., Li, H., and Ramalho-Santos, M. (2007) Systematic identification of cis-regulatory sequences active in mouse and human embryonic stem cells, *PLoS Genet.*, **3**, e145.
29. Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007) Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal, *BMC Dev. Biol.*, **7**, 46.
30. Imbriano, C., Gnesutta, N., and Mantovani, R. (2012) The NF-Y/p53 liaison: well beyond repression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1825**, 131–139.
31. Bourdon, J.C., Deguin-Chambon, V., Lelong, J.C., Dessen, P., May, P., Debuire, B., and May, E. (1997) Further characterisation of the p53 responsive element-identification of new candidate genes for trans-activation by p53, *Oncogene*, **14**, 85–94.
32. El-Deiry, W.S. (1998) Regulation of p53 downstream genes, *Semin. Cancer Biol.*, **8**, 345–357.
33. El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992) Definition of a consensus binding site for p53, *Nature Genet.*, **1**, 45–49.
34. Funk, W.D., Pak, D.T., Karas, R.H., Wright, W.E., and Shay, J.W. (1992) A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes, *Mol. Cell Biol.*, **12**, 2866–2871.
35. Ko, L.J., and Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm, *Genes Dev.*, **10**, 1054–1072.
36. Menendez, D., Inga, A., and Resnick, M.A. (2009) The expanding universe of p53 targets, *Nature Rev. Cancer*, **9**, 724–737.
37. Willis, A.C., and Chen, X. (2002) The promise and obstacle of p53 as a cancer therapeutic agent, *Curr. Mol. Med.*, **2**, 329–345.
38. Imbriano, C., Gurtner, A., Cocchiarella, F., Di Agostino, S., Basile, V., Gostissa, M., Dobbstein, M., Del Sal, G., Piaggio, G., and Mantovani, R. (2005) Direct p53 transcriptional repression: *in vivo* analysis of CCAAT-containing G2/M promoters, *Mol. Cell Biol.*, **25**, 3737–3751.
39. Su, M., Bansal, A.K., Mantovani, R., and Sodek, J. (2005) Recruitment of nuclear factor Y to the inverted CCAAT element (ICE) by c-Jun and E1A stimulates basal transcription of the bone sialoprotein gene in osteosarcoma cells, *J. Biol. Chem.*, **280**, 38365–38375.
40. Bolognese, F., Wasner, M., Dohna, C.L., Gurtner, A., Ronchi, A., Muller, H., Manni, I., Mossner, J., Piaggio, G., Mantovani, R., and Engeland, K. (1999) The cyclin B2 promoter depends on NF-Y, a trimer whose CCAAT-binding activity is cell-cycle regulated, *Oncogene*, **18**, 1845–1853.
41. Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolese, M., Sacchi, A., Blandino, G., and Piaggio, G. (2006) Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation, *Cancer Cell*, **10**, 191–202.
42. Farina, A., Manni, I., Fontemaggi, G., Tiainen, M., Cenciarelli, C., Bellorini, M., Mantovani, R., Sacchi, A., and Piaggio, G. (1999) Down-regulation of cyclin B1 gene transcription in terminally differentiated skeletal muscle cells is associated with loss of functional CCAAT-binding NF-Y complex, *Oncogene*, **18**, 2818–2827.
43. Gurtner, A., Fuschi, P., Magi, F., Colussi, C., Gaetano, C., Dobbstein, M., Sacchi, A., and Piaggio, G. (2008) NF-Y dependent epigenetic modifications discriminate between proliferating and postmitotic tissue, *PLoS One*, **3**, e2047.
44. Gurtner, A., Manni, I., Fuschi, P., Mantovani, R., Guadagni, F., Sacchi, A., and Piaggio, G. (2003) Requirement for down-regulation of the CCAAT-binding activity of the NF-Y transcription factor during skeletal muscle differentiation, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 2706–2715.
45. Korner, K., Jerome, V., Schmidt, T., and Muller, R. (2001) Cell cycle regulation of the murine cdc25B promoter: essential role for nuclear factor-Y and a proximal repressor element, *J. Biol. Chem.*, **276**, 9662–9669.
46. Linhart, C., Elkon, R., Shiloh, Y., and Shamir, R. (2005) Deciphering transcriptional regulatory elements that encode specific cell cycle phasing by comparative genomics analysis, *Cell Cycle*, **4**, 1788–1797.
47. Zwicker, J., Lucibello, F.C., Wolfrim, L.A., Gross, C., Truss, M., Engeland, K., and Muller, R. (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression, *EMBO J.*, **14**, 4514–4522.
48. Vermeulen, K., Berneman, Z.N., and Van Bockstaele, D.R. (2003) Cell cycle and apoptosis, *Cell Prolif.*, **36**, 165–175.

**TRANSCRIPTION FACTOR NF-Y INHIBITS
CELL GROWTH AND DECREASES SOX2
EXPRESSION IN HUMAN EMBRYONAL
CARCINOMA CELL LINE NT2/D1**

**M. Mojsin*, V. Topalovic, J. Marjanovic Vicentic*,
M. Stevanovic**

*Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering,
University of Belgrade, 11010 Belgrade, Serbia;
fax: +381(11)397-5808, E-mail: mojsin@imgge.bg.ac.rs,
vladankatopalovic@imgge.bg.ac.rs, jelenamarjanovic@imgge.bg.ac.rs,
milenastevanovic@imgge.bg.ac.rs*

Received August 1, 2014
Revision received September 22, 2014

Transcription factor NF-Y is an embryonic stem cell transcription factor due to its role in the regulation of cell proliferation. We investigated the role of NF-Y in maintaining pluripotency using NT2/D1 cells as one of the best-characterized human embryonal carcinoma cell lines. We investigated the efficiency of the protein transduction procedure and analyzed the effects of forced expression of short isoform of NF-YA subunit (NF-YAs) on NT2/D1 cell growth and expression of SOX2. We found that protein transduction is an efficient method for NF-Y overexpression in NT2/D1 cells. Next, we analyzed the effect of NF-YAs overexpression on NT2/D1 cell viability and found significant reduction in cell growth. The negative effect of NF-YA overexpression on NT2/D1 cells pluripotency maintenance was confirmed by the decrease in the level of pluripotency marker SOX2. Finally, we checked the p53 status and determined that NF-Y induced inhibition of NT2/D1 cell growth is p53-independent.

Key words: NF-Y transcription factor, NT2/D1 cell line, cell growth, SOX2, p53